

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

БСМ

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

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

BSM



Том 17

№ 1. 2018



СибГМУ 1888–2018

130 лет высшего медицинского образования в азиатской части России



Экспозиции музея СибГМУ, 2018 г.

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Выходит 4 раза в год

Том 17, № 1, 2018

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

Оригинал-макет:
Издательство СибГМУ.
634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
Редактор Е.Е. Степанова
Корректор Ю.П. Готфрид
Электронная верстка, дизайн обложки
А.Д. Кривонова

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

Подписано в печать 19.03.2018 г.
Формат 60 × 84/8. Печать офсетная.
Бумага мелованная. Гарнитура «Мысль».
Печ. л. 32. Усл. печ. л. 34,56.
Тираж 500 экз. Заказ 291.

Цена – свободная.
Дата выхода в свет 26.03.2018.

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.

© Сибирский государственный медицинский университет, 2018

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

В.В. Новицкий, *академик РАН* (Томск)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

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

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

В.М. Алифиров, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)
Л.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)
Л.В. Капилевич, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)
С.И. Карась, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)
Р.С. Карпов, *академик РАН* (Томск)
В.И. Киселев, *член-корреспондент РАН* (Барнаул)
Н.А. Корнетов, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)
С.В. Логвинов, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)
А.Д. Макацария, *член-корреспондент РАН* (Москва)
Л.С. Намазова-Баранова, *академик РАН* (Москва)
С.А. Некрылов, *профессор, д-р ист. наук* (Томск)
В.П. 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.С. Федорова, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)
И.А. Хлусов, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)
Е.А. Чойнзонов, *академик РАН* (Томск)
А.Г. Чучалин, *академик РАН* (Москва)
А.В. Шабров, *академик РАН* (Санкт-Петербург)
В.А. Шкурупий, *академик РАН* (Новосибирск)
М.С. Юсубов, *профессор, д-р хим. наук* (Томск)
А. Antsaklis, *профессор* (Греция)
F. Chervenak, *профессор* (США)
C. Dadak, *профессор* (Австрия)
Y. Dekhtyar, *профессор* (Латвия)
M. Eppe, *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 quarterly

Volume 17, No. 1, 2018

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

FOUNDER AND PUBLISHER:

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

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

The journal is published and 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))

Science Index

RSCI

Ulrich's International Periodicals Directory

Cyberleninka

DOAS

Editorial Board Office:

107, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

Telephone: +7-(382-2)-51-41-53.

<http://bulletin.tomsk.ru>

E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Publisher: the Siberian State Medical University.

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050,

Russian Federation.

Editor E.E. Stepanova

Proofreader Yu.P. Gotfrid

Electronic makeup, cover design

L.D. Krivtsova

Printed in Litburo LLC,

4, Korolev Str., Tomsk, 634055, Russian Federation

Signed to print 19.03.2018

Format 60 × 84/8. Offset print.

Coated paper. Mysl' font.

P.l. 32. C.p.l. 34,56.

500 copies. Odder no. 291.

The price – free.

Date of publication 26.03.2018.

Pass-through copyright.

Advertising providers are liable for the truthfulness
of information in advertising materials.

© Siberian State Medical University, 2018

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY-EDITORS-IN-CHIEF

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

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

SCIENCE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD:

V.M. Alifirova, *Professor (Tomsk)*

L.I. Aftanas, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

A.N. Baikov, *Professor (Tomsk)*

A.A. Baranov, *Academician of RAS (Moscow)*

A.I. Vengerovsky, *Professor (Tomsk)*

Ye.G. Grigoriyev, *Corresponding Member of RAS (Irkutsk)*

A.M. Dygai, *Academician of RAS (Tomsk)*

M.V. Zav'yalova, *Professor (Tomsk)*

L.V. Kapilevich, *Professor (Tomsk)*

S.I. Karas, *Professor (Tomsk)*

R.S. Karpov, *Academician of RAS (Tomsk)*

Ye.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. Puzryov, *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.S. Fedorova, *Professor (Tomsk)*

I.A. Khlusov, *Professor (Tomsk)*

Ye.L. Choinzonov, *Academician of RAS (Tomsk)*

A.G. Chuchalin, *Academician of RAS (Moscow)*

A.V. Shabrov, *Academician of RAS (St. Petersburg)*

V.A. Shkurupiy, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

M.S. Yusubov, *Professor (Tomsk)*

A. Antsaklis, *Professor (Greece)*

F. Chervenak, *Professor (USA)*

C. Dadak, *Professor (Austria)*

Y. Dekhtyar, *Professor (Latvia)*

M. Eppe, *Professor (Germany)*

D. Gailani, *Professor (USA)*

S. Orlov, *Professor (Canada)*

M. Poyurovsky, *Professor (Israel)*

V. Zhdankin, *Professor (USA)*



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	ORIGINAL ARTICLES
Алексеевская Е.С., Субботина Т.Ф., Жлоба А.А. Гомолог аргинина гомоаргинин в качестве суб- страта аргинин:глицинаминотрансферазы и аргиназ человека	Alekseevskaya E.S., Subbotina T.F., Zbloba A.A. Homoarginine, the methylene homologue of arginine, as a substrate of human arginine:glycineamidotransferase and arginases
Байбородина И.В., Завадовская В.Д., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Фетисова Т.В., Яжинова В.Н., Очирова Т.Д., Даниленко А.В., Басанова А.В., Зангеева Л.А. Транскраниальная сонография при болезни Паркинсона	Bayborodina I.V., Zavadovskaya V.D., Zbukova N.G., Zbukova I.A., Fetisova T.V., Yazbinova V.N., Ochirova T.D., Danilenko A.V., Basanova A.V., Zangeeva L.A. Transcranial sonography in Parkinson's disease
Байке Е.В., Уразова О.И. Цитокиновый профиль крови в зависимости от поли- морфизма генов цитокинов у больных хроническим гнойным средним отитом	Bayke E.V., Urazova O.I. The cytokine profile of blood in dependence on polymorphism of cytokine genes in patients with chronic purulent otitis media
Гольдина И.А., Гайдун К.В., Козлов В.А. УФО-индуцированная экспрессия эндогенного ре- тровируса человека HERV-E λ 4-1 в мононуклеарных клетках крови	Goldina I.A., Gaidul K.V., Kozlov V.A. UVI-induced endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 expression in blood mononuclear cells
Гузева В.И., Охрим И.В., Касумов В.Р., Гузева О.В., Гузева В.В., Максимова Н.Е. Особенности симптоматической эпилепсии и другие неврологические нарушения у детей с лиссэнцефалией	Guzeva V.I., Ochrim I.V., Kasumov V.R., Guzeva O.V., Guzeva V.V., Maksimova N.E. Characteristics of symptomatic epilepsy and other neurological disorders in children with lissencephaly
Иванова В.В., Мильто И.В., Суходоло И.В. Морфофункциональное состояние эпителиоцитов поднижнечелюстных слюнных желез на фоне много- кратной ампутации резцов у половозрелых крыс	Ivanova V.V., Milto I.V., Sukhodolo I.V. Morphological and functional state of the epithelial cells in submandibular salivary glands after repeated amputations of the incisor teeth in adult rats
Корнюшин О.В., Торопова Я.Г., Неймарк А.Е., Берко О.М., Глистенкова Д.Д., Карелли Л.Г., Полозов А.С., Галагудза М.М. Хирургическая коррекция метаболического синдрома в эксперименте на крысах: методические аспекты	Kornyushin O.V., Toropova Ya.G., Neimark A.E., Berko O.M., Glistenkova D.D., Carelli L.G., Polozov A.S., Galagudza M.M. Surgical correction of metabolic syndromes in rats: methodological aspects
Котловский М.Ю., Дыгай А.М., Трифонова О.Ю., Жданов В.В., Удут В.В., Чуринов А.А., Якимович И.Ю., Титов В.Н., Краснов Е.В., Котловская Л.Ю. Дозозависимое влияние статинов на изменение содер- жания отдельных жирных кислот плазмы крови и их комплексов при вторичной профилактике хрониче- ской формы ишемической болезни сердца у мужчин и женщин	Kotlovsky M.Yu., Dygai A.M., Trifonova O.Yu., Zhdanov V.V., Udu V.V., Churin A.A., Yakimovich I.Yu., Titov V.N., Krasnov E.V., Kotlovskaya L.Yu. Dose-dependent effect of statins on the change in the content of individual fatty acids of blood serum and their complexes of men and women with secondary prevention of chronic coronary heart disease

Краснова Н.М., Сычев Д.А., Александрова Т.Н.,
Венгеровский А.И.

Риск развития послеоперационных венозных тромбо-
эмболических осложнений у пожилых больных

85

Krasnova N.M., Sychev D.A., Aleksandrova T.N.,
Vengerovskii A.I.

Risk of postoperative venous thromboembolic
complication development in elderly patients

Крылова А.А., Кривошеина О.И., Уразова О.И.

Экспериментальное обоснование эффективности
«массажа» ретинальных вен для лечения окклюзии
вен сетчатки

94

Krylova A.A., Krivosheina O.I., Urazova O.I.

Experimental substantiation of the effectiveness of
the “massage” retinal veins for treatment of retinal
vein occlusion

Ларькина М.С., Семенов А.С., Зельчан Р.В.,
Подрезова Е.В., Брагина О.Д., Юсубов М.С.,
Скуридин В.С., Чернов В.И., Белоусов М.В.,
Тимофеев М.С.

Способ получения и изучение биологических свойств
меченной йодом-123 производной аминокислоты

102

Larkina M.S., Semenov A.S., Zelchan R.V.,
Podrezova E.V., Bragina O.D., Yusubov M.S.,
Skuridin V.S., Chernov V.I., Belousov M.V.,
Timofeev M.S.

Preparation of 123-iodine labeled glucosamine
derivative and investigation of its biological
properties

Лебедева С.Н., Очилов О.С., Стельмах С.А.,
Григорьева М.Н., Жамсаранова С.Д., Могнонов Д.М.

Репаративное действие гидрогеля полигексаметилен-
гуанидин гидрохлорида

112

Lebedeva S.N., Ochirov O.S., Stelmakh S.A.,
Grigor'eva M.N., Zhamsaranova S.D., Mogonov D.M.

Reparative action of hydrogel
polyhexamethylenuanidine hydrochloride

Матвеева Н.Ю., Матвеев Ю.А.,
Калиниченко С.Г., Едранов С.С., Каминский Ю.В.

Значение апоптоза энтероцитов при воспалительных
заболеваниях кишечника

121

Matveeva N.Yu., Matveev Yu.A.,
Kalinichenko S.G., Edranov S.S., Kaminskiy Yu.V.

The role of apoptosis of enterocytes in
inflammatory bowel diseases

Мельников М.Е., Безматерных Д.Д.,
Петровский Е.Д., Козлова Л.И., Штарк М.Б.,
Савелов А.А., Шубина О.С., Натарова К.А.

Время реакции в ответ на эмоциональные стимулы
(включая фотопортреты с различной мимикой) в
ходе фМРТ-исследования лиц с легкой и умеренной
депрессией, дистимией

130

Mel'nikov M.Ye., Bezmaternykh D.D.,
Petrovskiy E.D., Kozlova L.I., Shtark M.B.,
Savelov A.A., Shubina O.S., Natarova K.A.

The response time to emotional stimuli (including
facial expressions photos) during the fmri scanning
in affective disorders: mild and moderate depression
and dysthymic disorder

Никитин А.А., Науменко В.А., Водопьянов С.С.,
Гаранина А.С., Федорова Н.Д., Калабай Е.Д.,
Савченко А.Г., Абакумов М.А., Мажуга А.Г.

Изучение эффективности контрастирования различ-
ных видов опухолей с использованием кубических
наночастиц магнетита

139

Nikitin A.A., Naumenko V.A., Vodopyanov S.S.,
Garanina A.S., Fedorova N.D., Kalabay E.D.,
Savchenko A.G., Abakumov M.A., Majouga A.G.

Study of the contrasting effectiveness of various
tumors types using cubic magnetite nanoparticles

Ушкалова Е.А., Черникова Л.Ю., Евтушенко И.Д.,
Каракулова Е.В., Фокин В.А., Белоусов М.В.

Фармакоэпидемиологические аспекты антибакте-
риальной терапии сальпингоофорита в условиях
стационара

149

Черевко Н.А., Скирневская А.В., Розенштейн М.Ю.,
Новиков П.С., Муравейник О.А., Денисов А.А.

Особенности специфической гиперчувствительности к
пищевым антигенам молочного и злакового кластеров
у детей с расстройством аутистического спектра

159

Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А.,
Баторов Е.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

Эффекты мезенхимальных стромальных клеток
на дифференцировку макрофагов первого типа
и их переключение в макрофаги второго типа

167

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

Липатов В.А., Зайцев И.Г., Северинов Д.А.

О проблемах внедрения ИТ-систем в практическое
здравоохранение

177

Лычковская Е.В., Шубаев, Герцог Г.Е.,
Труфанова Л.В., Шадрина Л.Б., Семенчуков А.А.,
Салмина А.Б.

Роль молекулярных компонентов депо-зависимого
тока Ca^{2+} – белков Stim и Orai – в лимфоцитах

191

Сенников С.В., Хантакова Ю.Н., Кнауэр Н.Ю.

Клеточная Т-регуляторная терапия в трансплантоло-
гии: от получения до клинического применения

199

Стаценко И.А., Стегалов С.В., Лебедева М.Н.,
Первухин С.А.

Современный взгляд на проблему острого послеопера-
ционного делирия у пациентов травматолого-ортопе-
дического профиля в условиях отделения реанимации
и интенсивной терапии

211

Чернов В.И., Медведева А.А., Синилкин И.Г.,
Зельчан Р.В., Брагина О.Д., Чойнзоннов Е.Л.

Ядерная медицина в диагностике и адресной терапии
злокачественных новообразований

220

Usbkalova E.A., Chernikova L.Yu., Evtushenko I.D.,
Karakulova E.V., Fokin V.A., Belousov M.V.

Pharmacoepidemiological aspects of antibacterial
therapy of salpingoophoritis in hospital settings

Cherevko N.A., Skirnevskaya A.V., Rosenstein M.Yu.,
Novikov P.S., Muraveinik O.A., Denisov A.A.

Features of specific food hypersensitivity to
dairy and cereal products in children with autism
spectrum disorder

Shevela E.Ya., Sakbno L.V., Tikhonova M.A.,
Batorov E.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

Effects of mesenchymal stromal cells on monocyte
differentiation to M1 phenotype and M1/M2
macrophage switching

REVIEWS AND LECTURES

Lipatov V.A., Zaytsev I.G., Severinov D.A.

About problems of implementation of IT-systems
in practical health care

Lychkovskaya E.V., Shuvaev A.N., Gercog G.E.,
Trufanova L.V., Shadrina L.B., Semenchukov A.A.,
Salmina A.B.

The role of proteins stim and orai as molecular
components of the store-dependent current Ca^{2+}
in lymphocytes

Sennikov S.V., Khantakova J.N., Knauer N.Yu.

T-regulatory cells in transplantology: from
preparation to clinical applications

Statsenko I.A., Stegalov S.V., Lebedeva M.N.,
Pervukhin S.A.

Modern view on the problem of acute
postoperative delirium in trauma and orthopedic
patients in the intensive care unit

Chernov V.I., Medvedeva A.A., Sinilkin I.G.,
Zelchan R.V., Bragina O.D., Choyzononov E.L.

Nuclear medicine as a tool for diagnosis and
targeted cancer therapy

СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ	CASE OF CLINICAL PRACTICE
<i>Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Тарабановская Н.А., Таширева Л.А., Дерюшева И.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В.</i> Клиническое наблюдение ВПЧ-положительной опухоли молочной железы	<i>Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Tarabanovskaya N.A., Tashireva L.A., Deryusheva I.V., Perelmutter V.M., Slonimskaya E.M., Litviakov N.V.</i> The clinical observation of human papillomavirus positive breast tumor
<i>Кабдрахманова Г.Б., Утепкалиева А.П., Саркулова Ж.Н., Дарин Д.Б.</i> Современное состояние проблемы мозгового инсульта в Западном регионе Казахстана	<i>Kabdrakhmanova G.B., Utepkaliyeva A.P., Sarkulova Zh.N., Darin D.B.</i> Current state of brain stroke problem in the West Kazakhstan Region
<i>Колесникова И.С., Тулупов А.А., Дольский А.А., Лемская Н.А., Савелов А.А., Петровский Е.Д., Антонов А.А., Максимова Ю.В., Шорина А.Р., Сергеева И.Г., Телепова А.С., Графодатский А.С., Юдкин Д.В.</i> Повышенная экспрессия рРНК у пациента с интел- лектуальной недостаточностью и семейным случаем хромосомы 13p+	<i>Kolesnikova I.S., Tulupov A.A., Dolskiy A.A., Lemskaya N.A., Savelov A.A., Petrovsky E.D., Antonov A.A., Maksimova Yu.V., Shorina A.R., Sergeeva I.G., Telepova A.S., Graphodatsky A.S., Yudkin D.V.</i> Overexpression of rRNA genes in a patient with intellectual disability and familial 13p+ chromosome
ЮБИЛЕИ	JUBILEES
Слизовский Григорий Владимирович (К 60-летию со дня рождения)	Slizovsky Grigory Vladimirovich (To 60th birthday)

УДК 577.152.353:577.151.35/.36

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-7-14

Для цитирования: Алексеевская Е.С., Субботина Т.Ф., Жлоба А.А. Гомолог аргинина гомоаргинин в качестве субстрата аргинин:глицинамидинотрансферазы и аргиназ человека. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 7–14.

Гомолог аргинина гомоаргинин в качестве субстрата аргинин:глицинамидинотрансферазы и аргиназ человека

Алексеевская Е.С.^{1,2}, Субботина Т.Ф.^{1,2}, Жлоба А.А.^{1,2}

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет (ПСПбГМУ) им. акад. И.П. Павлова Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8

² Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) имени В.А. Алмазова Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

РЕЗЮМЕ

L-гомоаргинин (гАрг) является неcodируемой аминокислотой, снижение в крови уровня которой ассоциировано с повышением риска развития инсульта и инфаркта. В организме человека и животных гАрг образуется преимущественно в ходе реакции, катализируемой ферментом метаболического пути биосинтеза креатина – аргинин:глицинамидинотрансферазой (АГАТ, КФ 2.1.4.1), в случае, когда акцептором амидиновой группы аргинина вместо глицина выступает L-лизин. Метаболическое значение и причины снижения уровня гАрг в настоящее время изучены недостаточно.

Цель настоящего исследования – изучение возможности утилизации гАрг в качестве субстрата АГАТ и аргиназ человека.

Материалы и методы. В ходе экспериментов с рекомбинантными ферментами обнаружено, что K_m для гАрг в реакции, катализируемой АГАТ, в сторону образования гуанидинуксусной кислоты составляет $(12,0 \pm 1,1)$ мМ. В реакциях, катализируемых аргиназами обоих типов, активность в отношении гАрг, в отличие от аргинина, не регистрировалась.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что у человека гАрг является субстратом не только для NO-синтаз, но также для АГАТ. Полученные данные указывают на то, что метаболическое значение гАрг, помимо регуляции сосудистого тонуса, может быть связано с участием в энергетическом обмене клеток. Согласно представленным данным, снижение уровня гАрг в крови при сердечно-сосудистых заболеваниях, по всей видимости, не связано с обнаруживаемым повышением активности аргиназ.

Ключевые слова: гомоаргинин, аргинин:глицинамидинотрансфераза, аргиназа, креатин, гуанидинуксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

L-гомоаргинин (гАрг) в больших количествах синтезируется в некоторых растениях [1]. В организме человека и животных гАрг образуется преимущественно в ходе реакции, катали-

зируемой аргинин:глицинамидинотрансферазой (АГАТ, КФ 2.1.4.1), в случае, когда акцептором амидиновой группы вместо глицина выступает L-лизин [2, 3] (рис. 1, б). В основной АГАТ-реакции, протекающей преимущественно в митохондриях, в результате переноса амидиновой группировки на аминокислоту глицина синтезируется гуанидинуксусная кислота (рис. 1, а), которая

✉ Алексеевская Елизавета Сергеевна, e-mail: alizlex@mail.ru.

после метилирования образует креатин. АГАТ у человека экспрессируется в различных тканях, но

наибольшая активность обнаружена в почках и поджелудочной железе [4].

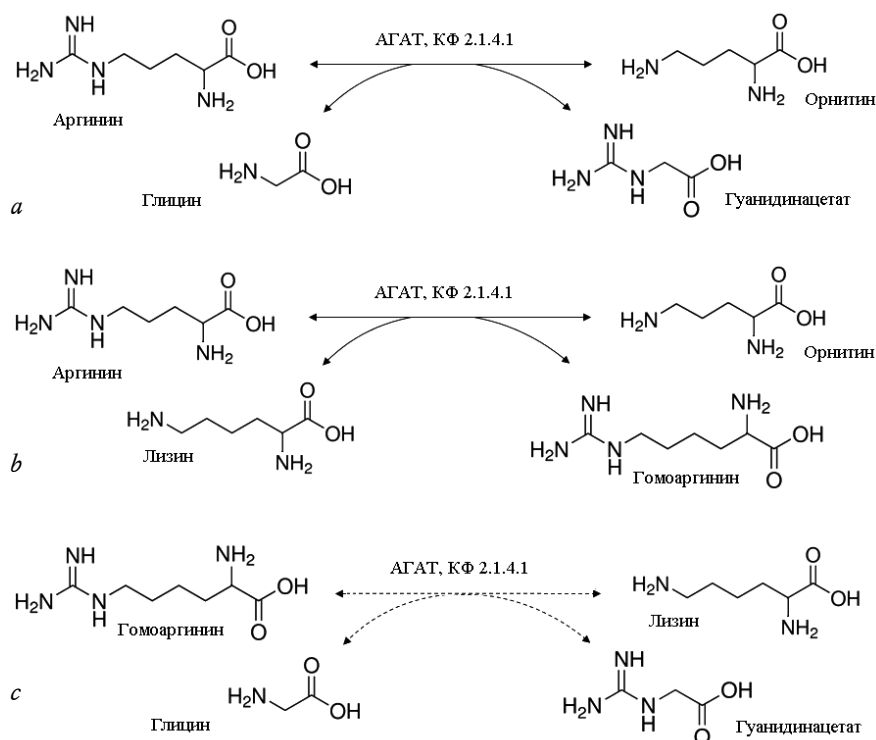


Рис. 1. Известные и предполагаемые реакции, катализируемые аргинин:глицинаминоотрансферазой (АГАТ): *a* – основная реакция, образование предшественника креатина (гуанидинуксусной кислоты); *b* – реакция образования гомоаргинина из аргинина и лизина; *c* – предполагаемая реакция, в которой в качестве донора амидиновой группы выступает гомоаргинин

Fig. 1. Known and suspected reactions catalyzed by arginine:glycine aminotransferase (AGAT): *a* – the main reaction, the formation of the precursor of creatine (guanidinoacetic acid); *b* – reaction of formation of homoarginine from arginine and lysine; *c* – an alleged reaction in which homoarginine acts as an amidine group donor

Обнаруженная в ходе исследований последних лет ассоциация низкого уровня гАрг и высокого риска острых сердечно-сосудистых событий [5–7] обуславливает особый интерес к изучению метаболизма гАрг. В отношении аргинина эта ассоциация не прослеживается [5]. Механизм, лежащий в основе обнаруженной связи между уровнем гАрг и риском развития инфаркта и инсульта, остается неясным. Положительное воздействие высоких доз добавок экзогенного гАрг в эксперименте в условиях реперфузии мозговой ткани [3] указывает на существование метаболического пути утилизации гАрг. Известно, что гАрг может выступать в качестве субстрата NO-синтаз, но с меньшим сродством, чем аргинин [8]. В силу обратимости реакций, катализируемых АГАТ [9, 10], логично предположить, что метаболическое значение гАрг, особенно в условиях введения больших количеств данной аминокислоты, может быть связано с непосред-

ственным участием в синтезе гуанидинуксусной кислоты в качестве донора амидиновой группы вместо аргинина (рис. 1, *c*). Результаты исследований этого вопроса у животных являются противоречивыми [9, 11, 12], в то время как данные по изучению активности человеческой АГАТ к гАрг в качестве субстрата в прямой реакции в настоящее время отсутствуют. ГАрг, подобно лизину, обладает способностью ингибировать аргиназы (КФ 3.5.3.1), хотя это ингибирующее влияние гАрг не является значительным [13]. Рядом исследователей не исключается возможность использования гАрг в качестве субстрата, а не ингибитора аргиназ [14, 15]. С учетом повышения активности аргиназ при сердечно-сосудистых заболеваниях [16] возможность снижения уровня гАрг в крови за счет гидролиза аргиназами требует уточнения (рис. 2).

Цель работы – оценить гАрг в качестве субстрата для АГАТ и аргиназ I, II типов.

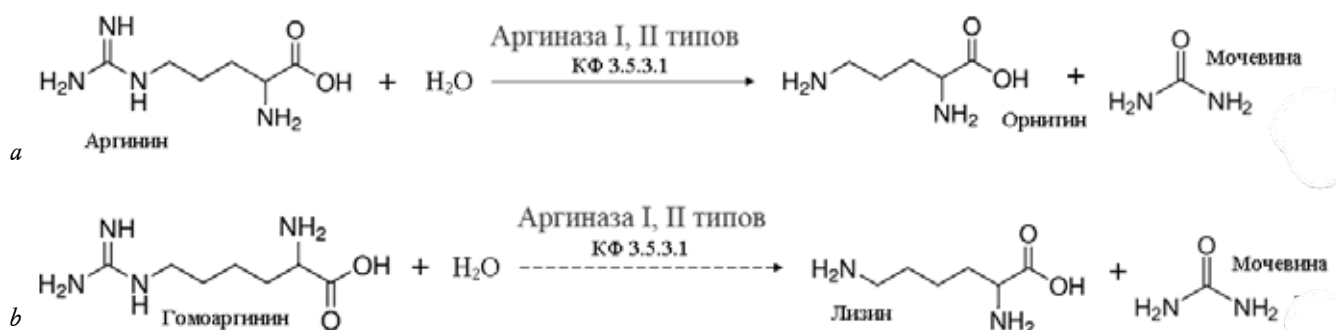


Рис. 2. Образование мочевины из аргинина (а) и возможный путь гидролиза гомоаргинина (b) под действием аргиназ

Fig. 2. Formation of urea from arginine (a) and a possible way of hydrolysis of homoarginine (b) under the action of arginase

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки возможности применения гАрг в качестве субстрата в прямой АГАТ-реакции вместо аргинина (рис. 1, б), а также гидролиза гАрг аргиназами были проведены опыты с использованием препаратов рекомбинантных ферментов человека: митохондриальной АГАТ (ProSpec, США), аргиназы I (R&D Systems Inc., США) и II (Cedarlane, Канада) типов. В ходе хроматографических процедур использовали боратный буфер (кат. № 5061-3339) и ОРА-реагент (кат. № 5061-3335) фирмы Agilent Technologies (США), а также стандарты аминокислот (Sigma-Aldrich, США). В ходе выполнения исследования использовано оборудование: хроматограф Agilent-1100 с флуориметрическим детектором (Agilent Technologies, США); полуавтоматический биохимический анализатор BS-3000p (Sinnova, КНР); термостат твердотельный ТТ-2-«Термит» («ДНК-Технология», Россия). Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду с удельной проводимостью не более 0,1 мкСм/см, которую перед применением освобождали от частиц путем фильтрации через мембраны с порами 0,2 мкм (Phenomenex, Великобритания).

Определение активности АГАТ. Препарат фермента хранили в 20 мМ трис-НСl буфере, pH 8,0, содержащем 2 мМ дитиотреитола и 10% глицерола. Рабочий раствор фермента готовили на 20 мМ трис-НСl буфере, pH 8,0, содержащем альбумин 1 мг/мл, 154 мМ NaCl. Перед реакцией фермент преинкубировали в течение 10 мин при 37 °С в присутствии одного из субстратов – 25 мМ глицина, 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,4, 154 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА. Ферментативную реакцию начинали с добавления раствора второго субстрата (аргинина или гАрг), 0,1 М натрий-фосфатный

буфер, pH 7,4, 154 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА. K_m АГАТ в отношении гАрг определяли, варьируя концентрацию гАрг при постоянной концентрации глицина 25 мМ. Инкубировали при 37 °С в течение 1 ч.

Реакцию останавливали добавлением осаждающего раствора метанола с муравьиной кислотой, содержащего норвалин в качестве внутреннего стандарта, в соотношении 1 : 2,75. Активность фермента и скорость реакции оценивали по уровню образовавшегося продукта реакции – орнитина (донор аргинина) или лизина (субстрат гАрг). Концентрацию ортофталевых дериватов субстратов и продуктов реакции определяли после обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием колонки Zorbax Eclipse AAA C18 (150 x 4,6 мм, 3,5 мкм) согласно рекомендациям фирмы Agilent Technologies [17] в авторской модификации, позволяющей определять с достаточной точностью концентрации производных аргинина – гАрг и орнитина. Реакцию получения ортофталевых производных проводили в режиме on-line с помощью аутосамплера Agilent 1100 путем смешивания 2,5 мкл боратного буфера, 0,5 мкл ортофталевого (ОРА)-реагента и 0,5 мкл образца. После 6-кратного перемешивания в седле аутосамплера и 0,1-минутной задержки флуоресцирующие производные аминокислот поступали в поток и на хроматографическую колонку со скоростью 1,5 мл/мин. Элюцию проводили при 40 °С в градиенте подвижной фазы путем смешивания фаз: А (40 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,8) и Б (ацетонитрил : метанол : вода (45 : 45 : 10)).

Содержание фазы Б возрастало от 1,5 до 10% к 0,1-й мин и далее с 10 до 14% к 11-й мин, затем достигало 20% к 15-й мин и 60% к 26-й мин. После 3-минутного промывания 100% фазы Б

колонку уравнивали в течение 4 мин стартовой смесью фаз с содержанием 1,5% фазы Б. Регистрацию флуоресценции элюата проводили при длине волны возбуждения 340 и 455 нм испускания. Целесообразность использования растворов *L*-норвалина в качестве внутреннего стандарта для определения аминокислот была показана нами ранее [18]. Уровень гАрг контролировали в реакционных смесях одновременно с определением других продуктов реакций.

В предложенной модификации метода гАрг элюируется с хорошим разрешением между пиками аланина и тирозина, а пик орнитина – между пиками изолейцина и лейцина. Элюция остальных аминокислот соответствовала указанному выше протоколу определения [17]. В отдельной серии экспериментов нами установлен предел количественного определения (LOQ) для гАрг в образцах плазмы крови ($0,20 \pm 0,05$) мкМ, а коэффициент аналитической вариации 3,1% ($n = 10$). Эти аналитические характеристики весьма близки к другим современным методам определения гАрг, основанным на ВЭЖХ [19].

Определение активности аргиназ. Растворы аргиназ перед использованием выдерживали при 55 °С в течение 10 мин в присутствии ионов Mn^{2+} , 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ $MnCl_2$. Аргиназы являются термостабильными ферментами [20], и их активация в условиях повышения температуры до 50–55 °С в присутствии ионов металла-кофактора подробно описана [21, 22]. Ферментативную реакцию начинали с добавления раствора субстрата (аргинин или гАрг), 50 мМ глицин-NaOH буфер, pH 9,6. Инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали нагреванием в течение 3 мин при температуре около 100 °С. Активность ферментов и скорость реакции оценивали по уровню образовавшегося продукта реакции – мочевины, которую определяли с использованием коммерческого набора реактивов (PZ CORMAY S.A., Польша).

Статистическая обработка результатов. Значение кинетических констант определено с использованием первичных данных без линеаризации путем построения нелинейной регрессионной модели согласно уравнению Михаэлиса – Ментен с помощью пакета программ SAS Enterprise Guide 6.1. Использовали модель $y = x/(a + b \cdot x)$, в которой константа a соответствует K_m/V_{max} , а константа $b = 1/V_{max}$. Для определения K_m АГАТ в отношении гАрг определяли начальную скорость образования лизина, варьируя концентрацию гАрг от 10 до 200 мМ при постоянной концентрации глицина в 25 мМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе экспериментов с рекомбинантной человеческой АГАТ обнаружено, что под действием фермента в среде, содержащей гАрг и глицин, идет образование лизина в количествах, эквивалентных снижению концентрации гАрг. Эти результаты указывают на то, что гАрг является не только продуктом АГАТ, но и может выступать в качестве донора амидиновой группы вместо аргинина. На основании полученных данных о начальной скорости образования лизина в зависимости от концентрации гАрг (рис. 3) были рассчитаны кинетические параметры изучаемой реакции (таблица). Была построена регрессионная модель зависимости скорости реакции (V) от концентрации субстрата гАрг (S) – $V = S/(49,84 + 4,15 \cdot S)$, с уровнем статистической значимости $p = 0,0006$. Исходя из равенств $1/V_{max} = 4,15 \pm 0,098$ и $K_m/V_{max} = 49,84 \pm 4,57$, были рассчитаны кинетические константы.

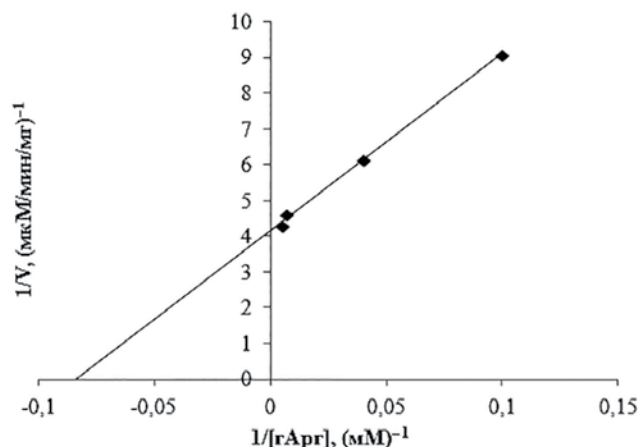


Рис. 3. Диаграмма Лайнуивера – Бэрка зависимости скорости реакции, катализируемой аргинин:глицин-амидинотрансферазой, от концентрации гомоаргинина (гАрг) в двойных обратных координатах

Fig. 3. Lineweaver – Burk plot which illustrates the dependence of the reaction rate, catalyzed by arginine: glycine aminotransferase, on the concentration of homoarginine (gArg) in double inverse coordinates

При концентрации субстратов на уровне $10 K_m$ активность АГАТ в отношении гАрг была равна 0,22 мкмоль/мин на 1 мг фермента, в то время в отношении аргинина активность АГАТ в таких же условиях составила 0,43 мкмоль/мин на мг фермента, что соответствует максимальной активности АГАТ в отношении аргинина по данным других исследователей (см. таблицу).

Кинетические параметры аргинин:глицинамидинотрансферазы человека в отношении аргинина и гомоаргинина в качестве субстратов				
Субстрат	Источник фермента	K_m , мМ	V_{max} , мкМ/мин/мг	Ссылка
Аргинин	Ткань почки	2,5	0,5	[23]
	Рекомбинантный фермент	$2,0 \pm 0,5$	0,44	[24]
Гомоаргинин	Рекомбинантный фермент	$12,0 \pm 1,1$	$0,241 \pm 0,006$	Данные настоящей работы

Активность аргиназы I типа по отношению к аргинину составила 48,0 мкмоль/мин на 1 мг фермента, а аргиназы II типа – 11,0 мкмоль/мин на 1 мг фермента. Активность этих аргиназ в отношении гАрг в качестве субстрата при концентрации гАрг 50 мМ для аргиназы I типа и 100 мМ для аргиназы II типа не регистрировалась.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, K_m АГАТ человека для гАрг в качестве субстрата в пять раз выше, чем для аргинина. Следует отметить, что в исследованиях рекомбинантной и выделенной из тканей почки человеческой АГАТ кинетические характеристики оказались сопоставимы [23, 24]. Активность АГАТ в отношении гАрг также примерно в два раза ниже в сравнении с аргинином при концентрациях субстратов на уровне $10 K_m$. Полученные результаты, характеризующие гАрг в качестве субстрата АГАТ в сравнении с аргинином, сопоставимы с данными по изучению активности NO-синтаз в отношении данных аминокислот. K_m нейрональной и индуцибельной NO-синтаз в отношении гАрг в сравнении с аргинином выше в 10 и три раза соответственно. В отношении аргинина эта константа равна 3 и 13 мкмоль/л для нейрональной и индуцибельной NO-синтазы соответственно [8]. Активность этих NO-синтаз в отношении гАрг оказалась в

два раза ниже, чем в отношении аргинина [8, 25]. Таким образом, гАрг может рассматриваться в качестве субстрата АГАТ, но с меньшим, чем у аргинина, сродством, аналогично ситуации с NO-синтазами.

Из данных литературы известно, что при наследственных нарушениях орнитинового цикла образования мочевины у детей наблюдается резкое возрастание в крови и моче содержания аргинина и одновременно гАрг [26]. Полученные результаты об отсутствии активности аргиназ I и II типов в отношении гАрг указывают на то, что повышение уровня гАрг при данных состояниях, по всей видимости, является результатом утилизации избыточных количеств аргинина как в основной, так и в побочной реакциях, катализируемых АГАТ, и не зависит от снижения скорости его гидролиза. Этому соответствует возрастание уровня гуанидинуксусной кислоты в условиях генетических дефектов аргиназы I типа [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе данные о том, что гАрг является не только продуктом АГАТ, но и дополнительным субстратом, позволили предложить еще один метаболический путь утилизации гАрг, помимо известных ранее путей экскреции и использования гАрг в реакции образования монооксида азота (рис. 4).



Рис. 4. Направления метаболизма *L*-гомоаргинина у человека, дополненные с учетом полученных данных: большая толщина стрелок указывает на доминирующие направления пути метаболизма

Fig. 4. Directions of metabolism of *L*-homoarginine in humans, supplemented with regard to the data obtained: larger thickness of the arrows indicates the dominant directions of the path of metabolism

Таким образом, оценка гАрг лишь как «побочного продукта» пути биосинтеза креатина, только как «свидетеля» метаболических изменений требует уточнения. Обнаружение протективного эффекта при введении дополнительных количеств гАрг на фоне развития инсульта и инфаркта в эксперименте подтверждает наличие собственного метаболического значения у данной аминокислоты [3, 28].

Особенный интерес для клинической медицины представляет тот факт, что метаболическое действие гАрг наблюдается даже в условиях простого алиментарного введения аминокислоты вместе с пищей [28]. Полученные результаты указывают, что метаболические эффекты гАрг могут быть связаны не только с синтезом NO, но и с улучшением энергетического статуса клетки за счет активации синтеза креатина. Следовательно, существенное влияние на эффективность применения гАрг в качестве терапевтического агента может оказывать наличие мутаций в генах ферментов пути образования креатина. Как известно, уровень гАрг в плазме крови связан с генетическими вариантами АГАТ у человека [3], частота которых варьирует в различных этнических группах [7]. Отсутствие активности аргиназы в отношении гАрг указывает, что снижение уровня гАрг в крови при сердечно-сосудистых заболеваниях, по всей видимости, не связано с обнаруживаемым при данных состояниях повышением активности аргиназы и является еще одним аргументом в пользу того, что гАрг – не просто маркер-«свидетель» метаболических изменений, а значимый участник биохимических путей человека.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-02480.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Onar A.N., Erdoğan B.Y., Ayan I., Acar Z. Homoarginine, β -ODAP, and asparagine contents of grass pea landraces cultivated in Turkey. *Food Chem.* 2014; 143: 277–281. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.07.051.
- Davids M., Ndika J.D., Salomons G.S., Blom H.J., Teerlink T. Promiscuous activity of arginine:glycine amidinotransferase is responsible for the synthesis of the novel cardiovascular risk factor homoarginine. *FEBS Lett.* 2012; 586 (20): 3653–3657. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.08.020.
- Choe C.U., Atzler D., Wild P.S., Carter A.M., Böger R.H., Ojeda F., Simova O., Stockebrand M., Lackner K., Nabuurs C., Marescau B., Streichert T., Müller C., Lüneburg N., De Deyn P.P., Benndorf R.A., Baldus S., Gerloff C., Blankenberg S., Heerschap A., Grant P.J., Magnus T., Zeller T., Isbrandt D., Schwedhelm E. Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation.* 2013; 128 (13): 1451–1461. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000580.
- Van Pilsum J.F., Stephens G.C., Taylor D. Distribution of creatine, guanidinoacetate and the enzymes for their biosynthesis in the animal kingdom. Implications for phylogeny. *Biochem. J.* 1972; 126 (2): 325–345. DOI: 10.1042/bj1260325.
- März W., Meinitzer A., Drechsler C., Pilz S., Krane V., Kleber M.E., Fischer J., Winkelmann B.R., Böhm B.O., Ritz E., Wanner C. Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation.* 2010; 122 (10): 967–975. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.908988.
- Drechsler C., Meinitzer A., Pilz S., Krane V., Tomaschitz A., Ritz E., März W., Wanner C. Homoarginine, heart failure, and sudden cardiac death in haemodialysis patients. *Eur. J. Heart Fail.* 2011; 13 (8): 852–859. DOI: 10.1093/eurjhf/hfr056.
- Atzler D., Gore M.O., Ayers C.R., Choe C.U., Böger R.H., de Lemos J.A., McGuire D.K., Schwedhelm E. Homoarginine and cardiovascular outcome in the population-based Dallas Heart Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34 (11): 2501–2507. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304398.
- Moali C., Boucher J.L., Sari M.A., Stuehr D.J., Mansuy D. Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their Nomega-hydroxy derivatives, and Nomega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry.* 1998; 37 (29): 10453–10460. DOI: 10.1021/bi980742t.
- Ratner S., Rochovansky O. Biosynthesis of guanidinoacetic acid. I. Purification and properties of transaminidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1956; 63 (2): 277–295. DOI: 10.1016/0003-9861(56)90044-3.
- Walker J.B. Arginine-ornithine transamidation in kidney. *J. Biol. Chem.* 1956; 221 (2): 771–776.
- Walker J.B. Studies on the mechanism of action of kidney transaminidase. *J. Biol. Chem.* 1957; 224 (1): 57–66.
- Conconi F., Grazi E. Transaminidase of hog kidney. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 1965; 240 (6): 2461–2464.
- Hrabák A., Bajor T., Temesi A. Comparison of substrate and inhibitor specificity of arginase and nitric oxide (NO) synthase for arginine analogues and related compounds in murine and rat macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 198 (1): 206–212. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1029.

14. Christiansen B., Wellendorph P., Bräuner-Osborne H. Known regulators of nitric oxide synthase and arginase are agonists at the human G-protein-coupled receptor GPRC6A. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 147 (8): 855–863. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706682.
15. Mielczarek-Puta M., Chrzanowska A., Barańczyk-Kuźma A. Nowe oblicza arginazy. Część I. Struktura i właściwości. *Postępy Hig. Med. Dosw. (Online)*. 2008; 62: 206–213.
16. Pernow J., Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc. Res.* 2013; 98 (3): 334–343. DOI: 10.1093/cvr/cvt036.
17. Bartolomeo M.P., Maisano F. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *J. Biomol. Tech.* 2006; 17 (2): 131–137.
18. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Lupan D.S., Bogova V.A., Kusheleva O.A. Arginine and lysine as products of basic carboxypeptidase activity associated with fibrinolysis. *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* 2012; 6 (3): 261–265. DOI:10.1134/S1990750812030158.
19. Hou Y., Jia S., Nawaratna G., Hu S., Dahanayaka S., Bazer F.W., Wu G. Analysis of L-homoarginine in biological samples by HPLC involving precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. *Amino Acids*. 2015; 47 (9): 2005–2014. DOI: 10.1007/s00726-015-1962-9.
20. Scolnick L.R., Kanyo Z.F., Cavalli R.C., Ash D.E., Christianson D.W. Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function. *Biochemistry*. 1997; 36 (34): 10558–10565. DOI: 10.1021/bi970800v.
21. Spector E.B., Rice S.C.H., Moedjono S., Bernard B., Cednerbaum, S.D. Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochemical Medicine*. 1982; 28 (2): 165–175. DOI: 10.1016/0006-2944(82)90067-9.
22. Colleluori D.M., Morris S.M. Jr., Ash D.E. Expression, purification, and characterization of human type II arginase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 389 (1): 135–143. DOI: 10.1006/abbi.2001.2324.
23. Gross M.D., Eggen M.A., Simon A.M., Van Pilsum J.F. The purification and characterization of human kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986; 251 (2): 747–755. DOI: 10.1016/0003-9861(86)90385-1.
24. Fritsche E., Humm A., Huber R. Substrate binding and catalysis by L-arginine:glycine amidinotransferase. A mutagenesis and crystallographic study. *Eur. J. Biochem.* 1997; 247 (2): 483–490. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.00483.x.
25. Knowles R.G., Merrett M., Salter M., Moncada S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem. J.* 1990; 270 (3): 833–836. DOI: 10.1042/bj2700833.
26. Kato T., Sano M., Mizutani N., Hayakawa C. Homocitrullinuria and homoargininuria in hyperargininaemia. *J. Inher. Metab. Dis.* 1988; 11 (3): 261–265. DOI: 10.1007/bf01800367.
27. Amayreh W., Meyer U., Das A.M. Treatment of arginase deficiency revisited: guanidinoacetate as a therapeutic target and biomarker for therapeutic monitoring. *Dev. Med. Child Neurol.* 2014; 56 (10): 1021–1024. DOI: 10.1111/dmcn.12488.
28. Atzler D., McAndrew D.J., Cordts K., Schneider J.E., Zervou S., Schwedhelm E., Neubauer S., Lygate C.A. Dietary supplementation with homoarginine preserves cardiac function in a murine model of post-myocardial infarction heart failure. *Circulation*. 2017; 135 (4): 400–402. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025673.

Поступила в редакцию 23.03.2017

Утверждена к печати 30.06.2017

Алексеевская Елизавета Сергеевна, науч. сотрудник, отдел биохимии, Научно-образовательный институт (НОИ) биомедицины, ПСПбГМУ им. И.П. Павлова; мл. науч. сотрудник, группа протеомики, Институт молекулярной биологии и генетики, НМИЦ им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Субботина Татьяна Фёдоровна, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией биохимического мониторинга, отдел биохимии, НОИ биомедицины, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; вед. науч. сотрудник, группа протеомики, Институт молекулярной биологии и генетики, НМИЦ им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Жлоба Александр Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела биохимии, НОИ биомедицины, ПСПбГМУ им. И.П. Павлова; вед. науч. сотрудник, руководитель группы протеомики, Институт молекулярной биологии и генетики, НМИЦ им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

(✉) Алексеевская Елизавета Сергеевна, e-mail: alizlex@mail.ru.

УДК 577.152.353:577.151.35/.36

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-7-14

For citation: Alekseevskaya E.S., Subbotina T.F., Zhloba A.A. Homoarginine, the methylene homologue of arginine, as a substrate of human arginine:glycine amidinotransferase and arginases. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 7–14.

Homoarginine, the methylene homologue of arginine, as a substrate of human arginine:glycine amidinotransferase and arginases

Alekseevskaya E.S.^{1,2}, Subbotina T.F.^{1,2}, Zhloba A.A.^{1,2}

¹ Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University
6/8, Lva Tolstogo Str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation

² V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre
2, Akkuratova Str., Saint Petersburg, 197341, Russian Federation

ABSTRACT

L-homoarginine (hArg) is a non-coding amino acid, the blood level reduction of which is associated with an increased risk of stroke and heart attack. In humans and animals, hArg is mainly formed during the reaction catalyzed by the enzyme of the metabolic pathway of creatine biosynthesis: arginine: glycine amidotransferase (AGAT, EC 2.1.4.1), in the case where L-lysine acts instead of glycine as an acceptor of the arginine amidine group. It has been shown that hArg can serve for nitric oxide biosynthesis which is seemed a single significant enzymatic pathway established for hArg.

The aim of this study was to investigate hArg as a substrate human AGAT and arginases.

Materials and methods. In experiments with recombinant enzymes we established that K_m for hArg in the reaction catalyzed by AGAT towards the formation of guanidinoacetic acid is 12.0 ± 1.1 mM. In reactions catalyzed by both types of arginase activity against hArg, unlike arginine, was not detected.

Conclusions. Thus, the present study established that hArg may be considered as a substrate of AGAT additionally to nitric oxide synthases. Metabolic value of hArg, in addition to regulation of vascular tone, can be associated with cell energy metabolism. According to our data a decrease of hArg blood levels in cardiovascular diseases appears to be unrelated to a detectable increase of arginase activity.

Key words: homoarginine, arginine:glycine amidinotransferase, arginase, creatine, guanidinoacetic acid.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The work is supported by the RFBR grant No. 15-04-02480.

Received 23.03.2017

Accepted 06.02.2018

Alekseevskaya Elizaveta S., Researcher, Biochemistry Department, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher, Proteomics Group, V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation.

Subbotina Tatiana F., DM, Professor, Head of the Biochemistry Laboratory, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation; Leading Researcher of Proteomics Group, V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation.

Zhloba Aleksandr A., DM, Professor, Head of the Biochemistry Department, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation; Leading Researcher and Head of the Proteomics Group, V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation.

(✉) Alekseevskaya Elizaveta S., e-mail: alizlex@mail.ru.

УДК 616.858-073.43

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-15-23

Для цитирования: Байбородина И.В., Завадовская В.Д., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Фетисова Т.В., Яжинова В.Н., Очинова Т.Д., Даниленко А.В., Басанова А.В., Зангеева Л.А. Транскраниальная сонография при болезни Паркинсона. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 15–23.

Транскраниальная сонография при болезни Паркинсона

Байбородина И.В.¹, Завадовская В.Д.², Жукова Н.Г.², Жукова И.А.², Фетисова Т.В.¹, Яжинова В.Н.¹, Очинова Т.Д.³, Даниленко А.В.¹, Басанова А.В.¹, Зангеева Л.А.¹

¹ Клинико-диагностический центр «РИТМ»

Россия, 670000, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Корабельная, 32/2

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)

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

³ Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко

Россия, 670031, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Павлова, 12

РЕЗЮМЕ

Сложность дифференциальной диагностики болезни Паркинсона на начальных и доклинических стадиях требует поиска информативных, инструментальных методов исследования. Наряду с магнитно-резонансной томографией в последние годы для диагностики болезни Паркинсона большое внимание уделяется ультразвуковому исследованию, в частности транскраниальной сонографии (ТКС), состояния черной субстанции головного мозга. Несмотря на широкое обсуждение результатов ультразвукового исследования при болезни Паркинсона, остаются дискуссионными вопросы динамики феномена гиперэхогенности черной субстанции в зависимости от клинических форм и стадии заболевания.

Целью настоящего исследования является изучение вариантов изменений черной субстанции головного мозга по данным ТКС у пациентов с болезнью Паркинсона в зависимости от клинической формы и стадии заболевания.

Материалы и методы. Обследованы 100 пациентов с болезнью Паркинсона методом ТКС через височное окно с применением ультразвукового сканера Toshiba Aplio 500 (Япония) с помощью секторного датчика с частотой 2,5 МГц.

Результаты. Выявлено, что асимметричный вариант изменений черной субстанции превалировал в каждой клинической группе больных и чаще регистрировался при акинетико-ригидной форме, наибольшие изменения наблюдали во II и III стадии болезни.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, транскраниальная сонография, черная субстанция.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона – это наиболее распространенное хроническое нейродегенеративное заболевание с преимущественным поражением чер-

ной субстанции головного мозга, приводящее к дефициту дофамина и характеризующееся выраженным двигательным дефицитом и нарастающей инвалидизацией [1]. Вопросы диагностики болезни Паркинсона на сегодняшний день не утратили своего значения и продолжают оставаться в центре внимания врачей различных специальностей.

✉ Байбородина Ирина Васильевна, e-mail: i.baiborodina@mail.ru.

Ведущим методом визуализации структур головного мозга является магнитно-резонансная томография (МРТ). Исследование структур головного мозга, таких как скорлупа, средний мозг и мост, проводится в основном для дифференциальной диагностики болезни Паркинсона с различными вариантами паркинсонизма-плюс – мультисистемной атрофией и прогрессирующим надъядерным параличом.

Ультразвуковому исследованию структур головного мозга уделяется все больше внимания при различных нозологических формах с преимущественным вовлечением центральной нервной системы, в частности при таком тяжелом дегенеративном заболевании, как болезнь Паркинсона. В последние годы получила научный и практический интерес транскраниальная сонография (ТКС). Среди всех современных и неинвазивных методов диагностики ультразвуковое исследова-

ние прочно вошло в арсенал методов лучевого исследования морфологических изменений при болезни Паркинсона. Физические принципы ТКС, основанные на отражении ультразвуковых волн от неоднородных структур, обладающих различным акустическим сопротивлением (В-режим), позволяют выявлять характерные изменения черной субстанции, шва мозга, базальных ганглиев, ядер мозжечка [2–4].

Исследование выполняют через височное окно. Структуры мозга, базальные ганглии и желудочки визуализируются в трех стандартных плоскостях сканирования. Обследование начинают с аксиальной плоскости параллельно линии, проведенной от наружного угла глаза до наружного слухового отверстия. В этой плоскости средний мозг визуализируется в виде бабочки, окруженной экзогенными базальными цистернами (рис. 1).

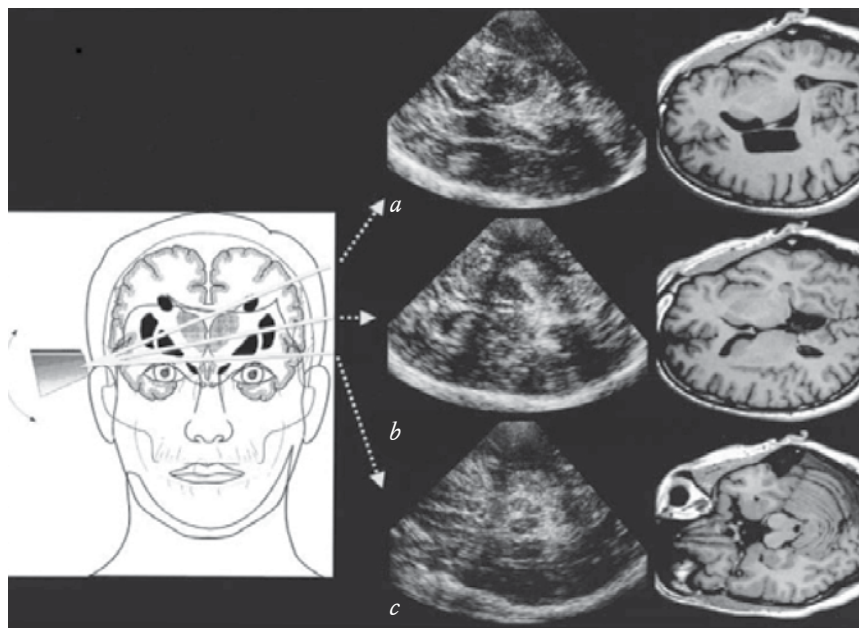


Рис. 1. Транскраниальные сонографические изображения в зависимости от плоскости исследования: а–с (Diagnosis and treatment of Parkinson disease. Abdul Qayyum Rana, 2011; 8)

Fig. 1. Transcranial sonographic images depending on the area of study: а–с (Diagnosis and treatment of Parkinson disease. Abdul Qayyum Rana, 2011; 8)

В плоскости сканирования среднего мозга оценивается черная субстанция одноименной стороны, которая в норме имеет низкую экзогенность и не отличается по ультразвуковым параметрам от окружающего вещества мозга. При болезни Паркинсона в области ножек среднего мозга гиперэхогенность черной субстанции может выглядеть в виде пятна или полосы. При выявлении гиперэхогенности данную область обводят курсором вручную, при этом площадь рассчиты-

вается автоматически (рис. 2). Структура описывается как гиперэхогенная, если яркость данного участка превышает нормальные значения, которые были получены в популяционных исследованиях, а площадь участка составляет более 20 мм².

При проведении многочисленных независимых исследований выявлено, что гиперэхогенность регистрируется более чем в 90% случаев при болезни Паркинсона, тогда как в контрольной группе

гиперэхогенность была выявлена в 10% случаев [5]. Причины гиперэхогенности при болезни Паркинсона окончательно неизвестны. G. Becker и J. Seufferl (2013) [6] считают, что гиперэхогенность появляется при повышенном содержании железа,

что подтверждается экспериментальными работами на животных, посмертными исследованиями у людей, а также данными специального режима МРТ головного мозга, способного к детекции железа [6–8].

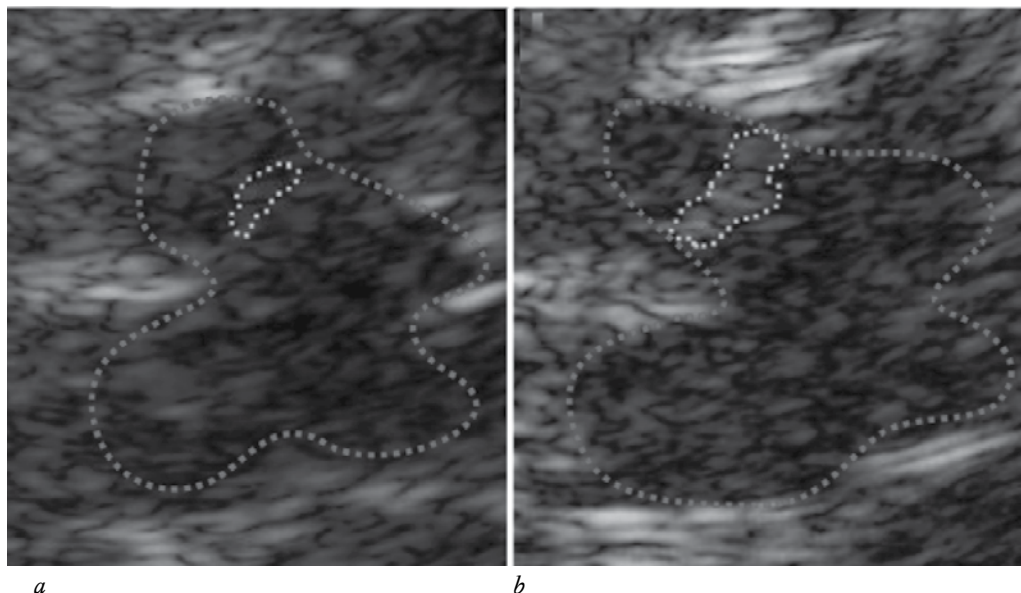


Рис. 2. Транскраниальная сонография В-режима среднего мозга (фиолетовая пунктирная линия). Контрольное исследование показывает меньшую площадь гиперэхогенности (белая пунктирная линия) в черной субстанции (а) по сравнению с заметно повышенной гиперэхогенностью у пациентов с болезнью Паркинсона (b) (Diagnosis and treatment of Parkinson disease. Abdul Qayyum Rana, 2011; 264)

Fig. 2. Transcranial B-Mode sonography of the midbrain (purple dotted line). Controls show little to no hyperechogenicity (white dotted line) in the substantia nigra (a) as compared to markedly increased hyperechogenicity in iPD patients (b) (Diagnosis and treatment of Parkinson disease. Abdul Qayyum Rana, 2011; 264)

В ряде работ отечественных и зарубежных авторов было показано, что феномен гиперэхогенности черной субстанции является статичным и неизменяющимся маркером болезни Паркинсона и не зависит от длительности заболевания и тяжести клинической картины, а также не отражает прогрессирования заболевания [9–14]. Однако в данных работах нет анализа состояния черной субстанции в зависимости от возраста пациента и клинических форм болезни Паркинсона.

Е.Ю. Федотова и соавт. (2010) считают, что гиперэхогенность черной субстанции – это не только отражение текущего нейродегенеративного процесса при болезни Паркинсона, но и маркер определенного «нигрального неблагополучия», особого физико-химического состояния черной субстанции среднего мозга, характеризующегося повышенной склонностью к окислительному повреждению дофаминпродуцирующих нейронов [15].

Ряд исследователей утверждают, что поздняя стадия болезни Паркинсона характеризуется

особенно высокой частотой феномена гиперэхогенности черной субстанции (98%) и независимостью этого маркера по отношению к клиническим проявлениям. При ранней стадии болезни Паркинсона феномен гиперэхогенности черной субстанции встречается реже (80%), а площадь гиперэхогенной зоны зависит от прогрессирования заболевания [16–21]. Однако в проведенных ранее работах нет четких данных динамики феномена гиперэхогенности в зависимости от клинических форм и стадий заболевания. Кроме того, особый интерес представляет изучение морфологических изменений головного мозга у пациентов с болезнью Паркинсона в зависимости от получаемого лечения, адекватности и своевременности его назначения.

Цель настоящего исследования – изучение вариантов изменений черной субстанции головного мозга по данным ультразвукового исследования у пациентов с болезнью Паркинсона в зависимости от клинической формы и стадии заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 100 человек с клинически верифицированным диагнозом «болезнь Паркинсона», из которых 61 (61%) – женщины и 39 (39%) – мужчины. Возраст обследуемых 30–80 лет, средний возраст составил 63 года. Все пациенты находились на обследовании и лечении в Консультативно-диагностическом центре «РИТМ», г. Улан-Удэ.

Критерии включения в исследование:

- мужчины и женщины в возрасте от 30 до 80 лет включительно с верифицированным диагнозом «болезнь Паркинсона»;

- наличие подписанного информированного согласия.

Критерии исключения из исследования:

- отсутствие у пациента височного окна визуализации для проведения ТКС и транскраниального дуплексного сканирования;

- отказ пациента от участия в исследовании.

В зависимости от клинических проявлений все пациенты были распределены следующим образом: 35 (35%) – с акинетико-ригидной формой заболевания, 32 (32%) – дрожательной и 33 (33%) – смешанной (акинетико-ригидно-дрожательной). Анализ тяжести состояния пациентов по шкале Хен и Яра показал, что 15 (15%) обследуемых были с I стадией, 54 (54%) – со II и 31 (31,3%) – с III стадией. Пациентов с IV стадией заболевания по шкале Хен и Яра в нашем исследовании не было.

Всем пациентам проводили ТКС через височное окно с помощью цифровой диагностической ультразвуковой системы Toshiba Aplio 500 (Toshiba Medical Systems Corporation, Япония) с использованием секторного датчика 2–2,5 мГц. В работе на данном сканере применялись дополнительные опции (Precision Imaging ApliPure™ + дифференциальная тканевая гармоника Speckle Reduction), которые при проведении ТКС способствуют точному определению границ измененной черной субстанции, повышая тем самым диагностическую ценность метода. Для анализа изменений черной субстанции учитывали характер ее

изменения (увеличение или уменьшение) в зависимости от стадии заболевания.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistica for Windows. Проверку на нормальность распределения данных осуществляли по критерию согласия Шапиро – Уилка. Математическую обработку результатов для данных, подчиняющихся нормальному закону распределения данных (возраст пациентов), проводили с использованием описательных статистик: среднее значение M и стандартное отклонение σ . Качественные данные были представлены в виде абсолютных и относительных частот. Для сравнения данных представленных частот применяли критерий χ^2 . В качестве критерия достоверности различий в выборках малого размера использовали точный критерий Фишера. Для всех видов статистического анализа различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении ТКС структур головного мозга пациентов с болезнью Паркинсона были выделены два эхографических варианта площади черной субстанции: 1) симметричный, когда феномен гиперэхогенности одинаково увеличен как справа, так и слева (площадь более 20 мм²), либо разница площадей составляет не более 10% и имеет одинаковую интенсивность гиперэхогенного сигнала от черной субстанции; 2) асимметричный, когда феномен гиперэхогенности превышает площадь 20 мм² на одной из сторон и имеет различную интенсивность гиперэхогенного сигнала от черной субстанции.

Все пациенты были разделены на подгруппы в зависимости от варианта эхографического изменения площади черной субстанции (симметричный, асимметричный и норма).

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, нормальный эхографический вариант черной субстанции выявлен лишь в 28,1% случаев и чаще

Т а б л и ц а 1

Эхографические варианты изменений черной субстанции при разных клинических формах заболевания, n (%)			
Клиническая форма	Симметричный эхографический вариант, $n = 14$	Асимметричный эхографический вариант, $n = 71$	Черная субстанция не изменена, $n = 15$
Смешанная, $n = 33$	10 (30,3)	20 (60,6)	3 (9,1)
Акинетико-ригидная, $n = 35$	4 (11,4)	28 (80,0)	3 (8,6)
Дрожательная, $n = 32$	0 (0)	23 (71,9)	9 (28,1)

П р и м е ч а н и е. n – число обследованных больных в группе; $\chi^2 = 17,223$; $p = 0,002$.

был зафиксирован при дрожательной форме болезни Паркинсона.

При ТКС чаще (70,7%) регистрировали асимметричный вариант патологии черной субстанции, значительно реже (14,1%, что в пять раз меньше) – симметричный вариант.

Асимметричный вариант изменений черной субстанции превалировал в каждой клинической группе больных и чаще регистрировался при акинетико-ригидной форме (80% случаев), при дрожательной – несколько реже, в 71,9% случаев, и смешанной – в 60,6%, тогда как симметричный эхографический вариант изменений в черной субстанции чаще встречался при смешанной форме (30,3%) и реже – при акинетико-ригидной (11,4 %). Ни одного случая симметричного варианта черной субстанции при ТКС не зафиксировали при дрожательной форме болезни Паркинсона. Полученные данные могут говорить о возможном более благоприятном течении дрожательной формы болезни Паркинсона, а асимметричность клинических проявлений является патогномоничным симптомом болезни, что подтверждается морфологическими данными.

Следующим этапом исследования был анализ эхографических данных в зависимости от

стадии заболевания по шкале Хен и Яра. Проанализированные данные (табл. 2) позволяют сделать вывод, что у большинства пациентов с I стадией заболевания эхографическая картина черной субстанции была не изменена (73,3%); в единичных случаях зафиксировали ее изменение по симметричному типу у 6,7% пациентов и по асимметричному – у 20%.

При более тяжелых стадиях (II и III) болезни Паркинсона по шкале Хен и Яра отмечается преобладание пациентов с измененной эхографической картиной черной субстанции и в единичных случаях – без патологии. Причем чаще регистрировали асимметричную эхографическую форму черной субстанции (88,9% больных на II стадии, 64,5% – на III стадии) и значительно реже – симметричную (9,3% больных на II стадии и 22,6 % – на III стадии).

Далее было проанализировано состояние черной субстанции на различных стадиях заболевания с учетом клинических форм. Как следует из данных (табл. 3), при всех клинических формах заболевания преобладали пациенты со II стадией (при акинетико-ригидной – 38,9%, смешанной форме – 37%). При дрожательной форме заболевания преобладали пациенты с I стадией заболевания (53,3%).

Т а б л и ц а 2

Изменения черной субстанции в зависимости от стадии заболевания по шкале Хен и Яра, n (%)			
Стадия	Симметричная эхографическая форма, n = 14	Асимметричная эхографическая форма, n = 71	Нет изменений в черной субстанции, n = 15
I стадия, n = 15	1 (6,7)	3 (20,0)	11 (73,3)
II стадия, n = 54	5 (9,3)	48 (88,9)	1 (1,8)
III стадия, n = 31	7 (22,6)	20 (64,5)	4 (12,9)

П р и м е ч а н и е. n – число обследованных больных; $\chi^2 = 51,343$; $p = 0,001$.

Т а б л и ц а 3

Распределение больных с болезнью Паркинсона в зависимости от стадии заболевания по шкале Хен и Яра с учетом клинических форм, n (%)			
Стадия	Смешанная форма, n = 33	Акинетико-ригидная форма, n = 35	Дрожательная форма, n = 32
I стадия, n = 15	3 (20)	4 (26,7)	8 (53,3)
II стадия, n = 54	20 (37)	21 (38,9)	13 (24,1)
III стадия, n = 31	10 (32,2)	10 (32,2)	11 (35,6)

П р и м е ч а н и е. n – число обследованных больных в группе; $\chi^2 = 4,325$; $p = 0,364$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют предположить, что на более тяжелых стадиях болезни происходит наибольшее накопление железа в черной субстанции, что ведет к увеличению ее размеров и, соответственно, возможности ее визуализации. Превалирование асимметричной эхографической формы болезни Паркинсона еще раз подтверждает асимметричность клинических проявлений, что является патогномоничным симптомом болезни.

Таким образом, на основании проведенного исследования эхографической картины черной субстанции у 100 пациентов с болезнью Паркинсона было показано, что наибольшее число обследуемых на всех стадиях заболевания имели асимметричный эхографический тип изменений черной субстанции, что согласуется с асимметричностью клинических проявлений, которые являются характерными для болезни. Реже изменения черной субстанции регистрировали при дрожательной форме болезни Паркинсона, что может говорить о наиболее благоприятном течении дрожательного варианта заболевания. Максимальные изменения эхографической картины черной субстанции отмечены у пациентов со II стадией (смешанная и акинетико-ригидная формы) по шкале Хен и Яра и с I стадией (дрожательная форма), что может свидетельствовать о более медленном прогрессировании заболевания при дрожательной форме болезни Паркинсона.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

И.В. Байбородина – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. В.Д. Завадовская, Н.Г. Жукова, И.А. Жукова – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Т.В. Фетисова, В.Н. Яжинова, Т.Д. Очирова, А.В. Даниленко, А.В. Басанова, Л.А. Зангеева – разработка концепции и дизайна исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование профинансировано Обществом с ограниченной ответственностью «Доктор «РИТМ», Республика Бурятия, г. Улан-Удэ.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Все участники исследования подписывали добровольное информированное согласие, одобренное этическим

комитетом СибГМУ (дата заседания 31.10.2016 г. Регистрационный номер – 4962).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Жукова И.А., Жукова Н.Г., Ижболдина О.П., Никитина М.А., Алифирова В.М. Анализ методов оценки обоняния у пациентов с болезнью Паркинсона. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Неврология и психиатрия пожилого возраста. 2015; 2: 47–52. [Zhukova I.A., Zhukova N.G., Izhboldina O.P., Nikitina M.A., Alifirova V.M. Analysis of methods for assessing olfaction in patients with Parkinson's disease. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. *Neurologiya i psikiatriya pozhilogo vozrasta – Journal of Neurology and Psychiatry*. S.S. Korsakov. *Neurology and psychiatry of advanced age*. 2015; 2: 47–52 (in Russ.)].
2. Becker C., Berg D. Neuroimaging in basal ganglia disorders: Perspectives for transcranial ultrasound. *Mov. Disord.* 2001; 16: 23–32.
3. Berg D., Godau J., Walter U. Transcranial sonography in movement disorders. *Lancet Neurol.* 2008; 7: 1044–1055.
4. Puts I., Berg D., Maeurer M. Transcranial sonography of the brain parenchyma: Comparison of B-mode imaging and tissue harmonic imaging. *Ultrasound. Med. Biol.* 2000; 26: 189–194.
5. Berg D., Hochstrasser H. Iron metabolism in parkinsonian syndromes. *Mov. Disord.* 2011; 21: 1299–1310.
6. Beck G., Seufferl J., Bogdahn U. Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology*. 2013; 45: 182–184.
7. Lyoo C.H., Ryu Y.H., Lee M.S.J. Cerebral cortical areas in which thickness correlates with severity of motor deficits of Parkinson's disease. *Neurology*. 2011; 258: 1871–1876.
8. Труфанов А.Г., Литвиненко И.В., Воронков Л.В., Рамешвили Т.Е. Деменция при болезни Паркинсона: роль атрофических изменений коры и возможности прогноза с помощью магнитно-резонансной морфометрии. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2012; 3: 116–123. [Trufanov A.G., Litvinenko I.V., Voronkov L.V., Rameshvili T.E. Dementia in Parkinson's disease: the role of atrophic cortical changes and the possibility of prognosis with the help of magnetic resonance morphometry. *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii – Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2012; 3: 116–123 (in Russ.)].
9. Чететкин А.О. Транскраниальное ультразвуковое сканирование мозга при болезни Паркинсона. Визуализация в клинике. 2000; 17: 45–48. [Chechetkin A.O. Transcranial ultrasound scanning of the brain in Parkinson's disease. Visualization in the clinic. *Vizualizatsiya v klinike – Visualization in the clinic*. 2000; 17: 45–48 (in Russ.)].
10. Berg D., Behnke S., Walter U. Application of transcranial Sonography in extrapyramidal disorder: Updated Recommendation. *Ultraschall Med.* 2009; 27: 12–19.

11. Becker C., Berg D. Neuroimaging in basal ganglia disorders: Perspectives for transcranial ultrasound. *Mov. Disord.* 2011; 16: 23–32.
12. Berg D., Roggendorf W., Schroeder U. Echogenicity of the substantia nigra: Association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch. Neurol.* 2002; 59: 999–1005.
13. Morrish P.K., Sawle G.V., Brooks D.J. An 18F-dopa PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain.* 1996; 119: 223–591.
14. Berg D. Disturbances of iron metabolism as a contributing factor to SN hyperechogenicity in Parkinson's disease: implications for idiopathic and monogenetic forms. *Neurogenet. Res.* 2010; 32: 1646–1654.
15. Федотова Е.Ю., Четкин А.О., Шадрин М.И. Транскраниальная сонография при болезни Паркинсона. *Журнал неврологии и психиатрии.* 2011; 111: 49–55. [Fedotova E.Yu., Chechetkin A.O., Shadrin M.I. Transcranial sonography in Parkinson's disease. *Zhurnal nevrologiya i psikiatriya – Journal of Neurology and Psychiatry.* 2011; 111: 49–55 (in Russ.)].
16. Голубев В.А., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М.: МЕДпресс-Информ, 2010: 416. [Golubev V.L., Levin Ya.I., Vein A.M. Parkinson's disease and Parkinson's syndrome. M.: MEDpress-Inform Publ., 2010: 416 (in Russ.)].
17. Razdorskaya V.V., Yudina G.K., Voskresenskaya O.N. Clinical efficiency of symptomatic therapy of an atypical variant of hemiparkinsonism-hemiatrophy. 15 Congress of the European Federation of Neurological Societies EFNS, 2011: 522.
18. Berg D., Siefker C., Becker G. Echogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease and its relation to clinical findings. *J. Neurol.* 2001; 8: 429–433.
19. Юдина В.В., Воскресенская О.Н., Юдина Г.К. Особенности постинсультного варианта сосудистого паркинсонизма. Актуальные вопросы практической нейрохирургии: материалы юбилейной научно-практической конференции. Балаково, 2009: 172–174. [Yudina V.V., Voskresenskaya O.N., Yudina G.K. Peculiarities of post-stroke variant of vascular parkinsonism. Actual questions of practical neurosurgery: materials of the jubilee scientific and practical conference. Balakovo, 2009: 172–174 (in Russ.)].
20. Berg D., Behnke S., Walter U. Application of transcranial Sonography in extrapyramidal disorder: Updated Recommendation. *Ultraschall. Med.* 2009; 27: 12–19.
21. Berg D., Roggendorf W., Schroeder U. Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch. Neurol.* 2012; 59: 999–1050.

Поступила в редакцию 03.04.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Байбородина Ирина Васильевна, врач ультразвуковой диагностики, зав. отделением ультразвуковой диагностики, Консультативно-диагностический центр «РИТМ», г. Улан-Удэ, Республика Бурятия.

Завадовская Вера Дмитриевна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой лучевой диагностики и лучевой терапии, СибГМУ, г. Томск.

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

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

Фетисова Татьяна Вячеславовна, врач-невролог, Консультативно-диагностический центр «РИТМ», г. Улан-Удэ, Республика Бурятия.

Яжинова Вера Нимажаповна, врач-невролог, Консультативно-диагностический центр «РИТМ», г. Улан-Удэ, Республика Бурятия.

Очирова Татьяна Дашиева, врач-невролог, Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия.

Даниленко Андрей Викторович, врач-невролог, Консультативно-диагностический центр «РИТМ», г. Улан-Удэ, Республика Бурятия.

Басанова Анна Васильевна, гл. врач, Консультативно-диагностический центр «РИТМ», г. Улан-Удэ, Республика Бурятия.

Зангеева Леанора Александровна, генеральный директор Консультативно-диагностического центра «РИТМ», г. Улан-Удэ, Республика Бурятия.

(✉) **Байбородина Ирина Васильевна**, e-mail: i.baiborodina@mail.ru

УДК 616.858-073.43

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-15-23

For citation: Bayborodina I.V., Zavadovskaya V.D., Zhukova N.G., Zhukova I.A., Fetisova T.V., Yazhinova V.N., Ochirova T.D., Danilenko A.V., Basanova A.V., Zangeeva L.A. Transcranial sonography in Parkinson's disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 15–23.

Transcranial sonography in Parkinson's disease

Bayborodina I.V.¹, Zavadovskaya V.D.², Zhukova N.G.², Zhukova I.A.², Fetisova T.V.¹, Yazhinova V.N.¹, Ochirova T.D.³, Danilenko A.V.¹, Basanova A.V.¹, Zangeeva L.A.¹

¹ Clinical Diagnostic Center (CDC) "RITM"

32/2, Str. Korabelnaya, Ulan-Ude, Republic of Buryatia, 670000, Russian Federation

² Siberian State Medical University (SSMU)

2, Moscow Tract, 634050, Tomsk, Russian Federation

³ Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko

12, Pavlova Str., Ulan-Ude, Republic of Buryatia, 670031, Russian Federation

ABSTRACT

Despite a broad discussion of the results of ultrasound in Parkinson disease, the dynamics of hyperechogenicity of the substantia nigra based on the clinical forms and stages of the disease remains controversial.

The purpose of this study is to study the changes in the substantia nigra of the brain based on the clinical form and stage using an ultrasound in patients with Parkinson's disease.

Materials and methods. The study involved 100 patients with Parkinson's disease whom were scanned using transcranial sonography through the temporal window with the use of ultrasound scanner Toshiba Aplio 500 (Japan) with a sector transducer with a frequency of 2,5 mGz.

Results. It was found that the asymmetric variant of changes in the black substance prevailed in each clinical group of patients and was more often recorded with akinetic-rigid form and the greatest changes were observed in the stages II and III of the disease.

Key words: Parkinson's disease, transcranial sonography, substantia nigra.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The study was financed by the Limited Liability Company "Doctor RITM", Republic of Buryatia, Ulan-Ude.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

All participants of the study signed voluntary informed consent, approved by the ethics committee of the Siberian State Medical University (date of meeting on October 31, 2016. Registration number – 4962).

Received April 03.2017
Accepted February 06.2018

Bayborodina Irina V., Doctor of Ultrasonic Diagnostics, Head of the Department of Ultrasound Diagnostics, CDC "RITM", Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation.

Zavadovskaya Vera D., DM, Professor, Head of the Department of Radiation Diagnosis and Radiotherapy, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Zhukova Natalia G., DM, Professor, Department of Neurology and Neurosurgery, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Zhukova Irina A., PhD, Associate Professor, Department of Neurology and Neurosurgery, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Fetisova Tatiana V., Neurologist, CDC "RITM", Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation.

Yazhinova Faith N., Neurologist, Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko, "RITM", Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation.

Ochirova Tatiana D., Neurologist, Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko, "RITM", Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation.

Danilenko Andrey V., Neurologist, Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko, "RITM", Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation.

Basanova Anna V., Chief Doctor, Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko, "RITM", Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation.

Zangeeva Leanora A., General Director of the Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko, "RITM", Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation.

(✉) **Bayborodina Irina V.**, e-mail: i.baiborodina@mail.ru.

УДК 616.284-002.2/.3-06:575.174.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-24-35

Для цитирования: Байке Е.В., Уразова О.И. Цитокиновый профиль крови в зависимости от полиморфизма генов цитокинов у больных хроническим гнойным средним отитом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 24–35.

Цитокиновый профиль крови в зависимости от полиморфизма генов цитокинов у больных хроническим гнойным средним отитом

Байке Е.В.^{1, 2}, Уразова О.И.²

¹ Читинская государственная медицинская академия (ЧГМА)
Россия, 672090, г. Чита, ул. Горького, 39а

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

РЕЗЮМЕ

Цель — выявить особенности изменений соотношения цитокинов IL-1β, IL-6, TNF-α и IL-10 в крови в зависимости от полиморфизма генов *IL1B*, *IL6*, *TNFA* и *IL10* при разных клинических формах хронического гнойного воспаления среднего уха в стадии обострения до и на 10-е сут лечения.

Материалы и методы. Обследованы 299 пациентов (129 мужчин и 170 женщин) с хроническим гнойным средним отитом (ХГСО): 146 с туботимпанальной формой и 153 с эптитимпано-антральной формой. Группу контроля составили 183 относительно здоровых донора, сопоставимых с больными ХГСО по полу и возрасту. Геномную ДНК выделяли из крови стандартным методом и анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Концентрацию цитокинов IL-1β, IL-6, TNF-α и IL-10 в крови измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа до и через 10 сут лечения. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., США). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты. У больных ХГСО повышение концентрации IL-1β, IL-6 и TNF-α в крови варьирует в зависимости от носительства полиморфных вариантов их генов (*IL1B* в локусах -3953, -511, -31, *IL6* в локусе -174 и *TNFA* в локусе -308) и клинической формы заболевания. Концентрация IL-10 в крови в большей степени зависит от полиморфизма гена *IL10* (в локусах -1082, -592), чем от клинической формы заболевания. Сочетанное увеличение концентрации IL-10 и провоспалительных цитокинов до начала и на 10-е сут лечения у больных с туботимпанальной и эптитимпано-антральными формами ХГСО, являющихся носителями «высокопродуктивных» аллелей полиморфных вариантов генов *IL1B*, *IL6* и *TNFA*, свидетельствует о генетической предрасположенности к гиперергическому течению воспаления.

Ключевые слова: цитокины, полиморфизм, хронический гнойный средний отит.

ВВЕДЕНИЕ

Важная роль в определении характера течения патологического процесса и развитии реакций иммунологической защиты в ответ на

внедрение патогенов при инфекционно-воспалительных заболеваниях отводится медиаторам — цитокинам. Индивидуальные различия в продукции медиаторов воспаления и зависящей от них реактивности организма определяются многими факторами, в том числе полиморфизмом генов. В зависимости от носительства отдельных генов

✉ Байке Елена Викторовна, e-mail: elenabayke@yandex.ru.

типов полиморфных вариантов генов и их комбинаций, ассоциированных с высоким или низким уровнем образования кодируемых белковых продуктов, вовлеченных в патогенез воспаления, характер ответа на флогген проявляется по провоспалительному или противовоспалительному типам [1]. Вместе с этим зависящие от экспрессии генов изменения синтеза и секреции цитокинов являются одной из причин повышенной чувствительности организма к болезнетворным факторам инфекционно-воспалительной природы, обуславливают предрасположенность к развитию и клинической манифестации многих мультифакторных заболеваний в условиях аддитивного действия главного и других (предполагающих и способствующих) этиологических факторов [2, 3]. Хронический гнойный средний отит (ХГСО) в данном аспекте не является исключением, однако данные литературы относительно роли полиморфизма иммунорегуляторных генов в его развитии (как причинного, или триггерного, фактора), патогенезе и вариабельности клинического течения заболевания носят фрагментарный характер.

Цель исследования – выявить особенности изменений соотношения цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α и IL-10 в крови в зависимости от полиморфизма генов *IL1B*, *IL6*, *TNFA* и *IL10* при разных клинических формах хронического гнойного воспаления среднего уха в стадии обострения до и на 10-е сут лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 299 пациентов (129 (43,1%) русских мужчин и 170 (56,9%) русских женщин в возрасте $(38,0 \pm 4,3)$ лет) ЛОР-отделения Краевой клинической больницы г. Читы с хроническим гнойным средним отитом в стадии обострения. Первую группу составили 146 пациентов, страдающих туботимпанальной формой ХГСО (мезотимпанит), вторую – 153 больных с эптитимпано-антральной формой ХГСО (эпитимпанит) с кариозно-деструктивным процессом в среднем ухе.

В контрольную группу были включены 183 здоровых донора – русских жителей Забайкальского края (79 (43,2%) мужчин и 104 (56,8%) женщин в возрасте $(33,2 \pm 2,6)$ лет).

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki (1975), с поправками (2008)).

У всех больных для диагностики ХГСО выполнялись стандартные общеклинические (общий и биохимический анализы крови, общий анализ мочи), бактериологическое (мазок отделяемого из уха для исследования микрофлоры и определения ее чувствительности к антибиотикам) и рентгенологическое исследования. Состояние слуховой функции определялось с помощью акуметрии и тональной пороговой аудиометрии.

При проведении молекулярно-генетического анализа геномную ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (ООО НТП «Литех», г. Москва). С образцом выделенной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров в режиме реального времени (PCR real time). Результаты анализа позволяли дать три типа заключений: нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота.

Измерение концентрации цитокинов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) на момент поступления в стационар и на 10-е сут комбинированного лечения (консервативного и хирургического). Консервативная терапия включала туалет уха, применение антибактериальных (местное) и антигистаминных (пероральное) средств, физиолечение. Хирургические вмешательства на среднем ухе (слухолучшающие операции у пациентов с мезотимпанитом, санирующие операции с элементами реконструкции слуховой цепи у больных с эптитимпанитом) выполнялись под контролем операционного микроскопа, под общей анестезией, с применением как заушного, так и эндаурального (с разрезами по Heermann A и B) подходов.

Полученные данные обрабатывали с помощью пакетов программ BIOSTAT, STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки вероятностей того, что анализируемые выборки принадлежат к генеральным совокупностям с нормальным распределением, использовали критерий Колмогорова – Смирнова. Учитывая нормальное распределение выборочных данных ($p > 0,05$), для их сравнения применяли t -критерий Стьюдента. Для сравнения групп по качественному бинарному признаку использовали критерий χ^2 (Пирсона), при необходимости вводилась поправка Йетса на непрерывность. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди – Вайнберга с помощью критерия χ^2 . Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех пациентов с обострением ХГСО на момент поступления в стационар выявлялось повышение содержания IL-1 β , IL-6, IL-10 и TNF- α в крови сравнительно с показателями у здоровых

доноров ($p < 0,05$). При этом концентрация цитокинов (за исключением IL-10) в сыворотке крови у больных ХГСО варьировала в зависимости от тяжести течения воспалительного процесса в среднем ухе (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Содержание цитокинов в сыворотке крови у здоровых доноров и больных ХГСО до лечения, пг/мл, $M \pm m$				
Группа исследования	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-10
Здоровые доноры, $n = 183$	0	$0,34 \pm 0,13$	$0,61 \pm 0,24$	$0,32 \pm 0,13$
Больные с мезотимпанитом, $n = 146$	$12,42 \pm 0,21$	$4,21 \pm 0,21$ $p_1 < 0,01$	$3,92 \pm 0,35$ $p_1 < 0,01$	$1,41 \pm 0,17$ $p_1 < 0,01$
Больные с эптитимпанитом, $n = 153$	$18,53 \pm 0,29$ $p_2 < 0,01$	$8,03 \pm 0,53$ $p_{1,2} < 0,01$	$6,10 \pm 0,52$ $p_{1,2} < 0,01$	$1,74 \pm 0,09$

П р и м е ч а н и е. Уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров – p_1 , между группами больных с мезотимпанитом и эптитимпанитом – p_2 .

Поскольку изменения медиаторного ответа при воспалении во многом взаимосвязаны с SNP-заменами в ДНК, нами было проанализировано содержание цитокинов в сыворотке крови в зависимости от носительства полиморфных

вариантов генов *IL1B* (в локусах -3953, -511, -31), *IL6* (в локусе -174), *TNFA* (в локусе -308) и *IL10* (в локусах -1082, -819, -592) среди лиц здоровой популяции и у больных ХГСО (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Концентрация цитокинов в крови в зависимости от генотипа полиморфных вариантов генов *IL1B* (C3953T, C511T, T31C), *IL6* (C174G), *TNFA* (G308A) и *IL10* (G1082A, C592A, C819T) у здоровых доноров и больных ХГСО до лечения, пг/мл, $M \pm m$

Концентрация цитокина в зависимости от полиморфизма гена		Здоровые доноры, $n = 183$	Больные с мезотимпанитом, $n = 146$	Больные с эптитимпанитом, $n = 153$
IL-1 β у носителей <i>IL1B</i> C3953T	C/C	0	$14,42 \pm 0,25$	$22,87 \pm 0,36$ $p_2 < 0,001$
	C/T	0	$13,56 \pm 0,22$	$18,21 \pm 0,33$ $p_{2,3} < 0,001$
	T/T	0	$10,01 \pm 0,19$ $p_{3,4} < 0,001$	$14,53 \pm 0,31$ $p_{2,3,4} < 0,001$
IL-1 β у носителей <i>IL1B</i> C511T	C/C	0	$11,82 \pm 0,12$	$17,61 \pm 0,13$ $p_2 < 0,01$
	C/T	0	$14,40 \pm 0,13$ $p_3 < 0,01$	$21,84 \pm 0,19$ $p_{2,3} < 0,001$
	T/T	0	$13,11 \pm 0,15$ $p_3 < 0,001$	$12,21 \pm 0,34$ $p_{3,4} < 0,001$
IL-1 β у носителей <i>IL1B</i> T31C	T/T	$0,16 \pm 0,03$	$7,72 \pm 0,21$ $p_1 < 0,001$	$13,90 \pm 0,15$ $p_{1,2} < 0,01$
	T/C	0	$7,75 \pm 0,21$	$20,42 \pm 0,13$ $p_{2,3} < 0,01$
	C/C	0	$14,43 \pm 0,21$ $p_{3,4} < 0,001$	$32,51 \pm 0,29$ $p_{2,3,4} < 0,001$
IL-6 у носителей <i>IL6</i> C174G	C/C	$0,34 \pm 0,13$	$4,21 \pm 0,21$ $p_1 < 0,001$	$10,09 \pm 0,53$ $p_{1,2} < 0,001$
	C/G	$0,51 \pm 0,21$	$3,62 \pm 0,16$ $p_1 < 0,001$	$6,84 \pm 0,43$ $p_{1,2,3} < 0,001$
	G/G	$0,92 \pm 0,42$	$2,83 \pm 0,12$ $p_{1,3} < 0,001$	$7,42 \pm 0,49$ $p_{1,2,3} < 0,001$

О к о н ч а н и е т а б л. 2

Концентрация цитокина в зависимости от полиморфизма гена		Здоровые доноры, <i>n</i> = 183	Больные с мезотимпанитом, <i>n</i> = 146	Больные с эптитимпанитом, <i>n</i> = 153
TNF-α у носителей <i>TNFA</i> G308A	G/G	0,61 ± 0,24	5,95 ± 0,35 $p_1 < 0,001$	7,11 ± 0,41 $p_1 < 0,001$
	G/A	0,37 ± 0,09	3,41 ± 0,16 $p_{1,3} < 0,001$	5,01 ± 0,34 $p_{1,3} < 0,001$
	A/A	0,06 ± 0,03	2,41 ± 0,09 $p_{1,3} < 0,001$	0
IL-10 у носителей <i>IL10</i> G1082A	G/G	0,57 ± 0,29	2,32 ± 0,34 $p_1 < 0,001$	2,73 ± 0,16 $p_1 < 0,001$
	G/A	0,24 ± 0,12	1,57 ± 0,12 $p_1 < 0,001$	1,68 ± 0,09 $p_1 < 0,001$ $p_3 = 0,034$
	A/A	0,15 ± 0,09	0,53 ± 0,30 $p_3 < 0,001$ $p_4 = 0,001$	0,72 ± 0,22 $p_3 < 0,001$
IL-10 у носителей <i>IL10</i> C592A	C/C	0,36 ± 0,12	0,46 ± 0,21	0,42 ± 0,12
	C/A	0,38 ± 0,16	0,69 ± 0,29	0,57 ± 0,15
	A/A	0,36 ± 0,09	1,26 ± 0,24 $p_1 = 0,001$ $p_3 = 0,012$	0
IL-10 у носителей <i>IL10</i> C819T	C/C	0,41 ± 0,27	0,84 ± 0,25	1,09 ± 0,09
	C/T	0,47 ± 0,12	0,92 ± 0,18	1,32 ± 0,18 $p_1 < 0,001$
	T/T	0,35 ± 0,10	1,37 ± 0,17 $p_1 < 0,001$	1,73 ± 0,31 $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,048$

П р и м е ч а н и е. Уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров – p_1 , между группами больных с мезотимпанитом и эптитимпанитом – p_2 , по сравнению с носителями нормального гомозиготного генотипа – p_3 , по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа – p_4 .

Известно, что местнообразующиеся цитокины в норме в системном кровотоке не обнаруживаются или определяются в чрезвычайно низкой концентрации ввиду короткого периода их полувыведения (около 1,9 мин) [4]. По этой причине при определении модулирующего влияния однонуклеотидных замен в генах *IL1B* (C3953T, C511T, T31C), *IL6* (C174G), *IL10* (G1082A, C592A, C819T) и *TNFA* (G308A) на содержание их белковых продуктов в крови у здоровых лиц значимых различий (в зависимости от генотипа исследуемых полиморфизмов) не обнаруживалось (см. табл. 2).

Вместе с тем при ХГСО у носителей генотипов C/C (полиморфизма C3953T), C/T (полиморфизма C511T) и C/C (полиморфизма T31C) гена *IL1B* содержание IL-1β в сыворотке крови было выше, чем в группах сравнения независимо от клинической формы заболевания (см. табл. 2). Так, у больных мезотимпанитом и эптитимпанитом, являющихся носителями гомозиготного генотипа C/C гена *IL1B* с заменой в локусе -3953, содержание IL-1β в крови было выше на 6,0 и 30,6% и на 20,4 и 36,6% соответственно по сравнению с

его концентрацией у носителей генотипов C/T и T/T полиморфизма C3953T гена *IL1B* в надлежащих группах исследования (см. табл. 2).

У носителей генотипа C/T полиморфизма C511T гена *IL1B* уровень IL-1β в крови в первой клинической группе (больные с мезотимпанитом) оказался на 18,1% выше, чем у больных с генотипом C/C. Во второй клинической группе (больные с эптитимпанитом) такого рода зависимость сохранялась. Содержание IL-1β в крови у больных с гетерозиготным генотипом C/T было на 19,3 и 44,0% выше по сравнению с его концентрацией у обладателей гомозиготных генотипов C/C и T/T полиморфизма C511T гена *IL1B* (см. табл. 2).

Уровень IL-1β в крови у носителей генотипа C/C полиморфизма T31C гена *IL1B* при туботимпанальной форме ХГСО практически в два раза превышал концентрацию цитокина в крови у обладателей других генотипов указанного полиморфизма в данной клинической группе. Содержание IL-1β в сыворотке крови у пациентов с эптитимпано-антральной формой ХГСО, имеющих гомозиготный генотип C/C полиморфизма T31C

гена *IL1B*, было в 2,3 раза выше, чем у носителей генотипа Т/Т, и на 37,1% выше, чем у обладателей генотипа Т/С (см. табл. 2).

Кроме того, концентрация IL-1 β в крови у пациентов с кариозно-деструктивным процессом в среднем ухе при носительстве генотипов С/С (полиморфизма С3953Т гена *IL1B*), С/С (полиморфизма С511Т гена *IL1B*) и Т/С (полиморфизма Т31С гена *IL1B*) была соответственно в 1,6; 1,5 и 2,6 раза выше, чем у больных с мукозным течением ХГСО с соответствующими полиморфизмами гена *IL1B* (см. табл. 2).

Концентрация IL-6 в сыворотке крови у носителей гомозиготного генотипа С/С в полиморфном локусе -174 гена *IL6* превышала таковую у обладателей гомозиготного генотипа G/G на 32,7% в группе больных с мезотимпанитами и на 26,4% в группе больных с эптитимпанитами (см. табл. 2). В последнем случае (у больных с эптитимпанитом) она была также на 32,2% выше, чем у носителей генотипа С/G (см. табл. 2).

Уровень TNF- α в сыворотке крови у больных с мезотимпанитами при носительстве генотипа G/G полиморфизма G308A гена *TNFA* в 1,7 раза превышал концентрацию цитокина у обладателей генотипа G/A и в 2,5 раза – у лиц с генотипом A/A указанного полиморфизма. При этом содержание TNF- α в крови у гомозиготных по аллелю G пациентов с эптитимпанитами было на 29,5% выше, чем у носителей гетерозиготного генотипа G/A полиморфного гена *TNFA* (G308A) в этой же группе исследования (см. табл. 2).

При ХГСО у обладателей генотипа G/G полиморфного варианта G1082A гена *IL10* обеих

клинических групп обнаруживались максимальные концентрации противовоспалительного IL-10 в сыворотке крови. Уровень IL-10 в крови у носителей генотипа A/A в первой группе (с мезотимпанитом) был ниже в 4,3 раза, во второй группе (с эптитимпанитом) – в 3,8 раза относительно такового у носителей генотипа G/G гена *IL10* (G1082A) (см. табл. 2).

У носителей гомозиготного генотипа A/A гена *IL10* в полиморфном локусе -592 в группе больных с мезотимпанитами концентрация IL-10 в крови оказалась в 2,7 раза выше по сравнению с аналогичным показателем у носителей гомозиготного генотипа С/С и в 1,8 раза выше, чем у больных с генотипом С/A полиморфизма С592A гена *IL10* (см. табл. 2).

У обладателей генотипа Т/Т полиморфного варианта С819Т гена *IL10* содержание IL-10 в крови было статистически значимо выше (на 36,9%) сравнительно с его значением у носителей генотипа С/С гена только во второй клинической группе, в то время как в первой группе (у больных с мезотимпанитом) концентрация цитокина в сыворотке крови у носителей гомозиготных (нормального и мутантного) и гетерозиготного генотипов была сопоставимой (см. табл. 2).

На 10-е сут комбинированного лечения выявлялось однонаправленное увеличение содержания IL-1 β , IL-6, TNF- α и IL-10 в крови у пациентов с одонуклеотидными полиморфизмами генов *IL1B* (С3953Т, Т511С, Т31С), *IL6* (С174G), *TNFA* (G308A) и *IL10* (G1082A, С592A, С819Т) в обеих клинических группах (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Концентрация цитокинов в крови в зависимости от генотипа полиморфных вариантов генов *IL1B* (С3953Т, С511Т, Т31С), *IL6* (С174G), *TNFA* (G308A) и *IL10* (G1082A, С592A, С819Т) у здоровых доноров и больных ХГСО на 10-е сут после лечения, пг/мл, $M \pm m$

Концентрация цитокина в зависимости от полиморфизма гена		Здоровые доноры, $n = 183$	Больные с мезотимпанитом, $n = 146$	Больные с эптитимпанитом, $n = 153$
IL-1 β у носителей <i>IL1B</i> С3953Т	С/С	0	$16,48 \pm 0,18$ $p_3 < 0,001$	$29,37 \pm 0,34$ $p_{2,5} < 0,001$
	С/Т	0	$15,67 \pm 0,18$ $p_3 < 0,001$	$22,28 \pm 0,21$ $p_{2,3,5} < 0,001$
	Т/Т	0	$12,34 \pm 0,18$ $p_{3,4,5} < 0,001$	$16,31 \pm 0,18$ $p_{2,3,4,5} < 0,001$
IL-1 β у носителей <i>IL1B</i> С511Т	С/С	0	$12,74 \pm 0,11$ $p_3 < 0,001$	$18,81 \pm 0,13$ $p_{2,5} < 0,001$
	Т/С	0	$15,32 \pm 0,09$ $p_{3,5} < 0,001$	$24,59 \pm 0,21$ $p_{2,3,5} < 0,001$
	Т/Т	0	$13,49 \pm 0,08$ $p_3 = 0,003$ $p_4 < 0,001$	$14,53 \pm 0,17$ $p_{3,4,5} < 0,001$

О к о н ч а н и е т а б л . 2

Концентрация цитокина в зависимости от полиморфизма гена		Здоровые доноры, <i>n</i> = 183	Больные с мезотимпанитом, <i>n</i> = 146	Больные с эпитимпанитом, <i>n</i> = 153
IL-1β у носителей <i>IL1B</i> T31C	T/T	0,1 ± 0,03	8,34 ± 0,11 $p_1 < 0,001$ $p_5 = 0,019$	15,81 ± 0,21 $p_{1,2,5} < 0,001$
	T/C	0	8,23 ± 0,31	23,16 ± 0,26 $p_{2,3,5} < 0,001$
	C/C	0	14,88 ± 0,16 $p_{3,4} < 0,001$	34,24 ± 0,35 $p_{2,3,4,5} < 0,001$
IL-6 у носителей <i>IL6</i> C174G	C/C	0,34 ± 0,13	4,54 ± 0,07 $p_1 < 0,001$	12,46 ± 0,34 $p_{1,2,5} < 0,001$
	C/G	0,51 ± 0,21	4,12 ± 0,13 $p_1 < 0,001$ $p_5 = 0,041$	8,73 ± 0,31 $p_{1,2,3,5} < 0,001$
	G/G	0,92 ± 0,42	3,59 ± 0,08 $p_{1,5} < 0,001$ $p_4 = 0,028$ $p_5 = 0,003$	9,24 ± 0,39 $p_{1,2,3,5} < 0,001$
TNF-α у носителей <i>TNFA</i> G308A	G/G	0,61 ± 0,24	6,54 ± 0,19 $p_1 < 0,001$ $p_5 = 0,019$	8,16 ± 0,42 $p_{1,2,5} < 0,001$
	G/A	0,37 ± 0,09	4,58 ± 0,13 $p_{1,3,5} < 0,001$	6,67 ± 0,29 $p_{1,3,5} < 0,001$
	A/A	0,06 ± 0,03	3,68 ± 0,04 $p_{1,3,4,5} < 0,001$	0
IL-10 у носителей <i>IL10</i> G1082A	G/G	0,57 ± 0,3	3,42 ± 0,11 $p_{1,5} < 0,001$	3,74 ± 0,09 $p_{1,5} < 0,001$
	G/A	0,24 ± 0,12	2,96 ± 0,23 $p_{1,5} < 0,001$	2,52 ± 0,19 $p_{1,3} < 0,001$ $p_5 = 0,001$
	A/A	0,15 ± 0,12	1,58 ± 0,17 $p_{1,3,4,5} < 0,001$	1,76 ± 0,15 $p_{1,3,5} < 0,001$ $p_4 = 0,003$
IL-10 у носителей <i>IL10</i> C592A	C/C	0,36 ± 0,12	1,35 ± 0,32 $p_1 = 0,003$ $p_5 < 0,001$	1,12 ± 0,19 $p_1 = 0,004$ $p_5 = 0,006$
	C/A	0,38 ± 0,16	1,54 ± 0,16 $p_{1,5} < 0,001$	1,21 ± 0,24 $p_1 = 0,004$ $p_5 < 0,001$
	A/A	0,36 ± 0,09	1,82 ± 0,17 $p_1 < 0,001$ $p_5 = 0,015$	0
IL-10 у носителей <i>IL10</i> C819T	C/C	0,41 ± 0,16	1,24 ± 0,17 $p_1 < 0,001$	1,91 ± 0,18 $p_{1,5} < 0,001$
	C/T	0,47 ± 0,12	1,44 ± 0,16 $p_1 < 0,001$ $p_5 = 0,034$	2,53 ± 0,13 $p_{1,5} < 0,001$ $p_3 = 0,015$
	T/T	0,35 ± 0,1	1,56 ± 0,14 $p_1 < 0,001$	2,83 ± 0,24 $p_{1,2,3,5} < 0,001$

П р и м е ч а н и е. Уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров – p_1 , между группами больных с мезотимпанитом и эпитимпанитом – p_2 , по сравнению с носителями нормального гомозиготного генотипа – p_3 , по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа – p_4 , уровень статистической значимости различий до и после лечения – p_5 .

Так, в группе лиц, страдающих туботимпанальной формой ХГСО и являющихся носителями полиморфизма C3953T гена *IL1B*, уровень IL-1β в сыворотке крови превышал исходный на 12,5; 13,4 и 18,8% соответственно у носителей генотипов C/C, C/T и T/T. В группе больных с эпитимпано-антральной формой у носителей ге-

нотипов C/C, C/T и T/T гена *IL1B* с заменой в локусе -3953 содержание цитокина после лечения увеличивалось на 22,1; 18,2 и 10,9% соответственно (см. табл. 3).

У носителей генотипов C/C и C/T в полиморфном локусе -511 гена *IL1B* в группе больных мезотимпанитом на 10-е сут комбинированного

лечения концентрация IL-1 β в сыворотке крови оказалась выше исходного уровня на 7,2 и 6,0%, а у обладателей генотипов С/С, С/Т и Т/Т полиморфизма -511 гена *IL1B* в группе пациентов с эпитимпанитом – на 6,3; 11,1 и 15,9% соответственно (см. табл. 3).

На 10-е сут лечения увеличение концентрации IL-1 β в крови отмечалось также у обладателей гомозиготных генотипов Т/Т и С/С (на 12,0 и 5,0% соответственно) и гетерозиготного генотипа Т/С (на 11,8%) полиморфного варианта Т31С гена *IL1B* во второй группе больных ХГСО и на 7,4% – у носителей генотипа Т/Т гена *IL1B* (Т31С) в группе больных мезотимпанитом (см. табл. 3).

Кроме того, после лечения содержание IL-6 в сыворотке крови у пациентов с полиморфизмом гена *IL6* (С174G) во второй группе исследования (с эпитимпанитом) повышалось сравнительно с исходным практически на 20% вне зависимости от генотипа, в то время как у больных первой группы оно увеличивалось только у носителей генотипов С/Г и Г/Г на 12,1 и 21,1% соответственно (см. табл. 3).

Концентрация TNF- α в сыворотке крови на 10-е сут лечения у носителей генотипов Г/Г, Г/А и А/А гена *TNFA* (G308A) в группе больных с мезотимпанитом увеличивалась на 9,0; 25,5 и 34,5% соответственно. В группе больных с эпитимпанитом статистически значимое повышение сывороточной концентрации TNF- α регистрировалось у обладателей генотипов Г/Г и Г/А на 12,8 и 24,8% соответственно (см. табл. 3).

Значительное повышение содержания IL-10 в крови после 10-суточного стационарного лечения обнаруживалось у пациентов с мезотимпанитом, являющихся носителями полиморфизма G1082A гена *IL10*: на 32,1% при генотипе Г/Г, на 46,9% при генотипе Г/А и на 66,4% при генотипе А/А. В группе больных с эпитимпанитом существенное увеличение уровня IL-10 в крови было зарегистрировано у обладателей генотипов Г/Г (на 27,0%), Г/А (на 33,3%) и А/А (на 59,0%) полиморфного варианта G1082A гена *IL10* (см. табл. 3).

У носителей генотипов С/С, С/А и А/А гена *IL10* (С592A) в группе больных с мезотимпанитом концентрация IL-10 в сыворотке крови после лечения превышала исходные значения на 65,9; 55,1 и 30,7% соответственно, а у обладателей гетерозиготного генотипа С/Т гена *IL10* (С819Т) – на 36,1% (см. табл. 3).

Увеличение концентрации IL-10 в крови отмечалось также у больных ХГСО второй клинической группы с генотипами С/С (на 62,5%) и С/А (на 52,8%) полиморфного варианта С592A гена *IL10*,

и у обладателей генотипов С/С, С/Т и Т/Т полиморфизма гена *IL10* в полиморфном локусе -819 (на 42,9; 47,8 и 38,8% соответственно) (см. табл. 3).

В результате сравнительного анализа содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у пациентов с ХГСО обеих клинических групп после комбинированного лечения обнаружено, что уровень IL-1 β в крови у носителей полиморфизмов С3953Т, С511Т и Т31С гена *IL1B* в группе больных эпитимпанитом в среднем в 1,4; 1,5 и 2,3 раза соответственно выше, чем у пациентов с мезотимпанитом. Более высокая концентрация провоспалительных цитокинов в крови, в частности IL-6 и TNF- α , зарегистрирована также у носителей генотипов С/С (на 63,5%), С/Г (на 52,8%) и Г/Г (на 61,1%) полиморфизма С174G гена *IL6* и генотипа Г/Г (на 19,8%) полиморфизма G308A гена *TNFA* в группе пациентов с эпитимпанитом по сравнению с их уровнем у носителей соответствующих генотипов аналогичных полиморфизмов генов *IL6* и *TNFA* в группе больных мезотимпанитом (см. табл. 3).

После 10-суточного курса комбинированного лечения межгрупповых различий по содержанию противовоспалительного IL-10 в сыворотке крови у пациентов с туботимпанальной и эпитимпано-антральной формами ХГСО, являющихся носителями полиморфизмов G1082A и С592A гена *IL10*, не обнаружено (см. табл. 3). Наряду с этим концентрация IL10 в сыворотке крови у носителей генотипов С/С, С/Т и Т/Т полиморфизма гена *IL10* (С819Т) в группе пациентов с эпитимпанитом была значительно выше (в 1,5; 1,7 и 1,8 раза соответственно), чем у больных мезотимпанитом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие в геноме определенных сочетаний вариантов мутантных генов может оказывать существенное влияние на степень продукции кодируемого ими белка и, как следствие, на количественное соотношение провоспалительных и противовоспалительных медиаторов в крови, что является одной из главных причин дисрегуляции воспалительного ответа [5–14]. Особенности течения воспалительных заболеваний (в том числе ХГСО) определяются индивидуальной реактивностью организма и на 20–40% генетической предрасположенностью к развитию заболевания [9, 15–18].

В ходе проведенного исследования выявлено, что течение ХГСО сопровождается повышением содержания провоспалительных цитокинов

IL-1 β , IL-6 и TNF- α в сыворотке крови (см. табл. 1, 2). При этом у больных с кариозно-деструктивным течением хронического воспаления в среднем ухе оно (за исключением содержания TNF- α) было существенно выше, чем в группе сравнения. В особенности это касалось сывороточной концентрации IL-1 β , что можно объяснить следующими причинами. Во-первых, как было показано нами ранее [7, 8], присутствие у большинства лиц, страдающих эпителимпанитом (более чем в 55% случаев), «высокопродуцирующих» аллелей в генотипах гена *IL1B*, оказывающих существенное влияние на образование IL-1 β моноцитами/макрофагами, гранулоцитами и другими клетками воспаления, которыми, в свою очередь, определяются своевременность и адекватность ответной реакции организма на болезнетворный агент. Во-вторых, широким вовлечением в патологический процесс, помимо слизистой оболочки, кариозно-измененных костных структур среднего уха и присутствием холестеатомных масс, являющихся сильнейшим хемоаттрактантом для нейтрофилов и макрофагов, секретирующих IL-1 β [9].

Не менее важными представителями провоспалительных цитокинов – регуляторов пролиферации, дифференцировки и активации клеток воспаления, помимо IL-1 β , как известно, являются TNF- α и IL-6 [10, 11]. Согласно результатам настоящего исследования, содержание этих цитокинов в сыворотке крови у пациентов с ХГСО значительно отличалось (было выше) от контрольных показателей без признаков нормализации на фоне стационарного лечения (см. табл. 1–3). По результатам ранее выполненных работ показано, что среди жителей Забайкальского края, как у страдающих ХГСО (в 89% случаев), так и у здоровых лиц (83%), преобладало носительство «высокопродуцирующего» аллеля G гена *TNFA* в полиморфном локусе -308. При этом генотип GG у них обнаруживался соответственно в 3,7 и 2,1 раза чаще, чем гетерозиготный генотип G/A полиморфизма гена *TNFA* (G308A). Однако различий в частоте носительства данных генотипов полиморфизма -308 гена *TNFA* у больных эпителимпанитом и мезотимпанитом не выявлено. Наличие «низкопродуцирующего» аллеля A гена *TNFA* в позиции -308 регистрировалось среди больных ХГСО и здоровых лиц только в 11 и 13% случаев. В отличие от полиморфизма гена *TNFA* (G308A) «высокопродуцирующий» аллель C гена *IL6* в полиморфном локусе -174 обнаруживался среди пациентов с ХГСО и лиц контрольной группы только в 40 и 36% случаев при отсутствии межгрупповых различий [8].

Помимо этого, Е.П. Батаевой (2014) выявлено, что повышение концентрации IL-6 и TNF- α в крови коррелирует с тяжестью течения воспалительного процесса, увеличением числа CD4+ и CD16+ клеток и концентрации IL-1 β в крови, что у пациентов с эпителимпанитом может обуславливаться стимуляцией остеокластов, вызывающих резорбцию кости в среднем ухе при кариозно-деструктивном и холестеатомном процессах у больных ХГСО [6]. Это свидетельствует о потенцировании синтеза IL-6 и TNF- α продуктами тканевого распада, другими медиаторами при условии продолжающегося воспаления [12]. Следовательно, на уровень IL-6 и TNF- α в крови у пациентов с ХГСО в большей степени оказывает влияние не полиморфизм генов, а факторы внешней и внутренней (изменение организменного гомеостаза) среды.

Контроль силы и длительности воспалительной реакции, как известно, обуславливается секрецией клетками очага воспаления и повышением концентрации в сыворотке крови противовоспалительных цитокинов, в частности IL-10, продуцируемого Т-регуляторными клетками с иммуносупрессорной активностью (Treg) и толерогенными макрофагами [13]. Наибольшее содержание данного противовоспалительного цитокина в крови выявлялось у носителей «высокопродуцирующих» аллелей гена *IL10* (G1082A, C592A, C819T) обеих клинических групп, т. е. отмечалась определенная взаимосвязь между сывороточной концентрацией IL-10 и указанными полиморфизмами гена *IL10* (см. табл. 2).

Ранее нами было показано, что носительство «высокопродуцирующего» аллеля G полиморфного варианта G1082A гена *IL10* выявляется у 42,3% больных с ХГСО, носительство «высокопродуцирующего» аллеля A полиморфизма C592A гена *IL10* – только в 28,0% случаев, а присутствие «высокопродуцирующего» аллеля T полиморфизма C819T гена *IL10* – лишь у 42,0%, что значительно реже сравнительно с их частотой у здоровых доноров (соответственно в 66,0; 30,0 и 68,0% случаев). На основании этого сделано предположение о том, что у больных ХГСО обнаруживается некоторая генетически детерминированная предрасположенность к недостаточной продукции противовоспалительного IL-10, что сказывается на реализации воспалительного ответа. Кроме того, полиморфизмы гена *IL10* ассоциировались с активностью и тяжестью течения патологического процесса в среднем ухе. Так, «высокопродуцирующий» аллель G полиморфизма -1082 гена *IL10* в группе больных эпителимпа-

нитом выявлялся в 28,8% случаев, что было в 1,9 раза реже, чем у пациентов с мезотимпанитом, и в 2,9 раза реже – чем у здоровых его носителей [7, 8].

Известно, что одним из эффектов IL-10 является подавление синтеза провоспалительных цитокинов ввиду тормозного его влияния на процессы пролиферации, дифференцировки и активации Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 (Th1) и их цитокин-опосредованной кооперации с другими клетками воспаления. Выявленные нами различия по содержанию IL-1 β , IL-6, TNF- α и IL-10 в крови у больных с мукозным и кариозно-деструктивным течением ХГСО демонстрируют явную недостаточность IL-10-зависимого противовоспалительного ответа у пациентов с хроническим эптитимпано-антральным средним отитом. Сочетание носительства «высокопродуцирующих» аллельных вариантов генов провоспалительных цитокинов с наиболее выраженным увеличением содержания их продуктов в крови у больных ХГСО, в особенности с эптитимпанитом, по всей видимости, является фактором инициации компенсаторного образования противовоспалительного IL-10, синтез которого, однако, оказывается недостаточным ввиду присутствия «низкопродуцирующих» аллелей в составе генотипов полиморфных вариантов гена *IL10*. В конечном итоге развивается более продолжительный и агрессивный воспалительный ответ как следствие цитокинового дисбаланса, в основе которого лежат повышенная секреция провоспалительного IL-1 β и низкий уровень продукции противовоспалительного IL-10.

Концентрация IL-1 β , IL-6, TNF- α и IL-10 в сыворотке крови у больных с эптитимпано-антральной формой ХГСО, являющихся носителями полиморфных генотипов, ассоциированных с наиболее высокими ее значениями до лечения, на 10-е сут комбинированного лечения увеличивалась в 1,2–1,3 раза относительно исходной, в то время как в группе пациентов с туботимпанальной формой болезни ее повышение было менее выраженным (см. табл. 3). Логично предположить, что причиной этому, наряду с операционной травмой при выполнении saniрующих и слухулучшающих хирургических вмешательств, может быть генетически обусловленная предрасположенность к гиперергическому варианту воспалительного ответа.

Максимальная разница относительно концентрации провоспалительных цитокинов в крови до и на 10-е сут лечения у носителей разных генотипов полиморфизма генов *IL1B*, *IL6*, *TNFA* среди

больных ХГСО достигала 24%. Поскольку после комбинированного лечения ХГСО увеличение содержания IL-10 в крови отмечалось исключительно у носителей генотипа A/A полиморфизма G1082A гена *IL10* на 58,0% в группе больных с эптитимпанитом и 65% – с мезотимпанитом, оно также не может рассматриваться только как результат купирования проявлений альтерации и экссудации при хирургическом вмешательстве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных ХГСО однонуклеотидные замены в генах провоспалительных цитокинов (*IL1B*, *IL6* и *TNFA*) оказывают значимое влияние на уровень соответствующих медиаторов в сыворотке крови и, исходя из этого, опосредуют особенности патогенеза и характер клинического течения заболевания. При этом концентрация противовоспалительного IL-10 в крови в большей степени зависит от генотипа полиморфизмов G1082A и C592A гена *IL10*, чем от клинической формы заболевания. Исключением являются носители полиморфизма C819T гена *IL10*, у которых концентрация IL-10 проявляет зависимость от клинической формы заболевания (а не от генотипа) с наибольшим повышением при эптитимпаните. Сочетанное увеличение концентрации IL-10 и провоспалительных цитокинов до начала проведения и на 10-е сут комбинированного лечения у больных с туботимпанальной и эптитимпано-антральной формами ХГСО, являющихся носителями «высокопродуцирующих» аллелей полиморфных вариантов генов цитокинов, свидетельствует о генетически обусловленной предрасположенности к гиперергическому течению воспаления.

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.

ВКЛАД АВТОРОВ

Байке Е.В. – разработка концепции и дизайна исследования, выполнение практической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание основного текста статьи. Уразова О.И. – интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания и редактирование рукописи, утверждение для публикации рукописи.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом № 64 от 20.06.2014 г., одобренным локальным этическим комитетом при Читинской государственной медицинской академии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Симбирцев А.С., Громова А.Ю., Рыдловская А.В. Роль полиморфизма генов цитокинов в регуляции воспаления и иммунитета. *Медицинский академический журнал*. 2006; 1: 144–149. [Simbirtsev A.S., Gromova A.Yu., Rydlovskaya A.V. The role of polymorphisms of genes of cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Meditinskiiy akademicheskiiy zhurnal*. 2006; 1: 144–149 (in Russ.)].
- Глазников Л.А., Пониделко С.Н., Говорун М.И. Роль генетических мутаций у больных с приобретенными формами сенсоневральной тугоухости. *Вестник оториноларингологии*. 2012; 4: 37–39. [Glaznikov L.A., Ponidelko S.N., Govorun M.I. The role of genetic mutations in the patents with the acquired forms of sensorineural impairment of hearing. *Vestnik otorinolaringologii*. 2012; 4: 37–39 (in Russ.)].
- Revai K. Association between cytokine gene polymorphisms and risk for upper respiratory tract infection and acute otitis media. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (2): 257–261.
- Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина; 1999: 608. [Jarilin A.A. Fundamentals of immunology. M.: Medicina; 1999: 608 (in Russ.)].
- Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Максимов В.Н. Комплекс генотипов цитокинов как генетический фактор риска развития инфаркта миокарда у мужчин европеоидного населения России. *Кардиология*. 2012; 52 (7): 22–29. [Konenkov V.I. Shevchenko A.V., Prokofev V.F., Maksimov V.N. Complex of Genotypes of Cytokines as a Genetic Factor of Risk of Development of Myocardial Infarction of in European Population of Russia Men. *Kardiologiya*. 2012; 52(7): 22–29 (in Russ.)].
- Батаева Е.П. Влияние полиморфизмов генов IL-4 (C589T) и TNF-α (G308A) на содержание цитокинов у детей при пиелонефритах. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2014; 1: 74–78. [Bataeva E. P. Influence polymorphism of genes IL-4 (C589T) and TNF-α (G308A) on content of cytokine in children with pyelonephritis. *Dal'nevostochnyi meditsinskiiy zhurnal*. 2014; (1): 74–78 (in Russ.)].
- Шпотин В.П., Галимзянов К.М., Еремина Н.В., Проскурин А.И. Оценка цитокинового статуса у больных хроническим гнойным средним отитом. *Цитокины и воспаление*. 2012; 11 (4): 82–84. [Shpotin V.P., Galimzyanov Kh.M., Eremina N.V., Proskurin A.I. Evaluation of cytokine status in patients with chronic purulent otitis media. *Citokiny i vospalenie*. 2012; 11(4): 82–84 (in Russ.)].
- Терскова Н.В., Вахрушев С.Г., Шнайдер Н.А. Аддитивный вклад однонуклеотидных замен гена фактора некроза опухолей-α в предрасположенность к хроническому аденоидиту. *Российская оториноларингология*. 2011; 6: 142–153. [Terskova N.V., Vakhrushev S.G., Shnyder N.A. The additive contribution of single nucleotide replacements of a tumors-necrosis factor gene to chronic adenoiditis predisposition. *Rossiyskaya otorinolaringologiya*. 2011; 6: 142–153 (in Russ.)].
- Тихомирова И.А. Хронические заболевания ЛОР органов в формировании профиля патологии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2009: 43. [Tikhomirova I.A. Chronic diseases of ENT organs in the formation of the profile: avtoref. dis. ... d-ra med. nauk. SPb., 2009: 43 (in Russ.)].
- Власова Г.В., Егоров Л.В., Котов А.Ю., Варюшина Е.А., Симбирцев А.С. Особенности общей и местной иммунореактивности у детей с хроническими средними отитами. *Цитокины и воспаление*. 2005; 4 (4): 39–44. [Vlasova G.V., Egorov L.V., Kotov A.Ju., Varjushina E.A., Simbirtsev A.S. Features of systemic and local immune reactivity in children with chronic otitis media. *Citokiny i vospalenie*. 2005; 4(4): 39–44 (in Russ.)].
- Устинович А.А., Войтович Т.Н., Устинович К.Н. Вклад наследственных факторов в развитие острых средних отитов у новорожденных и детей первых месяцев жизни. *Медицинский журнал*. 2013; 2: 115–118. [Ustinovich A.A., Voitovich T.N., Ustinovich K.N. The degree of hereditary factors on the incidence of otitis media in neonates and children during the first months of life. *Medicinskij zhurnal*. 2013; 2: 115–118 (in Russ.)].
- Байке Е.В., Байке Е.Е. Полиморфизм генов IL-1β, IL-6, IL-10 и TNF-α у больных разными формами хронического гнойного среднего отита. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 4. URL: <http://www.science-education.ru/127-21205>. [Bajke E.V., Bajke E.E. Gene polymorphisms of IL-1β, IL-6, IL-10 and TNF-α in pations with different forms of chronic purulent otitis media. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya*. 2015; 4. URL: <http://www.science-education.ru/127-21205> (in Russ.)].
- Байке Е.В., Витковский Ю.А. Частота полиморфизма генов IL-1β, IL-6, IL-10 и TNF-α у больных хроническим гнойным средним отитом. *Забайкальский медицинский вестник*. 2015; 1: 94–98. URL: <http://medacadem.chita.ru/zmv>. [Bajke E.V., Vitkovskij Ju.A. Genes polymorphisms of IL-1β, IL-6, IL-10 and TNF-α in pations of chronic purulent otitis media. *Zabajkal'skij medicinskij vestnik*. 2015; 1: 94–98. URL: <http://medacadem.chita.ru/zmv> (in Russ.)].
- Cheron A., Monneret G., Landelle C. Low monocyte HLA-DR expression and risk of secondary infection. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 2010; 29 (5): 368–376.
- Lukaszewicz A.C., Faivre V., Payen D. Is monocyte HLA-D expression monitoring a useful tool to predict the risk of secundar infection? *Minerva Anesthesiol.* 2010; 76 (9): 737–743.

16. Shenkman B., Solpov A., Vitkovsky Yu. CD4+ lymphocytes require platelet for adhesion to immobilized fibronectin in flow: Role of $\beta 1$ (CD29)-, $\beta 2$ (CD18) related integrins and non-integrin receptors. *Cellular Immunology*. 2006; 1 (11): 423.
17. Gouel-Cheron A., Allaouchiche B., Guignant C., Davin F., Floccard B., Monneret G. et al. Early interleukin-6 and slope of monocyte human leucocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. *J. PLoS One*. 2012; 7 (3): 3309.
18. Vasilescu A., Heath S.C., Ivanova R. Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS colon: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression. *Genes and Immunity*. 2003; 4: 441–449.

Поступила в редакцию 20.10.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Байке Елена Викторовна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра оториноларингологии, ЧГМА, г. Чита; докторант кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, профессор, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Байке Елена Викторовна, e-mail: elenabayke@yandex.ru.

УДК 616.284-002.2/.3-06:575.174.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-24–35

For citation: Bayke E.V., Urazova O.I. The cytokine profile of blood in dependence on polymorphism of cytokine genes in patients with chronic purulent otitis media. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 24–35.

The cytokine profile of blood in dependence on polymorphism of cytokine genes in patients with chronic purulent otitis media

Bayke E.V.^{1,2}, Urazova O.I.²

¹ Chita State Medical Academy
39a, Gorkogo Str., Chita, 672090, Russian Federation

² Siberian State Medical University
2, Moskow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

The goal is to reveal features of changes in the ratio of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10 in blood depending on polymorphism of genes *IL1B*, *IL6*, *TNFA* and *IL10* at different clinical forms of chronic inflammation of the middle ear in the stage of exacerbation before treatment and on the 10th day of treatment.

Materials and methods. A total of 299 patients (129 men and 170 women) with chronic purulent otitis media were examined: 146 with tubotympanic form and 153 with epitympanoantral form. The control group included 183 relatively healthy donors, comparable to those of 299 patients by sex and age. Human genomic DNA was isolated from the blood by a standard method and was analyzed with the use of the polymerase chain reaction (PCR) in real-time. The concentration of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10 in blood was measured by solid-phase enzyme-linked assay before and after 10 days of treatment. Statistical processing of the obtained data was performed using software package STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA). The critical level of significance when testing statistical hypotheses was taken to be less than 0.05.

Results. In patients with chronic purulent otitis media, an increase in the concentration of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the blood varies depending on polymorphism of genes *IL1B* (-3953, -511, -31), *IL6* (-174), *TNFA* (-308) and the clinical form of the disease. The concentration of IL-10 in the blood depends more on the polymorphism of the *IL10* gene (-1082, -592) than on the clinical form of the disease. The combined increase of concentration of IL-10 and proinflammatory cytokines in the blood before the beginning and on the 10th day

of combined treatment of patients with tubotympanic and epitympanoantral forms of chronic purulent otitis media, in carriers of high-producing alleles inflammatory cytokines of polymorphic variants of genes *IL1B*, *IL6* and *TNFA*, indicates a genetic predisposition to hyperergic the course of inflammation.

Key words: cytokines, genetic polymorphism, chronic purulent otitis media.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

All patients signed an informed consent to participate in the study in accordance with Protocol No. 64 of June 20, 2014, approved by the local ethics committee under the Chita State Medical Academy.

Received 20.10.2017

Accepted 06.02.2018

Bayke Elena V., PhD, Assistant, Otolaryngology Department, Chita State Medical Academy, Doctoral Student, Pathophysiology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Urazova Olga I., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Pathophysiology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Bayke Elena V.**, e-mail: elenabayke@yandex.ru.

УДК 616-008.853.3:578.828:575.113.12

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-36-44

Для цитирования: Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Козлов В.А. УФО-индуцированная экспрессия эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1 в мононуклеарных клетках крови. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 36–44.

УФО-индуцированная экспрессия эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1 в мононуклеарных клетках крови

Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Козлов В.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФиКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Влияние различных факторов внешней среды опосредованно, через эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов, способно приводить к активации эндогенных ретровирусов (ЭР) человека.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности активации эндогенного ретровируса человека I класса HERV-E λ 4-1 (ЭР λ 4-1) в мононуклеарных клетках крови (МНК) здоровых лиц в результате воздействия УФО-излучения *in vitro*.

Материалы и методы. Суспензию индивидуальных образцов МНК доноров (20×10^6 /мл) в среде RPMI-1640 подвергали УФО-облучению в течение 5 мин на УФО-излучателе при длине волны 340 нм и интенсивности излучения 50 Вт/м². После облучения образцы клеток культивировали в течение 24 ч в полной культуральной среде в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Перед облучением, а также после него в образцах МНК определяли пролиферативную активность на основании включения меченного тритием тимидина, жизнеспособность, методом окраски трипановым синим, и экспрессию ЭР E λ 4-1 методом обратно-транскриптной полимеразной цепной реакции.

Основные результаты. УФО-облучение культур мононуклеарных клеток крови в течение 5 мин не приводило к изменению их жизнеспособности и функциональной активности. Исследование частоты случаев экспрессии гена *env* ЭР λ 4-1 в образцах МНК крови доноров до и после воздействия УФО-излучения выявило различия данного показателя. Так, до воздействия УФО-излучения количество случаев экспрессии *env* ЭР λ 4-1 составило 6,16% (4/65 человек), тогда как после облучения его экспрессия определялась значительно чаще – в 24,62% случаев (16/65 человек), $p < 0,05$. Наряду с увеличением частоты экспрессии наблюдалось и повышение уровня мРНК гена *env* ЭР λ 4-1 с 87 (44; 120) усл. ед. опт. плотности до 264 (135; 306) усл. ед. опт. плотности, $p < 0,05$.

Заключение. Воздействие УФО-излучения с интенсивностью 50 Вт/м² в течение 5 мин на мононуклеарные клетки крови условно-здоровых лиц *in vitro* приводит к активации эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1: увеличению количества случаев его экспрессии и повышению уровня мРНК.

Ключевые слова: эндогенный ретровирус человека HERV-E λ 4-1, активация, УФО-излучение, мононуклеарные клетки крови.

ВВЕДЕНИЕ

Эндогенные ретровирусы (ЭР) являются частью семейства *Retroviridae*, которое представляет собой многочисленное и многообразное се-

мейство патогенных вирусов человека, животных и растений. Ретровирусы в геноме человека могут существовать в виде двух различных форм: генетических элементов хромосомной ДНК – эндогенных ретровирусов, которые представляют собой интегрированную в виде провируса форму экзогенных, а также инфекционных горизонталь-

✉ Гольдина Ирина Александровна, e-mail: igoldina@mail.ru.

но наследуемых РНК-содержащих экзогенных ретровирусов, передающихся от человека к человеку [1].

ЭР являются разновидностью ретротранспозонов, мобильных элементов генома, входящих в состав так называемой *junk* (некодирующей, мусорной) ДНК, которые характеризуются наличием двух длинных концевых повторов (LTR), ограничивающих их последовательность (*gag*, *pol*, *pro*, *env*) и выполняющих роль альтернативного промотора и (или) энхансера. Они постоянно присутствуют в геноме, наследуются согласно законам Менделя и составляют около 8–10% генома позвоночных, включая и человека [2, 3]. ЭР распределены в геноме в виде множества копий и фиксированы в ДНК всех клеток человека. Данные вирусы, как правило, представлены как полноразмерными, так и неполными последовательностями со множеством стоп-кодонов, инсерций и делеций, что делает их функционально инертными [4]. Некоторые из них в то же время репликационно компетентны, способны формировать структуру вириона, покидать клетку и инфицировать другие клетки. Причем ЭР с функционально активным геном *env* транскрипционно более активны, так как экспрессия *env* протеина обеспечивает их инфекционность [5, 6]. Согласно современной классификации, ЭР человека разделены на три основных класса: γ - и ϵ -подобные – I класс, β -подобные – II класс и Spuma-подобные – III класс, на основании гомологии базовых последовательностей нуклеотидов с различными классами экзогенных ретровирусов. ЭР представлены более чем 50 семействами из 3 173 последовательностей [7–9]. Каждое семейство представляет собой независимое событие интеграции в геном [10]. Систематизация ЭР основана на специфичности тРНК сайтов связывания с праймерами, используемыми для начала обратной транскрипции, либо анализа локусов генов человека [11].

Регуляция экспрессии ЭР является многоуровневой. Она осуществляется различными стрессовыми сигналами внешней среды – суперинфекцией экзогенными вирусами и простейшими микроорганизмами (HTLV-1, Herpes Simplex Virus-1, Epstein Barr Virus, *Chlamydia trachomatis*) [6, 12–14], повреждением тканей, сопровождающимся воспалением, цитотоксичностью и апоптозом клеток [4, 15], а также внутриклеточными механизмами транскрипции (пулом факторов транскрипции – NF- κ B, Interferon Regulatory Factor-1, 3, 7, механизмами сплайсинга), гормональными изменениями. В результате этого происходит

мобильная и специфичная модуляция эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов (гипометилирование ДНК, деацетилирование и сумойляция гистонов, экспрессия микроРНК) [16, 17]. Снижение уровня метилирования ДНК и деконденсация структуры хроматина приводят к инициации инсерционного мутагенеза ЭР – ретротранспозиции, вызывает их экспрессию, в результате чего некоторые ЭР продуцируют вирусные белки, обладающие иммуномодулирующими свойствами [18–21].

Активация ЭР наблюдается при многих заболеваниях человека, причем данные изменения происходят на самых ранних стадиях патологического процесса, что позволяет рассматривать их как компонент патогенеза и ранний диагностический маркер [22]. Несмотря на интенсивное изучение ЭР в течение последних лет, многие аспекты факторов и механизмов их активации, а также функции ЭР остаются не выясненными [21].

Учитывая ассоциацию ЭР со многими полиэтиологическими иммунопосредованными заболеваниями – онкологическими [23], аутоиммунными [24], нейродегенеративными [25, 26], способность ЭР активироваться в результате воздействия ряда факторов внешней среды, целью настоящего исследования явилось изучение возможности активации эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1 (ЭР λ 4-1) в мононуклеарных клетках крови (МНК) условно здоровых лиц в результате воздействия УФО-облучения *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 65 условно здоровых лиц (35 мужчин и 30 женщин) в возрасте 31–45 лет из числа доноров Новосибирского центра крови. МНК выделяли при помощи центрифугирования гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколла 1,078 г/см³ (Lymphocyte separation medium, MP Biomedicals Inc., США) при 1 500 об./мин в течение 40 мин. Клетки, собранные из интерфазы, трехкратно отмывали в среде 199, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в концентрации 20 $\times$ 10⁶/мл в полной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки крови человека АВ (IV), 10 мМ Hepes, 4 $\times$ 10⁻⁵ М 2-меркаптоэтанола, 2 мМ L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина. Часть клеток каждого из образцов крови использовали для определения исходной жизнеспособности (n = 21) и экспрессии ЭР λ 4-1, n = 65. Для исследования спонтанной пролиферативной

активности ($n = 21$) другую часть клеточной суспензии разводили полной культуральной средой до концентрации 2×10^6 /мл, затем культивировали в круглодонных 96-луночных планшетах (Linbro, США) в концентрации 100×10^3 клеток на лунку. Далее третью часть клеток этих же образцов (20×10^6 /мл) подвергали УФО-облучению в течение 0–10 мин на УФО-излучателе (Pharmacia LKB, Франция) при длине волны 340 нм и интенсивности излучения 50 Вт/м². После облучения клеточную суспензию разводили полной культуральной средой до концентрации 2×10^6 /мл и культивировали в течение 24 ч. Затем в данных образцах МНК также определяли пролиферативную активность, жизнеспособность и экспрессию ЭРλ 4-1.

Для оценки жизнеспособности МНК исследуемые образцы крови окрашивали 0,5%-м раствором трипанового синего, подсчитывали процентное содержание неокрашенных и окрашенных клеток.

Оценка пролиферативной активности МНК. Культивирование клеток проводили в СО₂-инкубаторе при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% СО₂ и 95% воздуха в течение 24 ч, в триплетах. За 18 ч до окончания периода культивирования во все лунки добавляли по 1 мкКю 3Н-тимидина. Затем клетки собирали на стекляннно-волоконистые фильтры (Flow Lab.) с помощью аппарата Harvester (TITERTEK). Фильтры помещали во флаконы для сцинтиллятора, наполненные раствором, содержащим 4 г дифенилоксазола и 0,1 г дифенил-оксазолилбензола на 1 л толуола, и подсчитывали радиоактивность в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Дельта» (США). Результаты оценивали в имп/мин на 100×10^3 клеток.

Выделение геномной РНК. Геномную РНК получали методом фенольной экстракции с использованием тест-системы ВекторРНК – экстракция («Вектор-Бест», г. Новосибирск). С этой целью 200 мкл клеточной суспензии, содержащей 4×10^6 клеток, смешивали с 200 мкл 4М раствора гуанидинтиоционата и 4 мкл РНК-носителя с концентрацией 0,5 мг/мл, встряхивали на «Вортексе» в течение 15 с и охлаждали в снежной бане в течение 10 мин. Затем добавляли 200 мкл смеси фенол – хлороформ – изоамиловый спирт в соотношении 25 : 24 : 1 по объему и энергично встряхивали в течение 1 мин. Далее пробирки со смесью замораживали при –18 °С в течение 40 мин. После размораживания смесей пробирки центрифугировали при 12 000 об./мин в течение 5 мин и собирали водную фазу, измеряя ее объем, добавляли 0,10 часть по объему 2М раствора ацетата натрия, рН 4,5, и равный по объему водной фазы объем изопропи-

лового спирта. Растворы тщательно перемешивали и замораживали при –18 °С в течение ночи. После размораживания полученную РНК осаждали центрифугированием при 12 000 об./мин в течение 5 мин, супернатант удаляли пипеткой, а к осадку добавляли 100 мкл 75%-го этилового спирта, предварительно охлажденного до –18 °С. Раствор РНК вновь центрифугировали, супернатант удаляли, а осадок подсушивали при 45 °С и растворяли в 12 мкл DEPC-обработанной воды, свободной от РНКаз.

Ревертирование РНК и амплификация ДНК. К раствору РНК добавляли 3 мкл раствора случайных праймеров (OligoDT₁₂₋₁₈) с оптической плотностью 1 о.е. Полученный раствор инкубировали в термостате при 65 °С в течение 15 мин, затем охлаждали при –18 °С в течение 15 мин. После этого в каждую пробирку с РНК добавляли по 25 мкл раствора для ревертирования, состоящего из 2 мкл MnCl₂, 1,5 мкл (75 ед.) обратной транскриптазы М – MuLV RT, 4 мкл 10-кратного буфера для обратной транскриптазы, 9,5 мкл деионизированной воды, 8 мкл смеси 20 мМ динуклеотидтрифосфатов (АТР, ТТР, ГТР, СТР), 1 мкл раствора ингибитора РНКаз (20 ед./мкл) и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 60 мин, далее нагревали при 95 °С в течение 5 мин и замораживали при –18 °С в течение ночи. Амплификацию полученной ДНК осуществляли в программируемом амплификаторе «Терцик» («ДНК-технологии», г. Москва) с использованием пар олигонуклеотидных праймеров к гену *env* ЭРλ 4-1 (sense: AGAGCCTACATTCGTTTAC, antisense: ACCGTATGATCCGATTGAG), гомологичных консервативным участкам антипараллельных цепей ДНК. Для проведения амплификации ДНК в каждую пробирку добавляли по 5 мкл 10-кратного буфера для Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл 100 мМ раствора MgCl₂, 2 мкл смеси 8 мМ динуклеотидтрифосфатов, 1 мкл Taq ДНК-полимеразы (1 ед./мкл), по 2 мкл праймеров (sense, antisense, 1 о.е./мл), 2 мкл исследуемой ДНК, 34 мкл деионизированной воды. Сверху на полученную смесь наслаивали 10 мкл минерального масла. Для контроля реакции проводили амплификацию всех исследуемых образцов с праймерами β-актина. Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 2%-м геле агарозы с добавлением 0,00001% бромистого этидия («ВекторДНК-ЭФ», «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Для этого 9 мкл каждого образца кДНК, полученного в результате проведения амплификации, смешивали с 1 мкл 10-кратного буфера для нанесения образцов, состоящего из 50%-го раствора глицерина, 0,25%-го раствора

бромфенолового синего, 0,25%-го раствора ксиленцианола. Полученную смесь вносили в карманы геля. Первый карман геля заполнялся 10 мкл раствора контрольных фрагментов ДНК, во второй вносили отрицательный контрольный образец, представляющий собой реакционную смесь, в которую вместо исследуемой кДНК добавлено соответствующее количество деионизированной воды. Электрофорез проводили в трис-ацетатном буфере при напряжении 15 В/см геля. Полученный фрагмент кДНК соответствующего размера (274 п.н.) выявляли в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул. Положительными считали образцы с наличием в геле видимой полосы кДНК, соответствующей ожидаемому размеру ампликона. Продукты амплификации визуализировали на денситометре Pharmacia LKB. Полуколичественная оценка результатов проводилась с использованием программы Image Master VDS Software (США). Результаты выражали в условных (относительных) единицах оптической плотности.

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов описательной статистики, сравнительного анализа, пакета программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки

статистической значимости различий при анализе повторных наблюдений применялся критерий McNemar, парный критерий Вилкоксона для двух зависимых групп. Результаты представлены в виде медианы и интервала между 1 и 4 квартилями (Me (25%; 75%)). Различия считали достоверными при значениях достигнутого уровня статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В серии предварительных экспериментов оценивали влияние различных доз УФО-излучения на жизнеспособность и пролиферативную активность МНК крови с целью определения максимальной дозы излучения, не приводящей к изменению пролиферативной активности и гибели клеток. Результаты исследования жизнеспособности МНК при воздействии УФО-излучения представлены в табл. 1.

Оценка жизнеспособности МНК крови под действием УФО-излучения выявила гибель значительного количества клеток при времени облучения 10 мин.

Результаты изучения пролиферативной активности МНК представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 1

Жизнеспособность мононуклеарных клеток крови условно здоровых лиц при воздействии УФО-излучения, Me (25%; 75%)					
Параметр	Время облучения, мин				
	0	1	3	5	10
Содержание жизнеспособных клеток, %	97 (97; 99)	97 (96; 98)	97 (95; 98)	94 (92; 95)	64 (58; 70)*

* статистическая значимость различий $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона), $n = 21$ (здесь и в табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Пролиферативная активность мононуклеарных клеток крови условно здоровых лиц при воздействии УФО-излучения, Me (25%; 75%)					
Параметр	Время облучения, мин				
	0	1	3	5	10
Удельная радиоактивность, имп./мин	1 526 (821; 2 532)	1 758 (834; 2 770)	1 619 (921; 2 350)	1 370 (656; 2 345)	344 (156; 678)*

Полученные результаты также свидетельствуют об изменении параметров пролиферативной активности МНК крови при воздействии УФО-излучения при времени экспозиции 10 мин. Максимальным временем воздействия на клетки, не приводящим к изменению параметров жизнеспособности и пролиферативной активности,

явился период облучения продолжительностью 5 мин. Далее облучение клеток для выявления экспрессии ЭР λ 4-1 проводилось в течение данного периода времени.

Активацию ЭР λ 4-1 оценивали на основании исследования экспрессии его гена *env*. Перед исследованием экспрессии *env* ЭР λ 4-1 в образцах

МНК крови определяли качество выделения ДНК по наличию в них ДНК β -актина, представляющего собой ген *housekeeping*, экспрессирующийся во всех клетках на постоянном уровне, независимо от функционального статуса клетки. При амплификации с праймерами β -актина и последующей электрофоретической оценке результатов все образцы периферической крови здоровых лиц демонстрировали наличие фрагмента ДНК соответствующего размера (462 п.н.), что свидетельствовало о наличии ДНК во всех исследуемых образцах (рис. 1).

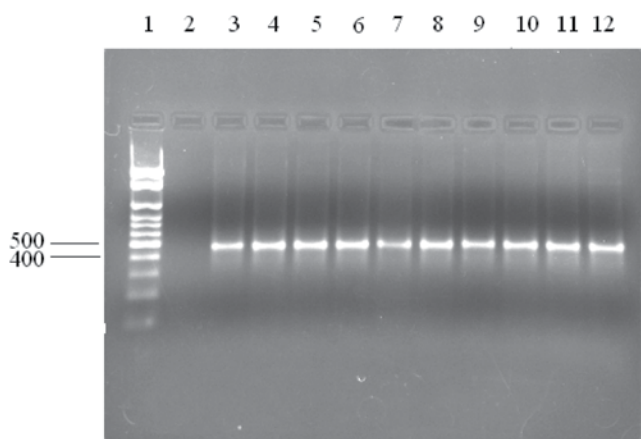


Рис. 1. Экспрессия β -актина в мононуклеарных клетках периферической крови доноров: линия 1 – маркер (100–1 200 п.н.), линия 2 – контроль контаминации, линии 3–12 – β -актин (462 п.н.)

Fig. 1. β -actin expression in mononuclear cells of donor peripheral blood: line 1 – marker (100–1 200 bps), line 2 – contamination control, lines 3–12 – β -actin (462 bps)

Далее исследовали влияние УФО-излучения на активацию ЭР λ 4-1. Контрольную группу составили образцы МНК, которые культивировали в течение 24 ч, как было описано выше, без воздействия УФО-излучения. В опытной группе образцы МНК тех же доноров перед началом культивирования подвергали УФО-облучению. Определение количества случаев экспрессии *env* ЭР λ 4-1 в МНК крови образцов контрольной группы до и после культивирования не выявило различий данного показателя, который составил 6,2% (4/65 человек), что согласуется с полученными нами ранее данными, а также результатами других авторов [25, 27]. В то же время в МНК доноров до и после воздействия УФО-излучения наблюдалось увеличение данного параметра с 6,2 до 24,6% (16/65 человек), ($p = 0,0003$, (McNemar)) (рис. 2, 3). Следовательно, воздействие УФО-излучения на МНК условно здоровых лиц индуцирует в них экспрессию *env* ЭР λ 4-1.

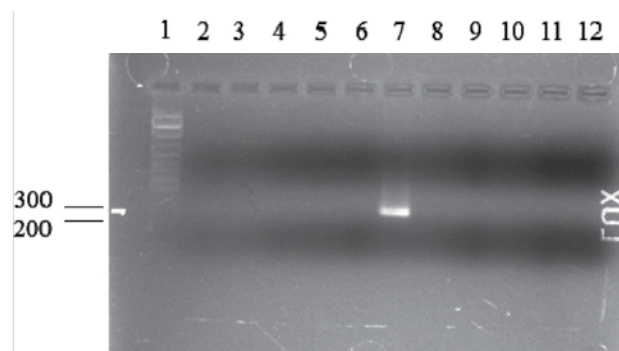


Рис. 2. Экспрессия *env* ЭР λ 4-1 в мононуклеарных клетках периферической крови доноров до УФО-облучения: линия 1 – маркер (100–1 200 п.н.), линия 2 – контроль контаминации, линии 3–12 – *env* ЭР λ 4-1 (274 п.н.)

Fig. 2. *Env* ER λ 4-1 expression in mononuclear cells of donor peripheral blood before UV- irradiation: line 1 – marker (100–1 200 bps), line 2 – contamination control, lines 3–12 – *env* ER λ 4-1 (274 bps)

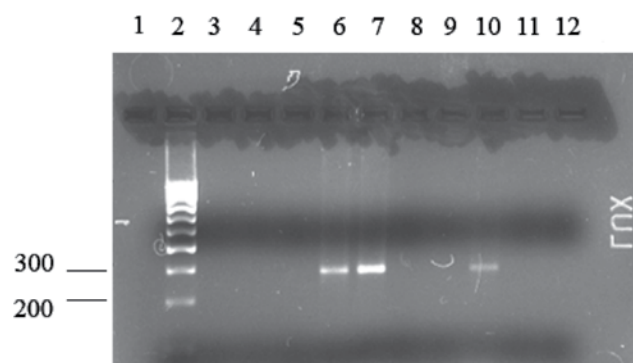


Рис. 3. Экспрессия *env* ЭР λ 4-1 в мононуклеарных клетках периферической крови доноров после воздействия УФО-облучения: линия 1 – маркер (100–1 200 п.н.), линия 2 – контроль контаминации, линии 3–12 – *env* ЭР λ 4-1 (274 п.н.)

Fig. 3. *Env* ER λ 4-1 expression in mononuclear cells of donor peripheral blood after exposure to UV radiation: line 1 – marker (100–1 200 bps), line 2 – contamination control, lines 3–12 – *env* ER λ 4-1 (274 bps)

Таким образом, воздействие УФО-излучения с интенсивностью 50 Вт/м² в течение 5 мин на МНК крови условно здоровых лиц приводит к активации ЭР λ 4-1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что многие ЭР имеют ограниченную способность к транскрипции, так как, наряду с полноразмерными последовательностями, представлены и неполными последовательностями с наличием стоп-кодонов, инсерций и делеций, что делает их функционально инертными. В то же время некоторые ЭР (15–30%) транскрипционно

активны, что подтверждается идентификацией их транскриптов в различных клетках и тканях [28].

HERV-E λ 4-1 – ЭР человека I класса, является репликационно компетентным, способным к продукции белков, так как его аминокислотная последовательность (8,8 кБ) содержит открытые рамки считывания в регионах *gag* и *env* в хромосомах 2q37, 8p23, 11q13, 17q11.2 [6]. Согласно данным литературы и результатам собственных исследований, ЭР λ 4-1 экспрессируется как в нормальных, так и патологических тканях, ассоциирован с рядом аутоиммунных заболеваний – системной красной волчанкой, рассеянным склерозом, ревматоидным артритом, причем частота и уровень его экспрессии в мононуклеарных клетках крови больных коррелируют с активностью заболевания. У условно здоровых лиц частота его экспрессии низка и, по-видимому, обусловлена наличием персистирующих форм инфекций в популяции. Также нами выявлено, что синтетический 17-аминокислотный полипептид, гомологичный *env* региону ЭР λ 4-1, обладает иммуномодулирующими свойствами: стимулирует клеточный иммунный ответ, повышая уровень бласттрансформации культур МНК крови доноров как не стимулированных, так и обогащенных в результате митогенной стимуляции Т-лимфоцитами. Увеличивает выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана у мышей (СВАхС57Bl/6)F1, повышая экспрессию и продукцию МНК крови условно здоровых лиц ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-2, не изменяя при этом синтеза ИЛ-4 и ИЛ-10 *in vitro* [29, 30]. Эти данные обуславливают актуальность выявления факторов внешней среды, способных приводить к активации данного ЭР [6, 25, 31]. Известно, что его транскрипция, будучи результатом воздействия комплекса целлюлярных и экстрацеллюлярных факторов, регулируется уровнем метилирования LTR. Гипометилирование LTR ЭР λ 4-1 сопровождается его экспрессией, что характерно и для других ЭР [31, 32]. Учитывая, что УФО-излучение сопровождается изменением эпигенетической регуляции экспрессии генов, мы исследовали возможность активации ЭР λ 4-1 у здоровых под влиянием УФО.

Воздействие УФО-излучения на клетки крови человека сопровождается целым рядом изменений их структуры и функции. Например, при УФО-облучении изменяется субмикроскопическая структура эритроцитов, происходит потеря ионов K^+ , нарушаются их осмотические свойства; стимулируются фагоцитарная активность моноцитов и гранулоцитов, синтез H_2O_2 , активируются синтез iNOS и продукция ФНО- α

нейтрофилами. Циркулирующие Т-лимфоциты высокочувствительны к УФО-иррадиации, в них происходит повреждение ДНК [33]. УФО-излучение также приводит к снижению количества Th-17, T(EMRA)(CD3=CD8+CD45RA+CD62L+) эффекторных клеток памяти, НК-клеток и увеличению числа регуляторных Т-клеток CD4/CD25/FoxP3 [34]. К воздействию УФО-излучения чувствительны и некоторые мобильные элементы генома: снижение уровня метилирования ДНК и деконденсация структуры хроматина ведут к реактивации данных элементов и наблюдаются при многих заболеваниях человека [22]. УФО-излучение сопровождается многочисленными изменениями эпигенетической регуляции экспрессии генов. С одной стороны, глобальным ацетилированием гистонов, с другой – локальным гипoaцетилированием H3-гистона и p300, опосредованным воздействием на уровень метилирования ДНК-увеличением мобильности и уменьшением размера частиц протеин-аргинин метилтрансфераз, ответственных за метилирование остатков аргинина [35], увеличением экспрессии 5-метилцитозина, вовлеченного в гидроксиметилирование ДНК [36], а также прямым изменением уровня метилирования CpG [37].

Так как экспрессия ЭР изменяется в зависимости от функционального состояния клетки, нами было выбрано время облучения, не приводящее к изменению жизнеспособности и пролиферативной активности МНК. Учитывая, что эпигенетические механизмы регуляции экспрессии чувствительны к воздействию УФО-излучения и вовлечены в активацию эндогенных ретровирусов, индукция экспрессии ЭР λ 4-1 под действием УФО-излучения, выявленная в данном исследовании, может быть обусловлена изменением эпигенетического статуса генома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие УФО-излучения с интенсивностью 50 Вт/м² в течение 5 мин на мононуклеарные клетки крови условно здоровых лиц *in vitro* приводит к активации эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1.

КОНФИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Гольдина И.А. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание

рукописи. Гайдуль К.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Козлов В.А. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено этическим комитетом НИИФиКИ (протокол № 99 от 10 апреля 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. Retroviruses. New York: Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- Koito A., Ikeda T. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Frontiers in Microbiol.* 2013; 4: 1–9.
- Urnovitz H.B., Murphy W.H. Human endogenous Retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9 (1): 72–99.
- Lee J.M., Choi J.Y., Kim J.S., Hyun B.H., Kim H.S. Identification and phylogeny of new human endogenous retroviral sequences belonging to the HERV – H family. *AIDS Research Human Retroviruses*. 2000; 16: 2055–2058.
- De Parseval N., Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet. Genome Res.* 2005; 110: 318–332.
- Prusty B.K., Hausen H., Schmidt R., Kimmel R., de Villiers E.-M. Transcription of HERV-E and HERV-E-related sequences in malignant and non-malignant human haemopoietic cells. *Virology*. 2008; 382: 37–45.
- Escalera-Zamudio M., Greenwood A.D. On the classification and evolution of endogenous retrovirus: human endogenous retroviruses may not be 'human' after all. *APMIS*. 2016; 124 (1-2): 44–51. DOI: 10.1111/apm.12489.
- Vargiu L., Rodrigues-Tome P., Sperber G.O., Cadeddu M., Grandi N., Blikstad V., Tramontano E., Blomberg J. Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common. *Retrovirology*. 2016; 13: 7–36. DOI: 10.1186/s12977-015-0232-y.
- Wilkinson D.A., Mager D.I., Leong J.A.C. Human endogenous retroviruses. In: Levy J.A. (ed.) *The Retroviridae*. New York: Plenum Press, 1994: 465–553.
- Tristem M. Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J. Virology*. 2000; 74: 3715–3730.
- Gifford R., Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes*. 2003; 26: 291–315.
- Kwon H.J., Han H.J., Lee W.J., Kim H.S., Jang K.L. Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein. *Virus Res.* 2002; 86: 93–100.
- Cedeno-Laurent F., Gomes-Flores M., Mendes N. New insight into HIV-1 primary skin disorders. *J. Int. AIDS Soc.* 2011; 14: 5–16.
- Гольдина И.А., Митрофанов И.М., Павлов В.В., Гайдуль К.В. Механизмы активации эндогенных ретровирусов человека: суперинфекция *Chlamydia trachomatis*. Российский иммунологический журнал. 2013; 7 (16): 230. [Goldina I.A., Mitrofanov I.M., Pavlov V.V., Gaidul K.V. The mechanisms of endogenous retroviruses activation: *Chlamydia Trachomatis superinfection*. *Rossiiskii immunologicheskii jurnal – Russian Journal of Immunology*. 2013; 7 (16): 230 (in Russ.)].
- Goldina I.A., Pavlov V.V., Mitrofanov I.M., Gaidul K.V. Human endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 expression in coxae arthroplastic. *Eur. J. Nat. History*. 2014; 1: 10–14. URL: <http://www.world-science.ru/euro/502-33236>.
- Rolland A., Jouvin-Marche E., Viret C., Faure M., Peron H., Marche P.N. The envelope protein of a human endogenous retrovirus W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J. Immunol.* 2006; 176: 7636–7644.
- Haraguchi S., Good R.A. A potent immunosuppressive retroviral peptide: cytokine patterns and signaling pathways. *Immunol. Res.* 2008; 41: 46–55. DOI: 10.1007/s12026-007-0039-6.
- Смагин А.А., Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Любарский М.С. Исследование пролиферативной активности мононуклеарных клеток крови больных рассеянным склерозом при воздействии пептида региона envelope эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1. *Медицинская иммунология*. 2013; 4: 52–59. [Smagin A.A., Goldina I.A., Gaidul K.V., Lubarsky M.S. The investigation of blood mononuclear cells proliferative activity under the endogenous retrovirus envelope region peptide influence. *Meditsinskaya immunologia – Medical Immunology*. 2013; 4: 52–59 (in Russ.)].
- Гольдина И.А., Сафронова И.В., Гайдуль К.В. Иммунотропные свойства эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1. Российский иммунологический журнал. 2013; 7 (16): 231. [Goldina I.A., Safronova I.V., Gaidul K.V. The endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 immunotropic properties. *Rossiiskii immunologicheskii jurnal – Russian Journal of Immunology*. 2013; 7 (16): 231 (in Russ.)].
- Hu X., Zhu W., Chen S., Liu Y., Sun Z., Geng T., Wang X., Gao B., Song C., Qin A., Cui H. Expression of the *env* gene from the avian endogenous retrovirus ALVE and regulation by miR-155. *Arch. Virol.* 2016; 161 (6): 1623–1632. DOI: 10.1007/s00705-016-2833-8.
- Li F., Karlsson H. Expression and regulation of human endogenous retrovirus W elements. *APMIS*. 2016; 124 (1-2): 52–66. DOI: 10.1111/apm.12478.
- Miousse I.R., Chalbot M.C., Lumen A., Ferguson A., Kavouras I.G., Koturbash I. Response of transposable elements to environmental stressors. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2015; 765: 19–39. DOI: 10.1016/j.mrrev.2015.05.003.

23. Yi J.M., Kim H.S. Molecular phylogenetic analysis of the human endogenous retrovirus E (HERV – E) family in human tissues and human cancers. *Genes Genet.* 2007; 82(1): 89–98.
24. Blank M. Cross-talk of the environment with the host genome and the immune system through endogenous retroviruses in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009; 18: 1136–1143.
25. Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Смагин А.А., Сафронова И.В., Гольдин Б.Г., Павлов В.В., Любарский М.С., Козлов В.А. Экспрессия гена *envelope* эндогенного ретровируса человека I класса в мононуклеарных клетках крови больных рассеянным склерозом. *Молекулярная медицина.* 2011; 1: 31–35. [Goldina I.A., Gaidul K.V., Smagin A.A., Safronova I.V., Goldin B.G., Pavlov V.V., Lubarsky M.S., Kozlov V.A. The I class human endogenous retrovirus *envelope* gene expression in blood cells of multiple sclerosis patients. *Molekuliarnaya medicina – Molecular Medicine.* 2011; 1: 31–35 (in Russ.)].
26. Perron H., Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2010; 39: 51–61.
27. Balestrieri E., Pica F., Matteucci C., Zenobi R., Sorrentino R., Argaw-Denboba A., Cipriani C., Bucci I., Sinibaldi-Vallebona P. Transcriptional activity of human endogenous retroviruses in human peripheral blood mononuclear cells. *HPC BioMed. Res. Intern.* 2015; article ID 164529, 9. DOI: org/10.1155/2015/164529.
28. Perot P., Mugnier N., Montgiraud C., Gimenez J., Jailard M., Bonnaud B., Mallet F. Microarray-based sketches of the HERV transcriptome landscape // *PLoS One.* 2012; 7 (6): e40194. DOI: 10.1371/journal.pone.0040194.
29. Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Маркова Е.В., Козлов В.А. Клеточный иммунный ответ при воздействии рекомбинантного пептида, гомологичного аминокислотной последовательности эндогенного ретровируса человека I класса HERV-E λ 4-1. Вестник уральской медицинской академической науки. 2009; 2/1 (35): 28–30. [Goldina I.A., Gaidul K.V., Markova E.V., Kozlov V.A. The cell immune response under the influence of aminoacid sequence of the I class endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 recombinant peptide. *Vestnik uralskoy medicinskoj akademicheskoy nauki – The Herald of Ural's Medical Academic Science.* 2009; 2/1(35): 28–30 (in Russ.)].
30. Гольдина И.А., Гайдуль К.В. Морфофункциональные параметры лимфоидных органов мышей при воздействии рекомбинантного пептида p15E эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1. Вестник уральской медицинской академической науки. 2011; 2/1 (35): 28–29. [Goldina I.A., Gaidul K.V. The morphofunctional parameters of the mice lymphoid organs under the influence of transmembrane protein p15E recombinant peptide. *Vestnik uralskoy medicinskoj akademicheskoy nauki – The Herald of Ural's Medical Academic Science.* 2011; 2/1 (35): 28–29 (in Russ.)].
31. Wu Z., Mei X., Zhao D., Sun Y., Song Y., Pan W., Shi W. DNA methylation modulates HERV-E expression in CD 4+ T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J. Dermatol. Sci.* 2015; 77(2): 110–116. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.12.004.
32. Chiappinelli K.B., Strissel P.L., Desrichard A., Li H., Henke C., Akman B., Hein A., Rote N.S., Cope L.M., Snyder A., Makarov V., Buhu S., Slamon D.J. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell.* 2015; 162 (5): 974–986. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.011.
33. Papp G., Horvath I.F., Gyimesi E., Barath S., Vegh J., Szodoray P., Zeher M. The assessment of immune-regulatory effects of extracorporeal photopheresis in systemic sclerosis: a long-term follow-up study. *Immunol. Res.* 2016; 64 (2): 404–411. DOI: 10.1007/s12026-015-8678-5.
34. Schmitt S., Johnson T.S., Karakhanova S., Naher H., Mahnke K., Enk A.H. Extracorporeal photopheresis augments function of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells by triggering adenosine production. *Transplantation.* 2009; 88(3): 411–416. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181aed927.
35. Suchankova J., Legartova S., Sehnalova P., Kozubek S., Valente S., Labella D., Mai A., Eckerich C., Fackelmayer F.O., Sorokin D.V., Bartova E. PRMT1 arginine methyltransferase accumulates in cytoplasmic bodies that respond to selective inhibition and DNA damage. *Eur. J. Histochem.* 2014; 58 (2): 2389. DOI: 10.4081/ejh.2014.2389.
36. Wang D., Huang J.H., Zeng Q.H., Gu C., Ding S., Lu J.Y., Chen J., Yang S.B. Increased 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation protein expression in ultraviolet B-irradiated HaCaT cells. *Chin. Med.* 2017; 130 (5): 594–599. DOI: 10.4103/0366-6999.200539.
37. Yang A.Y., Lee J.H., Shu L., Zhang C., Su Z.Y., Lu Y., Huang M.T., Ramires C., Pung D., Huang Y., Verzi M., Hart R.P., Kong A.N. Genome-wide analysis of DNA methylation in UVB- and DMBA/TPA-induced mouse skin cancer models. *Life Sci.* 2014; 113 (1–2): 45–54. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.031.

Поступила в редакцию 04.07.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Гольдина Ирина Александровна, науч. сотрудник, лаборатория регуляции иммунорезиса, НИИФиКИ, г. Новосибирск.
Гайдуль Константин Валентинович, д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории регуляции иммунорезиса, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, науч. руководитель НИИФиКИ, г. Новосибирск.

(✉) Гольдина Ирина Александровна, e-mail: igoldina@mail.ru.

УДК 616-008.853.3:578.828:575.113.12

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-36-44

For citation: Goldina I.A., Gaidul K.V., Kozlov V.A. UVI-induced endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 expression in blood mononuclear cells. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 36–44.

UVI-induced endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 expression in blood mononuclear cells

Goldina I.A., Gaidul K.V., Kozlov V.A.

Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (SRIFCI)
14, Yadrincevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

ABSTRACT

The influence of various environmental factors indirectly, through the epigenetic mechanisms of regulation of gene expression, can lead to the activation of human endogenous retroviruses. The purpose of this study was to investigate the possibility of activation of the first class HERV-E λ 4-1 (ER λ 4-1) endogenous retrovirus as a result of exposure to UV radiation in vitro.

Materials and methods. Blood mononuclear cells (MNCs) of conditionally healthy individuals in a concentration of $20 \times 10^6/\text{ml}$ were exposed to UV irradiation for 5 minutes on an ultraviolet radiator at a wavelength of 340 nm and a radiation intensity of $50 \text{ W}/\text{m}^2$ in vitro. After irradiation, the cell samples were cultured for 24 hours in a complete culture medium in a CO_2 incubator. Then, in these cell culture samples the proliferative activity, based on the incorporation of tritium labeled thymidine, a viability, by the trypan blue staining, and ER-E λ 4-1 expression by the reverse transcriptase polymerase chain reaction method, were determined.

The main results. UV irradiation of mononuclear cell cultures for 5 minutes did not leads to the changes in their viability and functional activity. The study of the of the env ER λ 4-1 gene expression frequency in the MNC of donor's blood before and after the exposure to UV radiation revealed the differences in this index. Thus, before the exposure to UV radiation, the expression rate of env ER- λ 4-1 was 4.4% (2/45), whereas after the irradiation its expression was determined much more often 24% (11/45). Along with an increase in the expression frequency, an augmentation in the mRNA level of the env gene ER- λ 4-1 was also observed.

Conclusion. Thus, the exposure to ultraviolet radiation with the intensity of $50 \text{ W}/\text{m}^2$ for 5 minutes on blood mononuclear cells of conditionally healthy individuals in vitro leads to activation of the human endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1: an increase of its expression frequency and the level of mRNA.

Key words: human endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1, activation, UV-irradiation, blood mononuclear cells.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 64 of April 10, 2017).

Received 10.07.2017

Accepted 06.02.2018

Goldina Irina A., Researcher, Regulation Immunopoiesis Laboratory, SRIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Gaidul Konstantin V., DM, Professor, Head of the Regulation Immunopoiesis Laboratory, SRIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Head of SRIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) Goldina Irina A., e-mail: igoldina@mail.ru.

УДК 616.831.31-007.21-06:616.853

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-45–52

Для цитирования: Гузева В.И., Охрим И.В., Касумов В.Р., Гузева О.В., Гузева В.В., Максимова Н.Е. Особенности симптоматической эпилепсии и другие неврологические нарушения у детей с лиссэнцефалией. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 45–52.

Особенности симптоматической эпилепсии и другие неврологические нарушения у детей с лиссэнцефалией

Гузева В.И., Охрим И.В., Касумов В.Р., Гузева О.В., Гузева В.В., Максимова Н.Е.

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет (СПбГПМУ)
Россия, 194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

РЕЗЮМЕ

Пороки развития головного мозга являются одной из частых причин возникновения эпилепсии в детском возрасте. У пациентов с пороками развития головного мозга эпилепсия диагностируется в 75–80% случаев.

Лиссэнцефалия представляет собой кортикальную мальформацию, которая развивается в результате глобальных нарушений нейронально-глиальной миграции. В качестве вероятной ее причины рассматривается ухудшение «транспортной» функции специфических астроцитов и радиальных глиальных волокон, участвующих в миграции зародышевых клеток. Отсутствие извилин в зрелом мозге (агирия) является морфологическим субстратом полной лиссэнцефалии, наличие лишь единичных, рудиментарных и утолщенных извилин (пахигирия) — неполной лиссэнцефалии. Клинические проявления лиссэнцефалии представлены задержкой психомоторного развития, спастической тетраплегией и резистентной эпилепсией.

Цель работы — изучить и сопоставить клинико-электрофизиологические и нейровизуализационные результаты обследования детей с лиссэнцефалией, оценить эффективность противоэпилептической терапии и выявить частоту фармакорезистентных форм эпилепсии.

Материалы и методы. Проанализированы данные анамнеза, результаты неврологического осмотра, семиотика эпилептических приступов, данные нейровизуализационных и электрофизиологических исследований 22 пациентов с лиссэнцефалией, которые проходили обследование и лечение в отделении психоневрологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета в 2012–2015 гг.

Результаты. При нейровизуализационном обследовании в равной степени выявлены пахирия и агирия, с преимущественной локализацией мальформации в лобных отделах головного мозга. В подавляющем большинстве случаев при клиническом обследовании выявлено наличие моторного дефицита, когнитивных и поведенческих нарушений. Дебют эпилептических приступов достоверно чаще наблюдался в возрасте до 6 мес. Чаще отмечались эпилептические спазмы и фокальные эпилептические приступы как со вторичной генерализацией, так и без нее. Корреляция нейровизуализационных и электроэнцефалографических данных отмечалась у половины обследованных детей.

Выводы. В терапии эпилептических приступов у пациентов преобладали препараты вальпроевой кислоты. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что одной из частых причин

✉ Касумов Вугар Рауфович, e-mail: vugar24@mail.ru.

тяжелых форм эпилепсии являются пороки развития головного мозга, поэтому их ранняя диагностика, адекватное консервативное и хирургическое лечение способствуют снижению частоты формирования фармакорезистентности эпилепсии и инвалидизации больных.

Ключевые слова: эпилепсия, пороки развития головного мозга, лиссэнцефалия, симптоматическая эпилепсия.

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия – одна из важнейших проблем психиатрии, неврологии и нейрохирургии [1–4]. Выявление этиологического фактора эпилептических приступов является одной из основных задач в работе клиницистов, поскольку часто определяет прогноз и тактику лечения детей с симптоматической эпилепсией [1–3, 5–7].

Возможности современной нейровизуализации и электрофизиологических методов диагностики позволяют определить роль пороков головного мозга в этиопатогенезе эпилепсии и прогнозе заболевания [5, 7, 8–11]. Наиболее информативным методом в диагностике структурных изменений является магнитно-резонансная томография (МРТ), позволяющая прицельно изучить соотношение серого и белого вещества головного мозга, а также исключить новообразования и травмы [1, 2, 12, 13].

Эпилепсия, интеллектуальный, когнитивный, поведенческий и неврологический дефицит являются основными клиническими проявлениями разнообразных пороков головного мозга. По результатам некоторых эпидемиологических исследований отдельных нозологических форм кортикальных мальформаций известно, что они являются этиологическими факторами в 37,6% всех случаев эпилепсии [7, 10, 13, 14]. Резистентность к антиэпилептической терапии при наличии

выявленного порока головного мозга может служить показанием к хирургическому лечению. По данным зарубежных авторов, среди пациентов с рефрактерными эпилепсиями, подвергшихся хирургическому лечению, у 30–75% детей раннего возраста причиной фармакорезистентности оказались пороки головного мозга [1, 2, 15–19].

Цель исследования: изучить и сопоставить клиничко-электрофизиологические и нейровизуализационные результаты обследования детей с лиссэнцефалией, оценить эффективность противоэпилептической терапии и выявить частоту фармакорезистентных форм эпилепсии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 22 ребенка с лиссэнцефалией (ЛЭ), у 20 (91%) диагностирована эпилепсия. У всех детей изучен анамнез, проведен неврологический осмотр, выполнены нейровизуализационные и электрофизиологические исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании приняли участие 15 мальчиков (68%), семь девочек (32%). Данные о пациентах в исследуемой группе (пол, возраст дебюта эпилептических приступов) продемонстрированы на рис. 1.

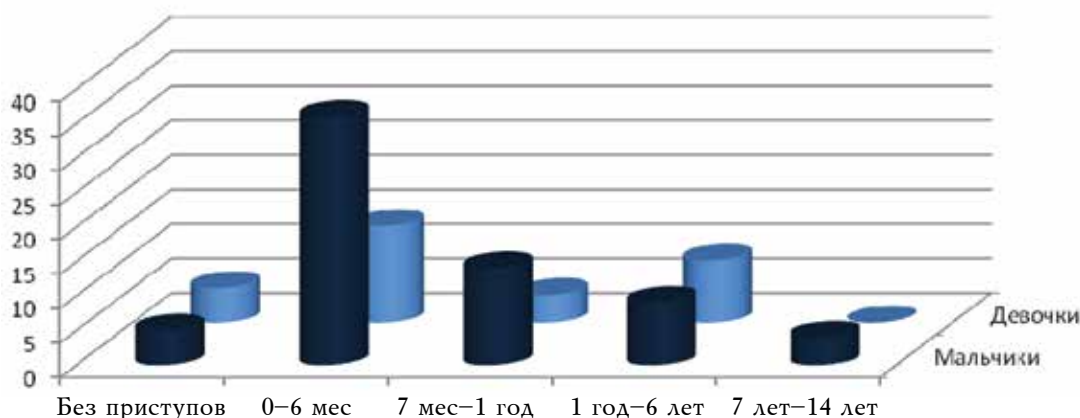


Рис. 1. Распределение пациентов по полу и возрасту дебюта эпилептических приступов ($n = 22$), %

Fig. 1. Distribution of patients by sex and onset age of epileptic seizures ($n = 22$), %

Дебют эпилептических приступов максимально представлен в возрастном периоде от рождения до 6 мес у восьми мальчиков и трех девочек (50%). С 7 мес до 1 года эпилептические приступы зарегистрированы у трех мальчиков и одной девочки (18%). В периоде с 1 года до 6 лет – у двух мальчиков и двух девочек (18%). С 7 лет до 14 – у одного мальчика (5%). У одного мальчика и одной девочки (9%) эпилептических приступов не отмечалось. Дебют эпилептических приступов

у детей с лиссэнцефалией максимально отмечался в возрастном периоде с рождения до 1 года – 15 пациентов (68%).

Всем детям проводились МРТ головного мозга и электроэнцефалография (ЭЭГ) (табл. 1).

В табл. 1 представлены сведения о выявленных структурных изменениях головного мозга и семиотике эпилептических приступов у обследованных детей.

Т а б л и ц а 1

Данные МРТ головного мозга, ЭЭГ исследования, семиотика эпилептических приступов у детей с лиссэнцефалией			
Количество пациентов	Область структурного поражения головного мозга	Изменения на ЭЭГ	Вид приступов
11	Пахигирия: Лобная – 3 Височная – 1 Затылочная – 2 Лобно-теменная – 1 Лобная, теменная, затылочная – 2 Лобная, теменная, височная – 2	Диффузные изменения биоэлектрической активности головного мозга – 21 Задержка созревания возрастного ритма – 9 Сочетание диффузных и очаговых изменений – 16	ФП, ФСВГ – 2 ЭС – 2 МА – 1 БП – 2
	Диффузная агирия – 3	Региональная эпилептиформная активность – 16 Генерализованная эпилептиформная активность (в том числе гипсаритмия) – 6 (5) Эпилептиформная активность не зарегистрирована – 3	ФСВГ – 1 ЭС – 3 МА – 1 ГП – 1 А – 1
6	Локальная агирия: Лобная – 2 Лобно-теменная – 1 Теменно-затылочная – 1 Левая лобная, теменная, затылочная – 1 Правая лобная, теменная, затылочная – 1		ФСВГ – 4 ЭС – 4 МА – 1
2	Агирия, пахигирия: Правая лобная, теменная, затылочная – 2		ФП, ФСВГ – 2 ЭС – 2 ГП – 2 А – 1
Всего	Пахигирия – 11 Агирия – 9 Агирия, пахигирия – 2		ФП, ФСВГ – 9 ЭС – 11 МА – 3 ГП – 3 А – 2 БП – 2

П р и м е ч а н и е. ФП – фокальные приступы; ФСВГ – фокальные с вторичной генерализацией приступы; ЭС – эпилептические спазмы; МА – миоклонически-астатические приступы; ГП – генерализованные приступы; А – абсансы; БП – без приступов.

Пахигирия диагностирована у 11 пациентов (50%) с наиболее частой локализацией в лобной области ($n = 8$; 73%). У пациентов с пахигией в равной степени наблюдались эпилептические спазмы (18%), фокальные и фокальные с вторичной генерализацией приступы (18%). У двух пациентов с пахигией за период наблюдения эпилептические приступы не зарегистрированы.

Агирия выявлена у девяти детей (41%), в сочетании с пахигией – у двух (9%). У пациен-

тов с агирией чаще наблюдались эпилептические спазмы ($n = 9$; 82%), фокальные и фокальные с вторичной генерализацией приступы ($n = 7$; 64%). У пяти пациентов зафиксировано сочетание различных типов эпилептических приступов.

Характеристика изменений на ЭЭГ у больных с эпилептическими пароксизмами более подробно представлена в табл. 2. Соответствие изменений на ЭЭГ и локализации выявленных морфологических изменений в группе детей с лиссэнцефалией составляет 45%.

Т а б л и ц а 2

Характер изменений на ЭЭГ в группе детей с лиссэнцефалией и эпилепсией				
Изменения на ЭЭГ	Кол-во детей	Доля от общего числа детей с эпилепсией, %	Локализация очага, кол-во больных	Анатомо-электроэнцефалографическая корреляция, кол-во больных (%)
Генерализованная эпилептиформная активность (в том числе гипсаритмия)	6 (5)	30	—	—
Региональная /региональная с вторичной генерализацией эпилептиформная активность	14	70	Лобная, 3 Височная, 4 Лобно-височная / теменная, 4 Мультифокальная (три и более очагов), 3	9 (45)
Всего детей с эпилепсией		20		10 (45)
Всего детей в группе			22	

Распределение по типам эпилептических приступов в группе детей с лиссэнцефалией представлено на рис. 2.

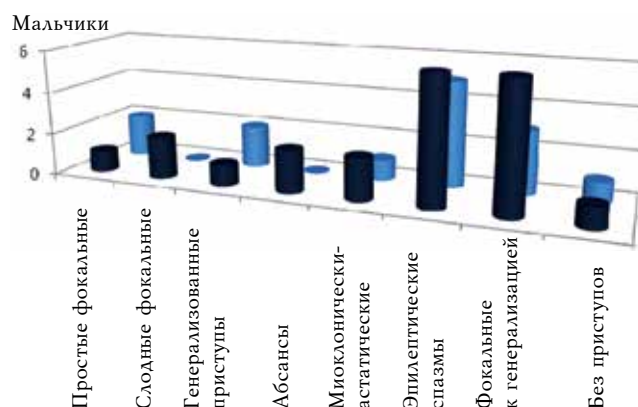


Рис. 2. Клинические проявления эпилепсии у детей с лиссэнцефалией

Fig. 2. Clinical manifestations of epilepsy in children with lissencephaly

Проанализированы частота и семиотика эпилептических приступов у пациентов с лиссэнцефалией ($n = 22$). Статистически значимо чаще наблюдались эпилептические спазмы (50%, $p < 0,01$) и фокальные с вторичной генерализацией или без вторичной генерализации приступы ($n = 9$; 41%). Реже – генерализованные ТКС ($n = 3$; 14%), абсансы ($n = 2$; 9%). У 10 детей (46%) отмечалось сочетание различных эпилептических приступов. У двух пациентов (9%) эпилептические приступы не зафиксированы.

В табл. 3 представлена характеристика неврологического статуса детей с лиссэнцефалией.

У 20 пациентов (91%) выявлены отклонения в неврологическом статусе. Тяжелые двигательные нарушения с формированием парезов, нарушением иннервации бульбарной группы черепных

нервов – у 12 мальчиков и пяти девочек (77%). Мышечная гипотония – у двух мальчиков и одной девочки (14%). Поражение экстрапирамидной системы в виде гиперкинезов, атаксии – у двух мальчиков и пяти девочек (32%). У 20 детей данной группы отмечались интеллектуально-мнестические нарушения разной степени тяжести (91%).

Т а б л и ц а 3

Результаты клинического обследования детей с лиссэнцефалией ($n = 22$)		
Особенности неврологического статуса	Мальчики	Девочки
Двигательные нарушения, парезы	12	5
Атаксия, гиперкинезы	2	5
Мышечная гипотония	2	1
Стигмы дизэмбриогенеза	4	2
ЗПМРР, когнитивные нарушения	14	6
Без особенностей	1	1

Примечание. ЗПМРР – задержка психомоторного и речевого развития.

Антиэпилептические препараты использовались в терапии эпилепсии у детей с лиссэнцефалией в монотерапии и политерапии в среднетерапевтических дозировках, с учетом их индивидуальной переносимости и эффективности. Частота применения противоэпилептических препаратов представлена на рис. 3.

Все 20 пациентов с эпилепсией получали вальпроаты (100%). Топирамат использовался в лечении у шести пациентов (30%), вигабатрин – у пяти (25%), леветирацетам, производные карбоксиамида и АКТГ – у четырех (20%), бензодиазепины и фенобарбитал – у трех (15%). Бензонал назначен одному пациенту (5%). Два пациента с лиссэнцефалией антиэпилептическую терапию не получали в связи с отсутствием эпилептических приступов и патологических изменений на ЭЭГ.

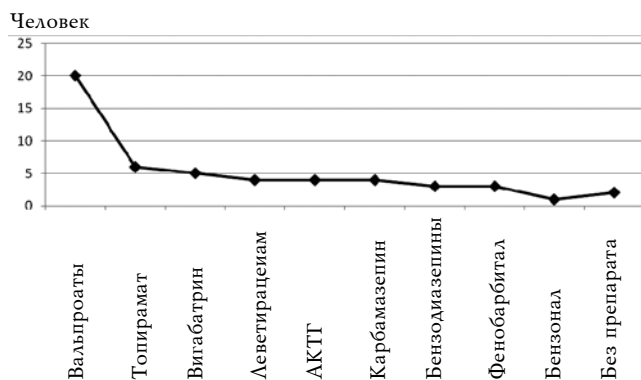


Рис. 3. Частота применения антиэпилептических препаратов в лечении эпилепсии у детей с лиссэнцефалией

Fig. 3. The frequency of antiepileptic drug administration when treating epilepsy in children with lissencephaly

При анализе результатов лечения эпилепсии у детей с ЛЭ ($n = 20$) выявлены следующие показатели: ремиссия приступов наблюдалась у двух (10%) детей, урежение приступов — у 10 (50%), отсутствие эффекта от проводимой терапии — у двух (10%), трансформация судорог — у шести (30%). Положительная динамика на ЭЭГ зарегистрирована у двух (10%) пациентов. Ухудшение либо отсутствие положительных электроэнцефалографических изменений — у 18 (90%). У двух пациентов с лиссэнцефалией эпилептические приступы не зафиксированы, на ЭЭГ эпилептической активности не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У 22 детей с лиссэнцефалией при нейровизуализационном обследовании в равной степени выявлены пахикирия (50%) и агирия (50%). Локализация мальформации наблюдалась чаще в лобной области ($n = 12$; 55%), диффузная агирия выявлена у трех пациентов (14%).

У части обследованных пациентов ЛЭ ассоциирована с последствиями гипоксически-ишемического поражения головного мозга ($n = 5$; 23%), с агенезией и (или) гипоплазией мозолистого тела ($n = 2$; 9%), с гипоплазией полушарий или червя мозжечка ($n = 2$; 18%), вентрикуломегалией ($n = 6$; 27%). У двух пациентов (9%) лиссэнцефалия сочеталась с полимикригией, фокальной корковой дисплазией и нейрональной клеточной гетеротопией.

Дебют эпилептических приступов достоверно чаще отмечался в возрасте до 6 мес (50%; $p = 0,03$), установлено преобладание эпилептических спазмов (50%, $p < 0,01$), фокальных эпилептических приступов с вторичной генерализацией и без вторичной генерализации ($n = 9$; 41%).

При клиническом обследовании выявлено наличие моторного дефицита ($n = 20$; 91%), когнитивных и поведенческих нарушений ($n = 20$; 91%). У двух детей с пахикирией не выявлено отклонений в неврологическом статусе. У детей с эпилепсией ($n = 20$) выявлена нейровизуализационно-электроэнцефалографическая корреляция в 45% случаев ($n = 9$).

В терапии эпилептических приступов у пациентов с ЛЭ чаще использовались вальпроаты (100%). Реже — топирамат (30%), вигабатрин (25%), АКТГ, леветирацетам, производные карбоксиамида (20%), бензодиазепины (15%), фенобарбитал (15%), бензонал (5%). Два пациента терапию не получали в связи с отсутствием приступов.

Таким образом, 20 пациентов с симптоматической эпилепсией и лиссэнцефалией направлены в клинику на лечение в связи с наличием резистентных к терапии эпилептических приступов. На основании анализа жалоб, клинико-анамнестических данных, семиотики приступов, комплексного стационарного обследования проведена коррекция антиэпилептической терапии согласно Клиническим рекомендациям по лечению эпилепсии у детей. В период лечения и при контрольном обследовании 20 больных с эпилепсией наблюдались положительные результаты в виде ремиссии ($n = 2$; 10%), урежения эпилептических приступов на 50–75% ($n = 10$; 50%), положительной динамикой на ЭЭГ ($n = 2$; 10%).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что одной из частых причин тяжелых форм эпилепсии у детей являются пороки развития головного мозга, в частности лиссэнцефалия. Ранняя нейровизуализация и клиническая верификация пороков развития головного мозга, сопровождающихся тяжелыми формами эпилепсии и другими неврологическими нарушениями у детей, способствуют своевременному назначению адекватно подобранного противоэпилептического и нейрохирургического лечения. Это снижает долю формирования фармакорезистентной эпилепсии, инвалидизации детей и, следовательно, способствует улучшению качества их жизни.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Гузева В.И. — разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, написание рукописи статьи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Охрим И.В. — проведение прак-

тической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Касумов В.Р. – проведение практической части исследования, разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания. Гузева О.В. – проведение практической части исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания. Гузева В.В. – проведение практической части исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания. Максимова Н.Е. – проведение практической части исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом СПбГПМУ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Айвазян С.О. Фокальные корковые дисплазии: алгоритм предоперационного обследования. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2012; 3: 6–12. [Ayvazyan S.O. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya – Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2012; 3: 6–12 (in Russ.)].
2. Гузева В.И. Детская неврология. Клинические рекомендации; под ред. В.И. Гузевой. Вып. 1. М.: ИМКВ, 2015: 326. [Guzeva V.I. *Pediatric Neurology. Clinical recommendations*; V.I. Guzeva (ed.). Is. 1. M.: IMKV Publ., 2015: 326 (in Russ.)].
3. Гузева В.И. Эпилепсия и неэпилептические пароксизмальные состояния у детей. 3-е изд. М.: МИА, 2007: 568. [Guzeva V.I. *Epilepsy and non-epileptic paroxysmal conditions in children*. 3 is. M.: MIA Publ., 2007: 568 (in Russ.)].
4. Гузева В.И., Скоромец А.А. Медицинские и социальные аспекты детской эпилепсии. *Журн. неврологии и психиатрии*. 2005; 105 (9): 64–65. [Guzeva V.I., Skoromets A.A. Medical and social aspects of childhood epilepsy. *Zhurnal neurologii i psikiatrii – Journal Neurology and Psychiatry*. 2005; 105 (9): 64–65 (in Russ.)].
5. Охрим И.В. Особенности диагностики, лечения и прогноза симптоматических эпилепсий у детей с пороками развития головного мозга: дис. ... канд. мед. наук. СПб, 2016: 200. [Okhrim I.V. *Peculiarities of diagnosis, treatment and prognosis of symptomatic epilepsy in children with malformations of the brain*: dis. ... kand. med. nauk. St. Petersburg, 2016: 200 (in Russ.)].
6. Rösch J., Hamer H.M., Mennecke A. et al. 3T-MRI in patients with pharmacoresistant epilepsy and a vagus nerve stimulator: a pilot study. *Epilepsy research*. 2015; 110: 62–70.
7. Hunt R.F., Dinday M.T., Hindle-Katel W. et al. LIS1 deficiency promotes dysfunctional synaptic integration of granule cells generated in the developing and adult dentate gyrus. *The J. of Neuroscience*. 2012. 32 (37): 2862–2875.
8. Алиханов А.А., Петрухин А.А., Мухин К.Ю. Магнитно-резонансная томография с высоким разрешением в оценке эпилептогенных поражений мозга. *Русский журнал детской неврологии*. 2006. 1: 18–24. [Alikhanov A.A., Petrukhin A.A., Mukhin K.Yu. *Magnetic resonance imaging with high resolution in the evaluation of epileptogenic brain lesions*. *Russkiy zhurnal detskoy neurologii – Russian Journal of Pediatric Neurology*. 2006; 16: 18–24 (in Russ.)].
9. Гузева В.И., Гузева О.В., Гузева В.В. Роль видео-ЭЭГ мониторинга в диагностике эпилептических и неэпилептических пароксизмальных состояний у детей. *Эпилепсия*. 2010; 3: 12–19. [Guzeva V.I., Guzeva O.V., Guzeva V.V. *The role of video EEG monitoring in the diagnosis of epileptic and non-epileptic paroxysmal conditions in children*. *Epilepsiya – Epilepsy*. 2010; 3: 12–19 (in Russ.)].
10. Уэстбрук К., Каут Рот К., Тэлбот Дж. Магнитно-резонансная томография. М.: Бином; Лаборатория знаний, 2012: 448. [Uestbruk K., Kaut Rot K., Telbot Dzh. *Magnetic resonance imaging*. M.: Binom Publ.; Laboratoriya znaniy Publ., 2012: 448 (in Russ.)].
11. Classen S., Goecke T., Drechsler M. et al. A novel inverted 17p13.3 microduplication disrupting PAFAH1B1 (LIS1) in a girl with syndromic claspencephaly. *Amer. J. of Med. Genetics*. Pt. A. 2013; 161 (6): 1453–1458.
12. Гузева В.И. Федеральное руководство по детской неврологии; под ред. проф. В.И. Гузевой М: ООО «МК», 2016: 656. [Guzeva V.I. *Federal Guideline for Pediatric Neurology*; prof. Guzeva V.I. (ed.) M: ООО «МК» Publ., 2016: 656 (in Russ.)].
13. Шулейкина К.В., Хаютин С.Н. Нейроонтогенез. М.: Наука, 1985: 270. [Shuleykina K.V., Khayutin S.N. *Neuro-ontogenesis*. M.: Nauka Publ., 1985: 270 (in Russ.)].
14. Forss N., Mäkelä J.P., Jäskeläinen J. et al. Magnetoencephalography in neurosurgery. *Neurosurgery*. 2006; 59 (3): 493–511.
15. Гузева В.И., Гузева В.В., Гузева О.В. Особенности современной терапии эпилепсии у детей. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2014; 4: 83–84. [Guzeva V.I., Guzeva V.V., Guzeva O.V. *Features of modern therapy of epilepsy in children*. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya – Epilepsy and Paroxysmal Conditions*. 2014; 4: 83–84 (in Russ.)].
16. Guerrini R., Carrozzo R. Epilepsy and genetic malformations of the cerebral cortex. *Amer. J. of Med. Genetics*. 2001; 106 (2): 160–173.
17. Guerrini R. Genetic malformations of the cerebral cortex and epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46 (1): 32–37.
18. Guerrini R., Duchowny M., Jayakar P. et al. Diagnostic methods and treatment options for focal cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2015; 56 (11): 1669–1686.
19. Mathew T., Srikanth S.G., Satishchandra P. Malformations of cortical development (MCDs) and epilepsy: Experience from a tertiary care center in south India. *Seizure*. 2010; 19 (3): 147–152.

Поступила в редакцию 09.10.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Гузева Валентина Ивановна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии нейрохирургии и медицинской генетики, СПбГПМУ, г. Санкт-Петербург.

Охрим Инна Владимировна, канд. мед. наук, доцент, кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, СПбГПМУ, г. Санкт-Петербург.

Касумов Вугар Рауфович, д-р мед. наук, доцент, кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, СПбГПМУ, г. Санкт-Петербург.

Гузева Оксана Валентиновна, д-р мед. наук, доцент, кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, СПбГПМУ, г. Санкт-Петербург.

Гузева Виктория Валентиновна, д-р мед. наук, доцент, кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, СПбГПМУ, г. Санкт-Петербург.

Максимова Надежда Евгеньевна, ассистент, кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, СПбГПМУ, г. Санкт-Петербург.

(✉) Касумов Вугар Рауфович, e-mail: vugar24@mail.ru.

УДК 616.831.31-007.21-06:616.853

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-45-52

For citation: Guzeva V.I., Ochrim I.V., Kasumov V.R., Guzeva O.V., Guzeva V.V., Maksimova N.E. Characteristics of symptomatic epilepsy and other neurological disorders in children with lissencephaly. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 45–52.

Characteristics of symptomatic epilepsy and other neurological disorders in children with lissencephaly

Guzeva V.I., Ochrim I.V., Kasumov V.R., Guzeva O.V., Guzeva V.V., Maksimova N.E.

*Saint Petersburg State Pediatric Medical University (SPSPMU)
2, Litovskaya Str., Saint Petersburg, 194100, Russian Federation*

ABSTRACT

Brain malformations are one of the most frequent causes of epilepsy in childhood. In patients with malformations of the brain epilepsy is diagnosed in 75–80% of cases. Lissencephaly is a cortical malformation, which develops as a result of global violations of glial-neuronal migration. The probable cause of the deterioration is considered to be the “Transportation” function-specific astrocytes and radial glial fibers involved in the migration of germ cells. The absence of convolutions in the mature brain – morphological substrate is agyria full lissencephaly, the presence of only a single, rudimentary and thickened gyri (pachygyria) – incomplete lissencephaly. Clinical manifestations lissencephaly presented delayed psycho-motor development, spastic tetraplegia and intractable epilepsy.

Materials and methods. To examine and compare the clinical, electrophysiological and neuroimaging results in children with symptomatic epilepsy with lissencephaly, to assess the effectiveness of antiepileptic therapy and to identify the frequency of drug-resistant forms of epilepsy. The study involved 22 patients with lissencephaly. In all the children studied anamnesis and neurological examinations were conducted and neuroimaging and electrophysiological studies were performed.

Results. In neuroimaging examinations, pachygyria and agyria were equally identified. The preferential localization pachygyria was observed in the frontal region. In most cases, clinical examination revealed the presence of motor deficits, cognitive and behavioral disorders. The debut of seizures was observed significantly more often in the age of six months. In general, during the observation period focal seizures with secondary generalization like, with or without secondary generalization were more common. Neuroimaging and EEG correlation was noted in half of the children surveyed.

Conclusions. In the treatment of epileptic seizures in patients valproate are used more often. The results of the study suggest that one of the common causes of severe forms of epilepsy in children is malformations of

brain development, so their early diagnosis and adequate antiepileptic therapy correlated with the prevention pharmacoresistance, symptomatic epilepsy and disability in children.

Key words: epilepsy, malformations of brain development, lissencephaly, symptomatic epilepsy.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

All patients signed an informed consent to participate in the study in accordance, approved by the local ethics committee under the SPMU.

Received 09.10.2017

Accepted 06.02.2018

Guzeva Valentina I., DM, Professor, Head of the Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, SPSPMU, Saint Petersburg, Russian Federation.

Okhrim Inna V., PhD, Associate Professor, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, SPSPMU, Saint Petersburg, Russian Federation.

Kasumov Vugar R., DM, Associate Professor, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, SPSPMU, Saint Petersburg, Russian Federation.

Guzeva Oksana V., DM, Associate Professor, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, SPSPMU, Saint Petersburg, Russian Federation.

Guzeva Viktoriia V., DM, Associate Professor, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, SPSPMU, Saint Petersburg, Russian Federation.

Maksimova Nadezhda E., Assistant, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, SPSPMU, Saint Petersburg, Russian Federation.

(✉) **Kasumov Vugar R.**, e-mail: vugar24@mail.ru.

УДК 616.314.3-089.7-06:612.313.5]-092.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-53-58

Для цитирования: Иванова В.В., Мильто И.В., Суходоло И.В. Морфофункциональное состояние эпителиоцитов поднижнечелюстных слюнных желез на фоне многократной ампутации резцов у половозрелых крыс. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 53–58.

Морфофункциональное состояние эпителиоцитов поднижнечелюстных слюнных желез на фоне многократной ампутации резцов у половозрелых крыс

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

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

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

РЕЗЮМЕ

Цель. Провести морфофункциональную характеристику эпителиоцитов ацинусов и протоков поднижнечелюстных слюнных желез (ПСЖ) половозрелых крыс на фоне многократной ампутации резцов.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на половозрелых (возраст 2 мес) белых беспородных самцах крыс, разделенных на группы: интактная, контрольная и группа крыс, подвергшихся многократной ампутации резцов. При помощи гистологических, гистохимических и морфометрических методов оценено морфофункциональное состояние эпителиоцитов протоков и ацинусов ПСЖ половозрелых крыс на 2-, 3-, 4-, 6-, 8-, 10- и 12-й нед после первой ампутации резцов.

Результаты. После многократной ампутации резцов наблюдается увеличение площади ацинусов ПСЖ на 3–10-й нед эксперимента. Функциональная активность клеток протоков и ацинусов поднижнечелюстных желез снижается на 2–4-й нед эксперимента.

Заключение. В результате многократной ампутации резцов в эпителиоцитах ацинусов и протоков ПСЖ крыс развиваются обратимые структурные и функциональные изменения, которые нивелируются к 6- и 12-й нед эксперимента соответственно.

Ключевые слова: гипертрофия, поднижнечелюстные слюнные железы, морфофункциональная характеристика.

ВВЕДЕНИЕ

Поднижнечелюстные слюнные железы (ПСЖ) млекопитающих участвуют в минерализации зубной эмали, увлажнении и lubricации слизистых оболочек ротовой полости, формировании пищевого комка и начальных этапах переваривания [1]. ПСЖ также способны к эндокринной секреции ряда веществ (эпидермаль-

ный фактор роста, фактор роста нервов, калликреин, паротин и т.д.) [2–4], механизмы влияния которых на органы кроветворения, иммунной, выделительной, репродуктивной систем изучены недостаточно. Функционирование слюнных желез изменяется при сахарном диабете, хронической почечной недостаточности, после лучевой и полилекарственной терапии [5]. В связи с этим характеристика функциональных изменений в ПСЖ при моделировании их гипертрофии является актуальной задачей. Для формирования ги-

✉ Иванова Вера Владимировна, e-mail: ivvera92@rambler.ru.

пертрофии ПСЖ грызунов часто используется повторяющаяся ампутация резцов, приводящая к увеличению влажного веса, а также площади клеток ацинусов ПСЖ [4, 6]. Целью нашего исследования стала морфофункциональная характеристика эпителиоцитов ацинусов и протоков ПСЖ половозрелых крыс на фоне многократной ампутации резцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половозрелые белые беспородные крысы-самцы возрастом 2 мес, массой тела (150 ± 20) г были разделены на три группы: ИН – интактная (28 крыс), К – контрольная (28 крыс) и АР – группа животных, подвергшихся ампутации резцов (35 крыс). Нижние и верхние резцы крысам группы АР под наркозом (диэтиловый эфир) подрезали до уровня 1–2 мм выше десневого края в течение 2 нед с промежутком в два дня [6], всего пять ампутаций. Крысы группы К в аналогичные сроки эксперимента подвергались исключительно процедуре наркотизации. Выведение крыс из эксперимента осуществляли на 2-, 3-, 4-, 6-, 8-, 10- и 12-й нед после первой ампутации резцов асфиксией углекислым газом. Выведению животных из эксперимента предшествовала 24-часовая пищевая депривация при свободном доступе к воде.

Срезы ПСЖ толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, для обнаружения РНК – пиронином (контроль с РНКазой) с докраской

метиловым зеленым, для определения гликозаминогликанов (ГАГ) – альциановым синим (рН 2,5) с докраской гематоксилином, для выявления гликопротеинов проводили ШИК-реакцию (контроль с α -амилазой). Условия пробоподготовки (время фиксации биоматериала, толщина среза) и постановки гистохимической реакции на всех срезах были одинаковыми (одновременное окрашивание опытных и контрольных образцов). Площадь ацинусов ПСЖ измеряли при помощи программы ImageJ 1.48. Удельный объем внутридольковых протоков ПСЖ находили методом точечного счета [7]. Проверку распределения на соответствие нормальному закону (критерий Шапиро – Уилка), сравнение морфометрических показателей (критерий Манна – Уитни) осуществляли в программе SPSS 17.0. Результаты морфометрического исследования представлены в виде медианы и квартилей, $Me (Q_1; Q_3)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наркотизация крыс диэтиловым эфиром не влияет на морфофункциональное состояние клеток ПСЖ, тогда как в результате многократной ампутации резцов в эпителиоцитах ацинусов и протоков ПСЖ крыс развиваются обратимые структурные и функциональные изменения. Так, площадь ацинусов ПСЖ крыс АР группы на 3-, 6- и 10-й нед эксперимента выше, чем у животных групп ИН и К ($p < 0,05$, рис. 1, табл. 1).

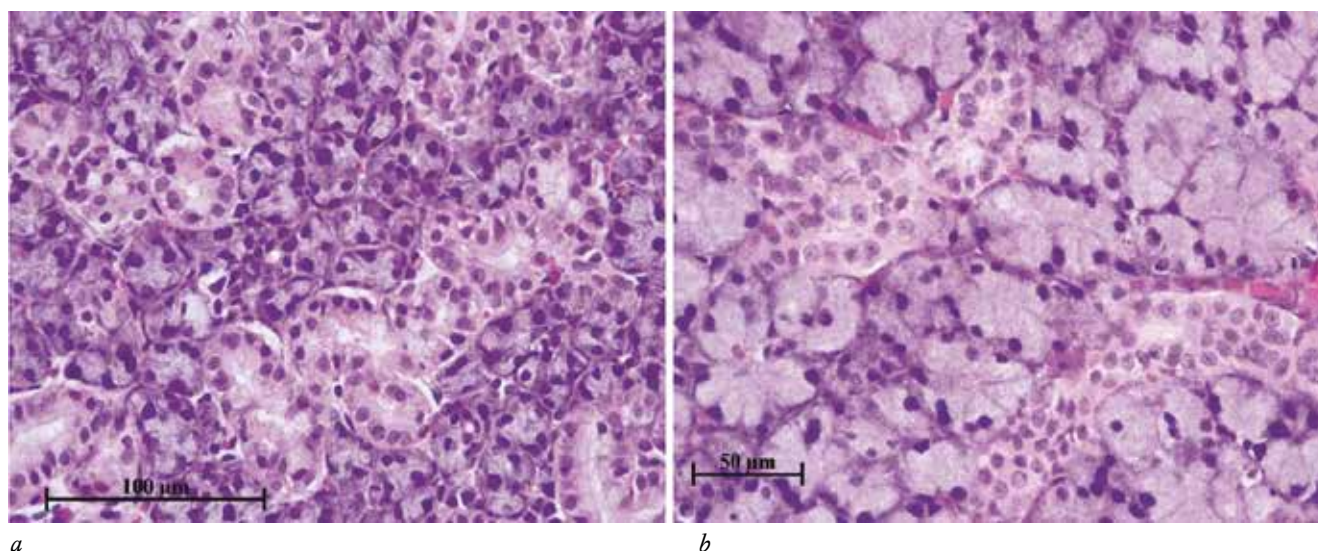


Рис. 1. Поднижнечелюстная железа половозрелой интактной (а) и подвергшейся многократной ампутации резцов крысы (b), 3-я нед эксперимента. Увеличение площади ацинусов и уменьшение количества клеток гранулярных извитых трубок при моделировании гипертрофии железы (b). Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 1. Submandibular gland of a sexually mature intact rat (a) and rat undergone multiple amputations of incisors (b), the third week of the experiment. Increase in acini size and decrease in the number of cells of granular convoluted tubules in the modeling of glandular hypertrophy (b). Staining with hematoxylin and eosin

Т а б л и ц а 1

Площадь ацинусов поднижнечелюстных слюнных желез половозрелых крыс, мкм ² , <i>Me (Q₁; Q₃)</i>							
Группа	Срок эксперимента, нед						
	2	3	4	6	8	10	12
ИН, <i>n</i> = 28	860,5 (731,5; 1006,0)	768,5 (625,0; 867,0)	967,5 (769,3; 1141,8) #	756,4 (551,4; 873,5) #	756,4 (636,5; 874,5)	629,0 (589,8; 765,0)	817,5 (661,8; 1124,8)
К, <i>n</i> = 28	767,0 (738,0; 1472,0)	841,0 (740,5; 1030,5)	954,0 (649,0; 1150,0)	683,0 (558,3; 854,2)	884,0 (640,5; 1030,5)	667,0 (613,0; 855,0)	683,0 (577,0; 1024,5)
АР, <i>n</i> = 35	783,5 (694,3; 870,8) #	1792,5 (1382,2; 2077,5) # *	985,0 (865,8; 1158,3) #	1226,0 (1124,8; 1315,0) # *	806,0 (727,3; 1042,5) #	1275,0 (1035,8; 1390,0) # *	1255,5 (1063,5; 1471,8)

* отличие от аналогичного показателя животных интактной группы; # отличие от показателя предыдущей недели этой же группы, достигнутый уровень значимости $p < 0,05$.

В составе ацинусов ПСЖ на 3-й нед эксперимента обнаруживаются вакуолизированные клетки, а также клетки с морфологическими признаками гибели (кариопикноз, эозинофилия цитоплазмы), не определяющиеся у интактных и контрольных крыс. На 3-й нед эксперимента пиронинофилия ядрышек, а также базального и околоядерного участков цитоплазмы клеток ацинусов ПСЖ крыс АР группы выражена в меньшей степени, тогда как ШИК-реакция цитоплазмы на 2–3-й нед эксперимента представляется интенсивнее, нежели у крыс групп ИН и К (рис. 2). С 3-й нед эксперимента у крыс АР группы в цитоплазме клеток ацинусов ПСЖ обнаруживаются диффузные пылевидные ШИК-позитивные гранулы, не характерные для интактных животных. Выраженность гистохимических изменений (интенсивность пиронинофилии и ШИК-реакции)

в клетках ацинусов ПСЖ крыс АР группы снижается на 4-й нед, отличия полностью нивелируются к 6-й нед эксперимента.

Удельный объем внутридольковых протоков ПСЖ на 2-й неде эксперимента ниже, чем у крыс группы ИН ($p < 0,05$, табл. 2), что сопровождается визуальным снижением количества клеток гранулярных извитых трубок (GST-клеток) у животных группы АР (рис. 2). Ядрышки и базальная часть цитоплазмы GST-клеток крыс группы АР менее пиронинофильны, чем у животных группы ИН на протяжении эксперимента. ШИК-реакция характерна для щеточной каемки апикального полюса клеток внутридольковых протоков ПСЖ крыс групп ИН, К и АР. У крыс АР группы на 3-й нед эксперимента наблюдается запустевание протоков, на 4-й нед в протоках обнаруживается обильное пенное ШИК-позитивное содержимое.

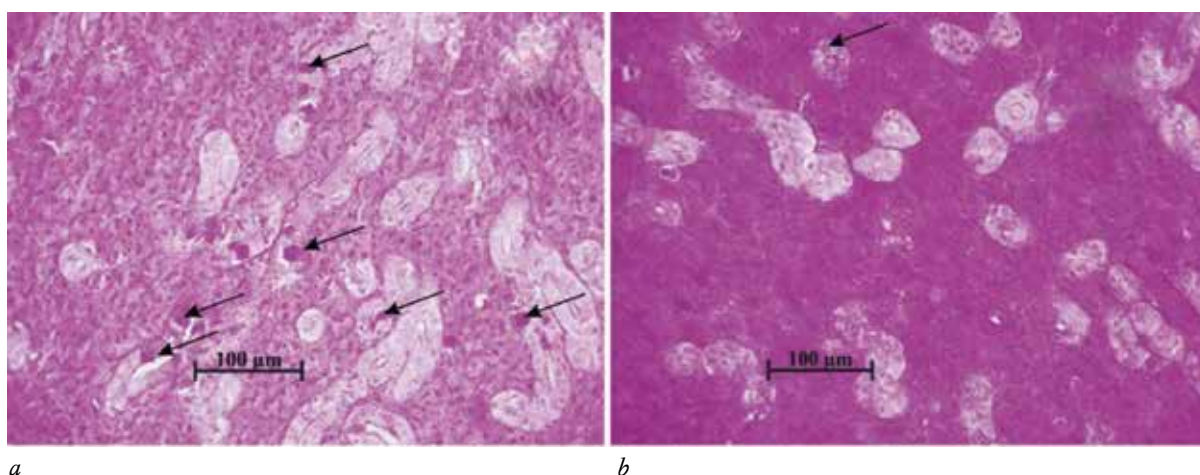


Рис. 2. Поднижнечелюстная железа половозрелой интактной (а) и подвергшейся многократной ампутации резцов крысы (b), 3-я нед эксперимента. Позитивное окрашивание клеток гранулярных извитых протоков (а) и концевых отделов (а, b). ШИК-реакция

Fig. 2. Submandibular gland of a sexually mature intact rat (a) and rat undergone multiple-amputations of incisors (b), the third week of the experiment. Positive staining of cells of granular convoluted ducts (a) and adenomeres (a, b). Periodic acid Schiff reaction

Т а б л и ц а 2

Удельный объем внутридольковых протоков поднижнечелюстных слюнных желез половозрелых крыс, %, $Me (Q_1; Q_3)$							
Группа	Срок эксперимента, нед						
	2	3	4	6	8	10	12
ИН, $n = 28$	26,0 (17,0; 35,0)	24,0 (16,8; 30,5)	24,5 (14,8; 30,0)	20,0 (14,0; 29,5)	31,5 (14,8; 43,5)	21,0 (14,5; 23,5)	24,0 (16,5; 30,5)
К, $n = 28$	21,0 (14,5; 25,0)	24,0 (17,5; 26,5)	20,5 (17,3; 26,8)	22,5 (16,3; 34,3)	31,0 (26,5; 39,0)	24,0 (20,5; 35,8)	33,0 (26,5; 39,5)
АР, $n = 35$	18,0 (10,3; 22,5) *	22,0 (13,8; 26,3)	14,0 (10,0; 23,0)	15,5 (5,8; 18,8)	20,0 (15,0; 28,0) #	23,0 (10,0; 24,0)	23,0 (13,5; 24,0)

* отличие от аналогичного показателя животных интактной группы; # отличие от показателя предыдущей недели этой же группы, достигнутый уровень значимости $p < 0,05$.

Развивающиеся в результате многократной ампутации резцов гистохимические изменения в эпителиоцитах внутридольковых протоков ПСЖ нивелируются, главным образом, к 6-й нед эксперимента. Клетки ацинусов и выводных протоков ПСЖ крыс групп ИН, К и АР не окрашиваются альциановым синим в исследуемые сроки.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате повторяющейся ампутации резцов у половозрелых крыс на 3-, 6- и 10-й нед эксперимента развивается увеличение площади ацинусов ПСЖ. Повышение площади ацинусов ПСЖ в разные сроки эксперимента может быть обусловлено различными факторами. Так, на 3-й нед эксперимента увеличение площади ацинусов, вероятно, связано с задержкой выделения секрета эпителиоцитами. Однако нормализация синтетических и секреторных процессов, а также гибель части эпителиоцитов приводят к нормализации площади ацинусов на 4-й нед эксперимента. Последующее увеличение площади ацинусов вызвано исключительно гипертрофией, не сопровождающейся функциональными изменениями.

Наблюдаются уменьшение удельного объема внутридольковых протоков, снижение количества ГСТ-клеток, по сравнению с интактными и контрольными животными. Таким образом, в результате повторяющейся ампутации резцов гипертрофия затрагивает исключительно клетки ацинусов ПСЖ.

В эпителиоцитах ацинусов ПСЖ половозрелых крыс в норме интенсивно протекает синтез РНК. Наши данные противоречат сведениям С.С. Handelman, Н. Wells, наблюдавшим увеличение пиронинофилии цитоплазмы клеток ацинусов ПСЖ крыс в результате повторяющейся ампутации резцов [8]. В базальной части цитоплазмы ГСТ-клеток ПСЖ крыс регистрируется уме-

ренная пиронинофилия, связанная с продукцией этими клетками множества биологически активных факторов [1–3]. Снижение пиронинофилии цитоплазмы ГСТ-клеток животных, подвергшихся повторяющейся ампутации резцов, свидетельствует об ослаблении интенсивности синтетических процессов в этих клетках. Следовательно, повторяющаяся ампутация резцов приводит к угнетению синтеза белка ГСТ-клетками и эпителиоцитами ацинусов ПСЖ крыс.

ГАГ не вырабатываются клетками ацинусов и протоков ПСЖ крыс групп ИН, К и АР в исследуемые сроки. ШИК-позитивная реакция цитоплазмы клеток ацинусов ПСЖ крыс связана с выработкой гликопротеинов, в том числе гликозилированных богатых пролином белков [9, 10]. Гликопротеины слюны очень разнообразны и участвуют в формировании зубной пелликулы и регуляции минерализации зуба, необходимы для увлажнения и ослизнения пищевого комка, а также снижают вирулентность вирусов и бактерий [11]. Наблюдаемое в ранние сроки эксперимента высокое содержание гликопротеинов в цитоплазме клеток ацинусов ПСЖ при сниженной интенсивности белоксинтетических процессов, вероятно, связано с накоплением гликопротеинов, что сопровождается изменением физико-химических свойств цитозоля. ШИК-позитивная реакция ГСТ-клеток, очевидно, обусловлена присутствием в секреторных гранулах гликозилированных молекул, в частности калликреинов [4].

Гистохимические и морфометрические различия между группами нивелируются к 6- и 12-й нед эксперимента соответственно, что связано с компенсаторно-приспособительными реакциями ПСЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повторяющаяся ампутация резцов у половозрелых крыс приводит к развитию морфо-

функциональных изменений в эпителиоцитах протоков и ацинусов ПСЖ со 2-й по 10-ю нед эксперимента. Увеличение площади ацинусов ПСЖ сочетается со снижением в их эпителиоцитах синтеза РНК и накоплением гликопротеинов. Уменьшение удельного объема внутридольковых протоков ПСЖ сопровождается ослаблением пиронинофилии ядрышка и цитоплазмы, что свидетельствует об угнетении процессов транскрипции в GCT клетках.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии источников финансирования научной работы.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 4253 от 28.09.2015).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Thulesen J., Bor M.V., Thulesen S., Nexø E. et al. Altered secretion and processing of epidermal growth factor in adrenergic-induced growth of the rat submandibular gland. *Regulatory Peptides*. 2002; 106: 105–114.
2. Adthapanyawanich K., Kumchantuek T., Nakata H., Yamamoto M. et al. Morphology and gene expression profile of the submandibular gland of androgen-receptor-deficient mice. *Arch. Oral. Biol.* 2015; 60 (2): 320–332.
3. Amano O., Iseki S. Cell growth factors in salivary glands. *Microscope*. 2005; 40: 1–6.
4. Takeda Y., Hirose H., Enomoto S. Enlargement of rat submandibular salivary gland induced by single amputation of lower incisor teeth. Histological, histometric and ultrastructural studies. *J. Oral Pathol.* 1986; 15 (6): 327–333.
5. Almeida de P.V., Gregio A.M., Machado M.A., de Lima A.A. et al. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2008; 9 (3): 72–80.
6. Бабаева А.Г., Шубникова Е.А. Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез. М.: МГУ, 1979: 192. [Babayeva A.G., Shubnikova E.A. Structure, function and adaptive growth of the salivary glands. М.: MGU Publ., 1979: 192 (in Russ.)].
7. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия (руководство). М.: Медицина, 1990: 384. [Avtandilov G.G. Medical morphometry (guidance). М.: Meditsina Publ., 1990: 384 (in Russ.)].
8. Handelman C.S., Wells H. Morphological and histochemical studies of experimentally enlarged and atrophied salivary glands of rats. *Am. J. Anat.* 1963; 112: 65–79.
9. Kofoed J.A., Curbelo H.M., Houssay A.B. Acid glycosaminoglycans and sialic acid content in salivary glands of rats. *J. Dent. Res.* 1969; 48 (4): 555–558.
10. Mehansho H., Carlson D.M. Induction of protein and glycoprotein synthesis in rat submandibular glands by isoproterenol. *J. Biol. Chem.* 1983; 258 (10): 6616–6620.
11. Wu A.M., Csako G., Herp A. Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Mol. Cell. Biochem.* 1994; 137 (1): 39–55.

Поступила в редакцию 21.06.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Иванова Вера Владимировна, аспирант, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск.

Мильто Иван Васильевич, д-р. биол. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; доцент, кафедры биотехнологии и органической химии, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск.

Суходоло Ирина Владимировна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Иванова Вера Владимировна, e-mail: ivvera92@rambler.ru.

УДК 616.314.3-089.7-06:612.313.5]-092.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-53-58

For citation: Guzeva V.I., Ochrim I.V., Kasumov V.R., Guzeva O.V., Guzeva V.V., Maksimova N.E. Characteristics of symptomatic epilepsy and other neurological disorders in children with lissencephaly. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 53–58.

Morphological and functional state of the epithelial cells in submandibular salivary glands after repeated amputations of the incisor teeth in adult rats

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

¹ Siberian State Medical University

2, Moskow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk Polytechnic University

30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Purpose. To evaluate a morphofunctional state of the epithelial cells of the acini and ducts of submandibular glands of mature rats after repeated incisors amputation.

Materials and methods. The experiment was performed on mature (2 months) white male rats, divided into groups: intact, control group and a group of rats subjected to repeated incisors amputation. Applying histological, histochemical and morphometric methods, we evaluated the morphological and functional state of the epithelial cells in submandibular glands of adult rats at 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks after repeated amputation of the incisor teeth.

Results. There is an increase of submandibular gland acini area at the 3–10 week after repeated incisors amputation. The functional activity of the submandibular glands ducts and acini cells decreases at the 2–4 week of the experiment.

Conclusion. As a result of repeated incisors amputation in rat submandibular glands acini and ducts epithelial cells develop reversible structural and functional changes, which are leveled by the 12th and 6th week of the experiment, respectively.

Key words: hypertrophy, submandibular glands, morphofunctional state.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the Siberian State Medical University (Protocol No. 4253 of 28.09.2015).

Received 21.06.2017

Accepted 06.02.2018

Ivanova Vera V., Postgraduate Student, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Milto Ivan V., DBSc, Associate Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of Biotechnology and Organic Chemistry, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

Sukhodolo Irina V., DM, Professor, Head of the Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Ivanova Vera V., e-mail: ivvera92@rambler.ru.

УДК 616-008.9-089]-092.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-59–74

Для цитирования: Корнюшин О.В., Торопова Я.Г., Неймарк А.Е., Берко О.М., Глистенкова Д.Д., Карелли Л.Г., Полозов А.С., Галагудза М.М. Хирургическая коррекция метаболического синдрома в эксперименте на крысах: методические аспекты. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 59–74.

Хирургическая коррекция метаболического синдрома в эксперименте на крысах: методические аспекты

Корнюшин О.В.¹, Торопова Я.Г.¹, Неймарк А.Е.¹, Берко О.М.²,
Глистенкова Д.Д.², Карелли Л.Г.², Полозов А.С.³, Галагудза М.М.¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) имени В.А. Алмазова
Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет (ПСПбГМУ) им. акад. И.П. Павлова
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8

³ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

РЕЗЮМЕ

Цель исследования — на основании собственного опыта и данных литературы привести подробное описание техники выполнения бариатрических операций с различными метаболическими эффектами в эксперименте на крысах, провести сравнительную характеристику различных операций, оценить целесообразность выполнения сочетанных операций.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 120 самцах крыс стока Wistar SPF-статуса массой 380–510 г в асептических условиях с применением общей анестезии изофлюраном. Выполнялись следующие операции: продольная резекция желудка, гастрощунтирование, выключение двенадцатиперстной кишки, илеотранспозиция, илеотранспозиция с продольной резекцией желудка. Уровень сложности операций оценивался по десятибалльной системе.

Результаты. Рассмотрены методические особенности проведения таких операций, как продольная резекция желудка, гастрощунтирование, выключение двенадцатиперстной кишки и илеотранспозиция в эксперименте на крысах. Первые две операции являются наиболее часто используемыми бариатрическими операциями, тогда как выключение двенадцатиперстной кишки и илеотранспозиция позволяют селективно моделировать метаболические эффекты данного вида хирургии. В статье подробно изложены вопросы предоперационной подготовки животных, рассмотрены основные этапы проведения указанных операций, уделено внимание возможным осложнениям и техническим особенностям.

Заключение. Выполнение бариатрических операций в эксперименте на мелких лабораторных грызунах требует применения микрохирургической техники и наличия значительных навыков. Иллюстрированное описание методических аспектов выполнения данных операций поможет начинающим исследователям освоить этот непростой раздел экспериментальной хирургии.

Ключевые слова: ожирение, сахарный диабет, метаболический синдром, бариатрические операции, продольная резекция желудка, гастрощунтирование, гастроеюношунтирование, илеотранспозиция.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, в последние несколько десятилетий ожирение приняло форму эпидемии во всем мире. Ежегодно по меньшей мере 2,6 млн человек умирает в результате наличия избыточной массы тела или ожирения [1]. Абдоминальное ожирение лежит в основе развития сахарного диабета 2 типа (СД2), артериальной гипертензии, дислипидемии, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и других компонентов метаболического синдрома, характеризующегося функциональными и структурными изменениями на уровне органов-мишеней и повышенным риском развития сердечно-сосудистых событий [2]. В настоящее время СД2 продолжает оставаться медленно прогрессирующим заболеванием, при котором на фоне медикаментозной терапии компенсация достигается лишь у 30% больных, а наступление ремиссии возможно только на доклинической стадии заболевания у незначительной части больных [3]. У пациентов с ожирением и СД2 частота НАЖБП достигает 80–90%, что существенно повышает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [4].

На сегодняшний день клинически значимой альтернативой медикаментозной терапии в лечении ожирения с сопутствующими метаболическими нарушениями является бариатрическая хирургия. После бариатрических операций (БО) отмечается снижение избыточной массы тела в среднем на 61,2%, а ремиссия СД2 достигается в 76,8% случаев [5]. Статистика свидетельствует об увеличении количества БО, выполняемых в последние годы. Так, по данным отчета Международной федерации хирургии ожирения и метаболических нарушений (IFSO), в 2012 г. количество выполненных операций составило 280 тыс., тогда как в 2014 г. оно достигло 568 тыс. [6].

Основным критерием в оценке эффективности БО является показатель снижения избыточной массы тела. Однако БО обладают широким спектром системных эффектов, которые в силу недостаточной изученности в настоящее время используются не в полной мере. Как известно, метаболический эффект БО обеспечивается не только за счет ограничения поступления в организм нутриентов, но и за счет влияния на уровень секреции гормонов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [6, 7]. Одним из наиболее значимых механизмов некоторых БО является инкретиновый эффект, заключающийся в стимуляции выработки инсулина в ответ на пероральный прием глюко-

зы. Однако, помимо метаболического действия, гормоны ЖКТ обладают системными pleiotropic эффектами. Наиболее изученными являются системные эффекты глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и гормонов группы грелина (грелин, обестатин) [8]. На сегодняшний день получены данные о выраженном протективном действии ГПП-1 и грелина на β -клетки островков поджелудочной железы [9], миокард [10], головной мозг [11], гепатоциты [12] и эндотелий [13]. В отличие от системного введения аналогов гормонов после БО происходят устойчивые изменения профиля секреции гормонов ЖКТ, формируется эндогенное депо противодиабетических и дефицит диabetогенных гормонов. При этом при различных типах БО уровень гормонов ЖКТ меняется разнонаправленно [6, 7, 12].

Имеющиеся на сегодняшний день данные об изменении уровня гормонов ЖКТ после различных видов БО фрагментарны и противоречивы, что обуславливает актуальность детального изучения профиля гормонов ЖКТ после различных типов БО, а также оценки их системного влияния в эксперименте. В силу технических и экономических причин для экспериментального моделирования БО и изучения механизмов их влияния на обмен веществ наиболее целесообразно использование лабораторных грызунов, т. е. мышей и крыс.

В данной работе детально описаны методические и технические аспекты проведения обладающих метаболическими эффектами операций на ЖКТ в эксперименте на крысах. В частности, рассмотрены такие операции, как продольная резекция желудка, гастрощунтирование, выключение двенадцатиперстной кишки и илеотранспозиция.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анатомо-физиологические особенности ЖКТ крысы, влияющие на результаты моделирования БО. При моделировании БО в эксперименте на крысах необходимо учитывать анатомические и физиологические особенности строения органов ЖКТ, например различия в длине определенных отделов тонкой кишки. Так, у крысы тощая кишка занимает 90% длины тонкой кишки, в то время как у человека – около 40% [14]. Обнаружено, что у человека площадь всасывающей поверхности тонкой кишки в 200 раз больше, чем у крысы, в то время как длина кишки больше всего лишь в 5,5 раз. Это дает основание для заключения о том, что ЖКТ человека способен переваривать и всасывать основные нутриенты более быстро

и эффективно по сравнению с ЖКТ крысы [15]. Также у крысы отсутствует желчный пузырь, поэтому происходит более частое и регулярное выделение слабо концентрированной желчи в двенадцатиперстную кишку по сравнению с человеком. Следует отметить, что у крысы и человека различаются состав и локализация кишечной микрофлоры: у крыс микроорганизмы могут находиться в желудке и проксимальном отделе тонкого кишечника, у человека же из-за более низкого уровня рН желудка микрофлора в этих отделах ЖКТ практически отсутствует [16]. В отличие от желудка человека, имеющего форму вытянутого крючка, желудок крысы имеет форму полукруга, что обусловлено близким расположением места впадения пищевода к антральному отделу желудка, а также наличием в желудке крысы дополнительного отдела – безжелезистой части или прежелудка (*pars aglandularis*). Он расположен слева и выше от пищевода (в том месте, где в желудке человека располагается дно), размеры которого существенно превышают относительные размеры желудка человека [17].

Подготовка животного к операции и общая анестезия. Материалом для настоящего исследования послужили 120 самцов крыс стока Wistar SPF-статуса массой 380–510 г. Для минимизации объема содержимого ЖКТ во время операции животные за 12 ч до операции ограничиваются в приеме твердого корма с сохранением свободного доступа к воде. Во избежание стресса допустима замена твердого корма на жидкий, например животные могут получать разбавленное энтеральное питание или разведенное сухое молоко, которые также необходимо удалить из клетки не менее чем за 3–4 ч до начала операции.

Эксперименты на животных безопаснее проводить в условиях ингаляционного наркоза изофлюраном под контролем выраженности роговичного рефлекса, а также рефлекса на болевой раздражитель (щипок кожи на конечности животного). Возможно применение внутривенной анестезии с использованием комбинированных анестетиков – золетила и рометара. Для профилактики высыхания роговицы на поверхность глаз наркотизированного животного наносится гель («Офтагель», Santen OY, Финляндия). Животное располагается на операционном термостатируемом столике с обратной связью в положении лежа на спине, хвостом к хирургу. При фиксации животного нельзя допускать сильного растягивания конечностей животного, так как последнее может привести к затруднению дыхания.

Для профилактики инфекционных осложнений рекомендуется использование антибактериальных препаратов. В своей работе нами использовались препараты группы цефалоспоринов, вводя последние внутривенно в самом начале операции, сразу после выполнения лапаротомии. Данная тактика при условии соблюдения строгой асептики позволяет полностью избежать инфекционных осложнений. После фиксации животного на фоне достаточной глубины ингаляционного наркоза производится подготовка операционного поля, включающая удаление шерсти триммером и обработку кожи раствором антисептика. Подготовка операционного поля завершается драпировкой – накрыванием животного стерильным покровным материалом (аналогом операционного белья в клинике), в котором вырезается окно в проекции предполагаемого оперативного вмешательства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продольная резекция желудка (ПРЖ)

В клинической практике ПРЖ выполняется с конца 1990-х гг. в качестве первого этапа более сложной БО (билиопанкреатического шунтирования) у пациентов, страдающих сверхожирением и высоким операционным риском. В последующем в связи с эффективностью и относительной простотой выполнения ПРЖ стала широко использоваться в качестве самостоятельной операции [18]. В настоящее время в структуре БО ПРЖ занимает первое место [19]. Преимуществом ПРЖ является сохранение общей протяженности ЖКТ и физиологического пассажа по нему нутриентов, что позволяет избежать в отдаленном послеоперационном периоде осложнений, связанных с дефицитом питательных веществ [20]. Являясь рестриктивной операцией, ПРЖ реализует два дополнительных физиологических механизма. За счет ускоренной эвакуации пищевых масс из желудка происходят стимуляция дистальных отделов тонкой кишки с повышением уровня ГПП-1 и постпрандиальная выработка инсулина [21]. Удаление большой кривизны, являющейся грелин-продуцирующей частью желудка, приводит к снижению уровня грелина в плазме крови и, соответственно, уменьшению чувства голода [22].

Техника выполнения ПРЖ в эксперименте. При ПРЖ, как и при всех описываемых ниже операциях, вмешательство начинается с выполнения верхне-срединной лапаротомии. Производится срединный доступ в проекции белой линии

живота длиной 3–4 см в эпигастральной области, отступив от мечевидного отростка вниз 0,5 см. Ножницами или скальпелем выполняется разрез кожи, затем ножницами разрезается передняя брюшная стенка на всю толщину по белой линии. Данный этап следует выполнять осторожно, чтобы не повредить нижними браншами ножниц внутренние органы – кишечник или печень. Устанавливается ранорасширитель, поверх него укладываются стерильные салфетки, смоченные физиологическим раствором (рис. 1, а).

Следует отметить, что при ревизии брюшной полости желудок крысы расположен под левой долей печени. Нераскрытыми браншами пинцета осторожно опускают большой сальник до момента визуализации большой кривизны желудка. После идентификации желудка производится его мобилизация путем осторожной диссекции вдоль большой кривизны фиксирующего связочного аппарата, включающего печеночно-желудочную и желудочно-селезеночную связки и практически лишенных кровеносных сосудов. Диссекцию связочного аппарата можно осуществлять несколькими путями: 1) тупым способом с помощью ножниц или пуговчатого зонда; 2) разрезать ножницами в случае, если есть возможность производить натяжение рассекаемой связки пинцетом; 3) с помощью термокоагулятора (рис. 1, б).

После завершения мобилизации желудок аккуратно выводится из операционной раны. Для удобства дальнейших манипуляций под заднюю стенку желудка подкладывается сложенная в несколько раз салфетка. Операция ПРЖ заключается в удалении значительной части желудка (около 70%) с формированием из оставшейся части узкой трубки [23].

Поскольку желудок у крысы имеет форму полусферы, а условная продольная ось желудка – форму полукруга, линия резекции может быть выполнена под небольшим тупым углом. После определения границы вдоль линии резекции накладываются два зажима типа «бульдог»; необходимо следить за тем, чтобы стенки органа плотно прилегали друг к другу и не образовывали складок. Первый зажим накладывается от кардиального отдела, расположенного между пищеводом и прежелудком, по направлению к привратнику. Второй зажим – от проксимальной границы антрума по направлению к дну (рис. 1, в).

Термокоагулятором намечается линия будущего разреза, что, помимо маркировки, выполняет еще и гемостатическую функцию. Таким образом, два зажима отмечают линию резекции, которая может быть произведена ножницами или

скальпелем. Боковые поверхности стенок оставшейся части желудка обрабатываются антисептиком (рис. 1, д). При необходимости с помощью термокоагулятора выполняется гемостаз.

Для ушивания оставшейся части желудка и формирования трубки используется наложение двухрядного непрерывного шва с использованием атравматической иглы с нерассасывающейся нитью (пролен 6-0). Подобный шовный материал используется при всех видах шва на органах ЖКТ в оперативных вмешательствах, которые будут описаны ниже. Первый ряд швов накладывается между слизистыми слоями передней и задней стенок желудка. Второй ряд представлен погружающим серозно-мышечным швом, который может быть узловым или непрерывным (рис. 1, е) [24]. Зажимы типа «бульдог» не снимаются до окончания наложения первого ряда швов.

В эксперименте могут использоваться различные техники разделения тканей и их соединения: 1) однорядный непрерывный погружающий шов, 2) хирургические клипсонакладыватели (клипаторы) [25] или 3) линейные сшивающие аппараты, использование которых существенно сокращает время операции [26]. Для профилактики несостоятельности хирургического шва зона ушивания тщательно проверяется с помощью тонкого пуговчатого зонда и при необходимости укрепляется дополнительными узловыми швами.

Гастрошунтирование

Идея применения гастрошунтирования (ГШ) в хирургии ожирения возникла после того, как было отмечено снижение массы тела у пациентов, перенесших субтотальную резекцию желудка по Бильрот-2. Первую операцию в 1966 г. выполнили Е. Mason и С. Ito, которая заключалась в пересечении желудка в субкардиальном отделе и наложении анастомоза между малой частью желудка и петель тонкой кишки [27]. Операция ГШ неоднократно подвергалась различным модификациям, в итоге став наиболее популярной БО в мире. Большинство хирургов ГШ считается золотым стандартом бариатрической хирургии [28]. ГШ заключается в формировании «маленького желудочка», из которого пища попадает непосредственно в тощую кишку, минуя большую часть желудка, двенадцатиперстную и начальные отделы тощей кишки. Посредством шунтирования, т.е. хирургического «выключения» большей части желудка и начальных отделов тонкой кишки, обеспечивается уменьшение площади и времени соприкосновения химуса со слизистой тонкой

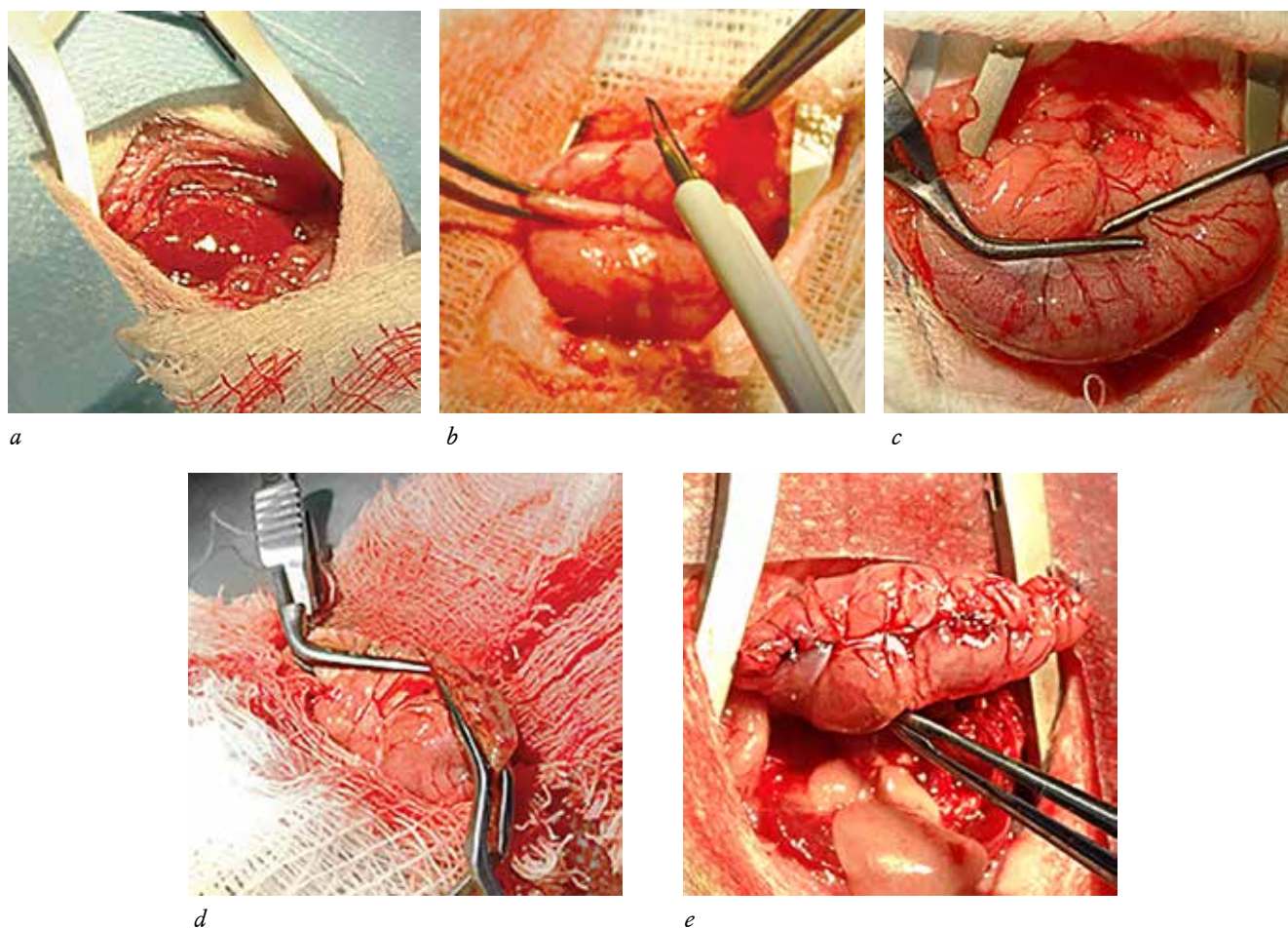


Рис. 1. Основные этапы хирургического моделирования ПРЖ: *a* – установка ранорасширителя; *b* – мобилизация желудка; *c* – наложение зажимов вдоль линии резекции; *d* – желудок после отсечения большой кривизны; *e* – ушитый желудок

Fig. 1. The main stages of surgical modeling of the longitudinal gastric resection: *a* – installation of a retractor; *b* – mobilization of the stomach; *c* – clipping along the line of resection; *d* – stomach after cutting of major curve; *e* – a stitched stomach

кишки [29]. Поскольку ГШ сочетает в себе рестриктивный и шунтирующий компоненты, данная операция относится к комбинированным БО и характеризуется высокой эффективностью.

Техника выполнения ГШ в эксперименте

После выполнения верхне-срединной лапаротомии протяженностью 3–4 см, как и при ПРЖ, производится мобилизация желудка и выведение последнего из раны. С двух сторон от линии предполагаемого поперечного разреза, медиальный край которого должен быть расположен по малой кривизне желудка на 5–6 мм ниже пищевода, примерно в центре малой кривизны, накладываются два зажима типа «бульдог» (см. рис. 2, *a*, *b*). Следует отметить, что область малой кривизны обильно васкуляризирована. Для минимизации кровотечения необходимо коагулировать сосуды

по передней стенке желудка. Затем производится разрез между зажимами, в результате чего желудок разделяется на две части. После рассечения двухрядным швом ушивается нижняя антральная часть желудка. Первый ряд – непрерывный шов на слизистые оболочки, только после наложения которого снимается зажим. Второй ряд – серозно-мышечный шов Ламберта.

Следующим этапом производится формирование «малого желудочка». Для этого осуществляется перемещение зажима в положение, перпендикулярное линии произведенного разреза параллельно малой кривизне (см. рис. 2, *c*, *d*). Оставшаяся часть желудка отсекается. Боковая стенка желудка формируется путем наложения двухрядного шва. Первый непрерывный шов накладывается на слизистые (не снимая зажим) по направлению от кардии вниз. После его наложе-

ния нить фиксируется, но не обрезается. Нижнюю часть «желудочка» – место наложения будущего желудочно-тонкокишечного анастомоза между «малым желудочком» и тонкой кишкой – оставляют нешитой (рис. 2, е).

Для формирования билиопанкреатической (выключенной) петли определяется связка Трейтца, от которой отступают в дистальном направлении 8–10 см. В удобном участке, без сосудов, производится пересечение тощей кишки. Проксимальная часть пересеченной кишки укрывается салфеткой, смоченной теплым физиологическим раствором.

Для наложения анастомоза между «малым желудочком» и тонкой кишкой дистальная часть пересеченной кишки аккуратно подтягивается к нижнему краю сформированного «малого желудка». Желудочно-тонкокишечный анастомоз формируется «конец в конец» путем наложения непрерывного шва или ряда узловых швов через все слои [30]. Наложение швов удобнее начинать сбоку, с последующим переходом на заднюю и затем переднюю стенки. Линия шва тщательно проверяется тонким пуговчатым зондом. После этого той же нитью или нитью, оставшейся после наложения первого ряда швов, накладывается второй, серозно-мышечный шов на боковую стенку «малого желудка» (рис. 2, f, g).

Во избежание натяжения и несостоятельности анастомоза, перед наложением желудочно-кишечного анастомоза необходимо сопоставить диаметры сшиваемых краев кишки и «желудочка». В случае если диаметр кишки значительно меньше диаметра «желудочка», последний можно уменьшить путем наложения одного или двух дополнительных швов. При использовании непрерывного шва следует избегать его чрезмерного затягивания – это может привести к формированию сужения, препятствующего пассажу пищи из желудка в кишечник. Также нельзя делать их и слишком свободными, так как при этом возможно возникновение несостоятельности.

Для формирования межкишечного анастомоза необходимо от наложенного желудочно-кишечного анастомоза отступить в дистальном направлении 8–10 см. Данный анастомоз накладывается «конец в бок». В удобном месте, на противобрыжечной поверхности, в поперечном направлении ножницами производится разрез, соответствующий диаметру выключенной из пищеварения билиопанкреатической петли. Анастомоз может быть наложен однорядным непрерывным или одиночными швами, через все слои нерассасывающейся атравматической нитью пролен 6-0 (рис. 2, b, i).

Следует отметить, что при формировании «малого желудка», так же как и при ПРЖ, для разделения и соединения тканей могут быть использованы линейные сшивающие аппараты [31, 32].

Выключение двенадцатиперстной кишки (гастроюношунтирование (ГЕШ))

В настоящее время при обосновании методов хирургического лечения СД2 обсуждаются две дополняющие друг друга теории реализации антидиабетического механизма, связанные с эмбриологическим развитием тонкого кишечника. Более ранней является теория передней кишечной трубки (foregut). Предполагается, что именно в двенадцатиперстной кишке вырабатываются продиабетические факторы – так называемые антиинкретины. Однако до сих пор фактор, осуществляющий антиинкретиновый эффект, остается неидентифицированным [33, 34]. Хирургическое выключение начальных отделов тонкой кишки является частью не только классических БО, таких как желудочное и билиопанкреатическое шунтирование, но и новых одноанастомозных операций – минигастрошунтирования и дуоденоилеошунтирования с ПРЖ (single anastomosis duodenoileal bypass (SADI)) [31, 32].

Позднее была предложена теория задней кишечной трубки (hindgut), которая предполагает, что приближение к желудку дистальных отделов тощей кишки вызывает более интенсивную стимуляцию энтероэндокринных L-клеток компонентами пищи. Это приводит к усилению продукции ГПП-1 и реализации его антидиабетических эффектов. Механизм hindgut задействован при выполнении операции илеотранспозиции, техника которой описана в следующем разделе.

Техника выполнения выключения двенадцатиперстной кишки в эксперименте. После выполнения верхне-срединной лапаротомии (см. описание выше) тупым способом производится частичная мобилизация желудка, а именно его антрального отдела, а также проксимального участка двенадцатиперстной кишки. Максимально близко (3–4 мм) к пилорическому жому определяется бессосудистый участок двенадцатиперстной кишки, в котором производится ее пересечение. Тупым способом, тонкими браншами микрохирургического пинцета, в брыжейке двенадцатиперстной кишки готовится окошко-площадка для наложения двух зажимов типа «бульдог», ограничивающих линию пересечения. Между зажимами аккуратно, чтобы не повредить сосуды брыжейки, выполняется разрез (см. рис. 3, a, b).

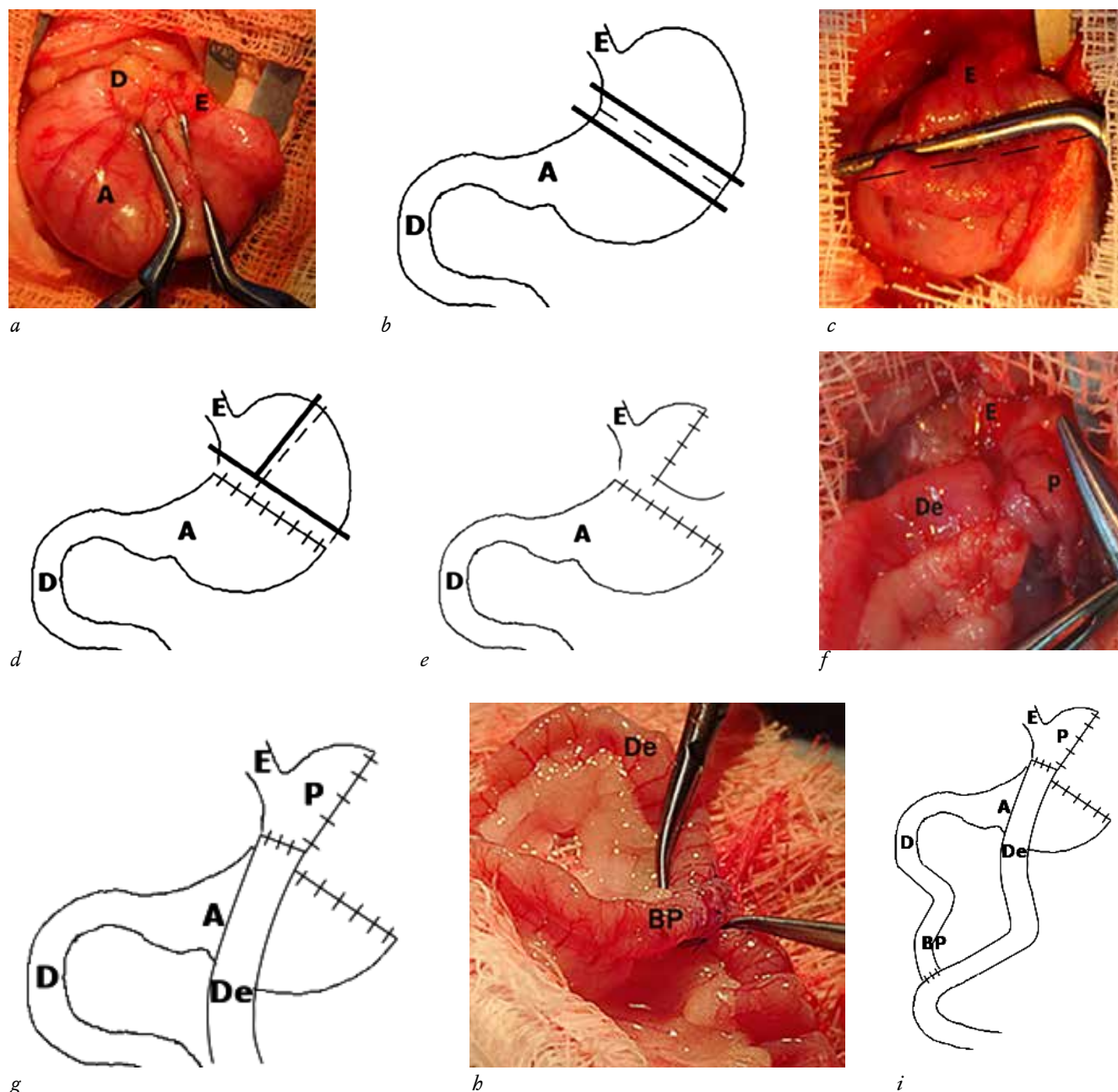


Рис. 2. Основные этапы хирургического моделирования ГШ: *a* – наложение зажимов, *b* – схема расположения зажимов и границы поперечного разреза, *c* – отграничение зажимом «малого желудка», *d* – схема расположения зажима и линии наложения шва, *e* – схема после ушивания боковой стенки «малого желудка», *f* – сформированный желудочно-кишечный анастомоз, *g* – схема формирования желудочно-кишечного анастомоза, *h* – сформированный межкишечный анастомоз, *i* – схема окончательного вида органов ЖКТ после ГШ. Условные обозначения: А – антральный отдел желудка; Е – пищевод; D – двенадцатиперстная кишка; De – дистальный конец; P – «малый желудок»; BP – билиопанкреатическая петля

Fig. 2. The main stages of surgical gastric bypass modeling. *a* – the application of the clamps, *b* – the arrangement of the clamps and the boundary of the cross section, *c* – the delimitation of the “small stomach” by the clamp, *d* – the scheme of the location of the clamp and the seam imposition line, *e* – the scheme after suturing the side wall of the “small stomach”, *f* – intestinal anastomosis, *g* – scheme of the formation of gastrointestinal anastomosis, *h* – formed inter-intestinal anastomosis, *i* – scheme of the final form of the digestive tract after gastric bypass. Legend: A – antral stomach; E – esophagus; D – duodenum; De – distal end; P – “small stomach”; BP is a biliopancreatic loop

После рассечения с дистального конца двенадцатиперстной кишки снимается зажим и производится ушивание культи двенадцатиперстной кишки. Для ушивания культи можно использовать разные способы. Нами был предложен следующий.

Первым делается вкол иглы снаружи внутрь со стороны брыжеечного края, затем, отступив четверть окружности, выполняется прокол стенки изнутри наружу сначала с одной стороны, потом снаружи вовнутрь с другой. Последний прокол иглы делается изнутри наружу со стороны свободного края. Концы нити стягиваются, в результате стенки кишки вворачиваются внутрь и формируется узел (рис. 3, с).

Отступя 5–7 см от связки Трейтца в дистальном направлении, между аркадами сосудов брыжейки производится разрез. Дистальный конец резецированной тощей кишки подтягивается к привратнику. Анастомоз между желудком и тощей кишкой формируется путем наложения непрерывного или ряда узловых швов. Удобнее накладывать швы сначала на заднюю стенку, затем на переднюю. Тонким пуговчатым зондом проверяется состоятельность анастомоза. От места желудочно-кишечного анастомоза в дистальном направлении отступают 8–10 см и локализуют место формирования межкишечного анастомоза «конец в бок» по аналогии с таковым при гастростунтировании (рис. 3, d–f).

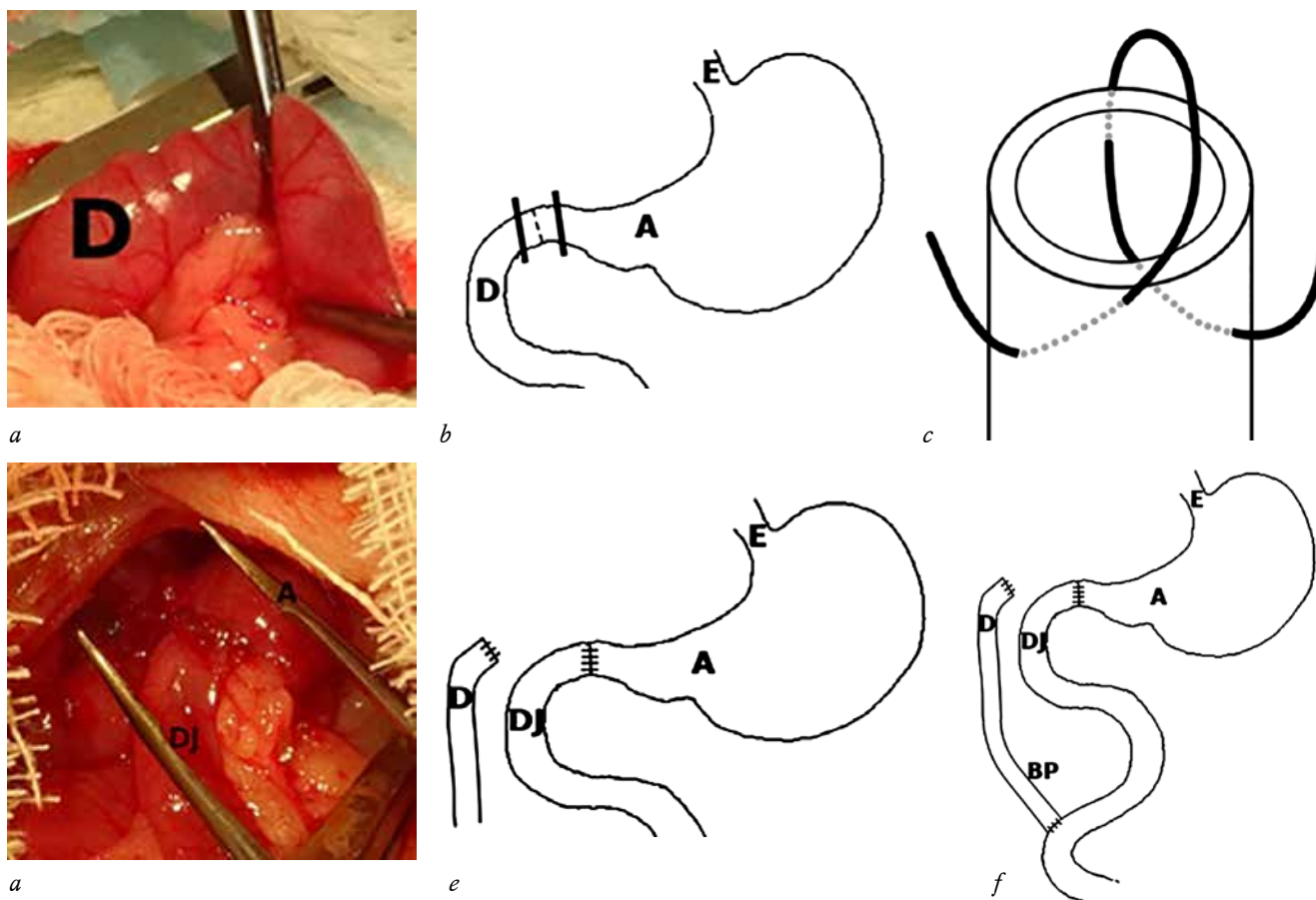


Рис. 3. Основные этапы хирургического моделирования выключения двенадцатиперстной кишки: *a* – наложение зажимов, *b* – схема расположения зажимов и линии поперечного разреза, *c* – схема ушивания культи, *d* – сформированный желудочно-кишечный анастомоз, *e* – схема формирования желудочно-кишечного анастомоза, *f* – схема окончательного вида органов ЖКТ после операции выключения двенадцатиперстной кишки. Условные обозначения: А – антральный отдел желудка, Е – пищевод, D – двенадцатиперстная кишка, DJ – дистальный конец тощей кишки, BP – билиопанкреатическая петля

Fig. 3. The main stages of surgical modeling of deactivation of the duodenum: *a* – the application of clamps, *b* – the scheme of the location of the clamps and the line of the cross section, *c* – the stitching scheme of the residual limb, *d* – the formed gastrointestinal anastomosis, *e* – the scheme of the formation of the gastrointestinal anastomosis, *f* – the scheme of the final form of the digestive tract after the surgery of the duodenum. Legend: A – antral stomach, E – esophagus, D – duodenum, DJ – distal end of jejunum, BP – biliopancreatic loop

Илеотранспозиция

Изучение механизмов влияния БО на углеводный обмен послужило основой для создания операций с селективным влиянием на СД2, предназначенных для применения у пациентов с нормальной или незначительно увеличенной массой тела. Одной из операций, изначально разработанных для хирургического лечения СД2, является илеотранспозиция (ИТ). ИТ заключается в перемещении участка подвздошной кишки в проксимальные отделы тонкой кишки, в результате чего

разные отделы тонкой кишки «меняются между собой местами» (рис. 4) [35]. После операции происходит стимуляция углеводами расположенных в перемещенном сегменте тонкой кишки *L*-клеток, которые вырабатывают противодиабетические гормоны – инкретины, прежде всего ГПП-1 [36]. При сохраненной общей протяженности кишки в организме формируется депо эндогенных инкретинов, уровень которых повышается синхронно с приемом пищи, что является более физиологичным по сравнению с фармакотерапией.

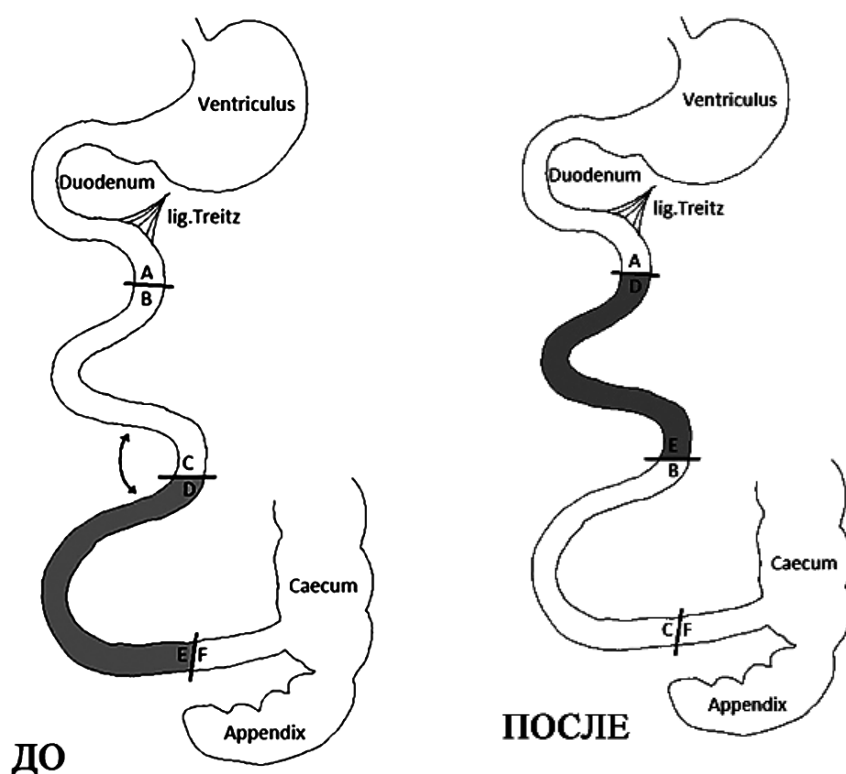


Рис. 4. Схема операции илеотранспозиции

Fig. 4. Scheme of ileal transposition

В клинической практике ИТ выполняется с 2006 г. в сочетании с ПРЖ, эффекты которой усиливают действие ИТ. По данным систематических обзоров по влиянию на СД2 эффективность операции ИТ–ПРЖ сопоставима с комбинированными БО, но в отличие от последних при данной операции отсутствует эффект мальабсорбции. ИТ–ПРЖ получила широкое распространение в странах, являющихся лидерами по заболеваемости СД2 [37, 38].

Техника выполнения операции ИТ в эксперименте. После выполнения лапаротомии в рану устанавливается ранорасширитель. В левой подвздошной области идентифицируются слепая и впадающая в нее подвздошная кишка. На рассто-

янии 1,5–2,5 см от илеоцекального сочленения между сосудистыми аркадами выбирается участок подвздошной кишки, подходящий для рассечения. При выборе участка кишки, удобного для пересечения, необходимо, осторожно приподняв брыжейку, оценить сосуды, проходящие в ней, а также найти участок с достаточным коллатеральным кровоснабжением, чтобы впоследствии не развились ишемия и несостоятельность анастомоза (рис. 5, а).

С помощью ножниц разрезаются кишка и брыжейка как можно дальше к ее корню для максимальной мобилизации кишки (рис. 5, б). Путем аккуратного перебирания пинцетами через 10 см

в проксимальном направлении определяется второе место пересечения кишки и брыжейки. После второго пересечения получают перемещаемый участок D–Е подвздошной кишки (см. рис. 4). Этот участок (D–Е) выводится в рану и аккуратно укладывается на увлажненные салфетки справа от края раны. Выведенный из раны участок кишки также накрывается салфеткой, смоченной физиологическим раствором с антисептиком, и в последующем в ходе операции постоянно смачивается, что предотвращает пересыхание серозной оболочки и брыжейки.

Концы С и F «оставшейся» кишки сводятся вместе, накладывается анастомоз «конец в конец» швами через все слои (рис. 5, с). В зависимости от подготовленности хирурга шов анастомоза может быть как непрерывным, так и узловым. Для более точного сопоставления краев начинать

наложение анастомоза следует с брыжеечного края [38].

Далее на расстоянии 1,5–2,5 см от связки Трейтца определяется подходящий для рассечения участок кишки и производится разрез – концы А и В (см. рис. 4). Концы А и D сводятся вместе, формируется анастомоз. Аналогичным образом формируется анастомоз между концами Е и В (рис. 5, d). Поскольку брыжейка тонкой кишки крысы тонкая, закрытие окон брыжейки приводит к лишней травматизации и не представляется целесообразным. После наложения последнего анастомоза тонкая кишка погружается в брюшную полость. С целью профилактики острой кишечной непроходимости при погружении кишки необходимо последовательно проследить весь ход тонкой кишки от связки Трейтца до илеоцекального угла.

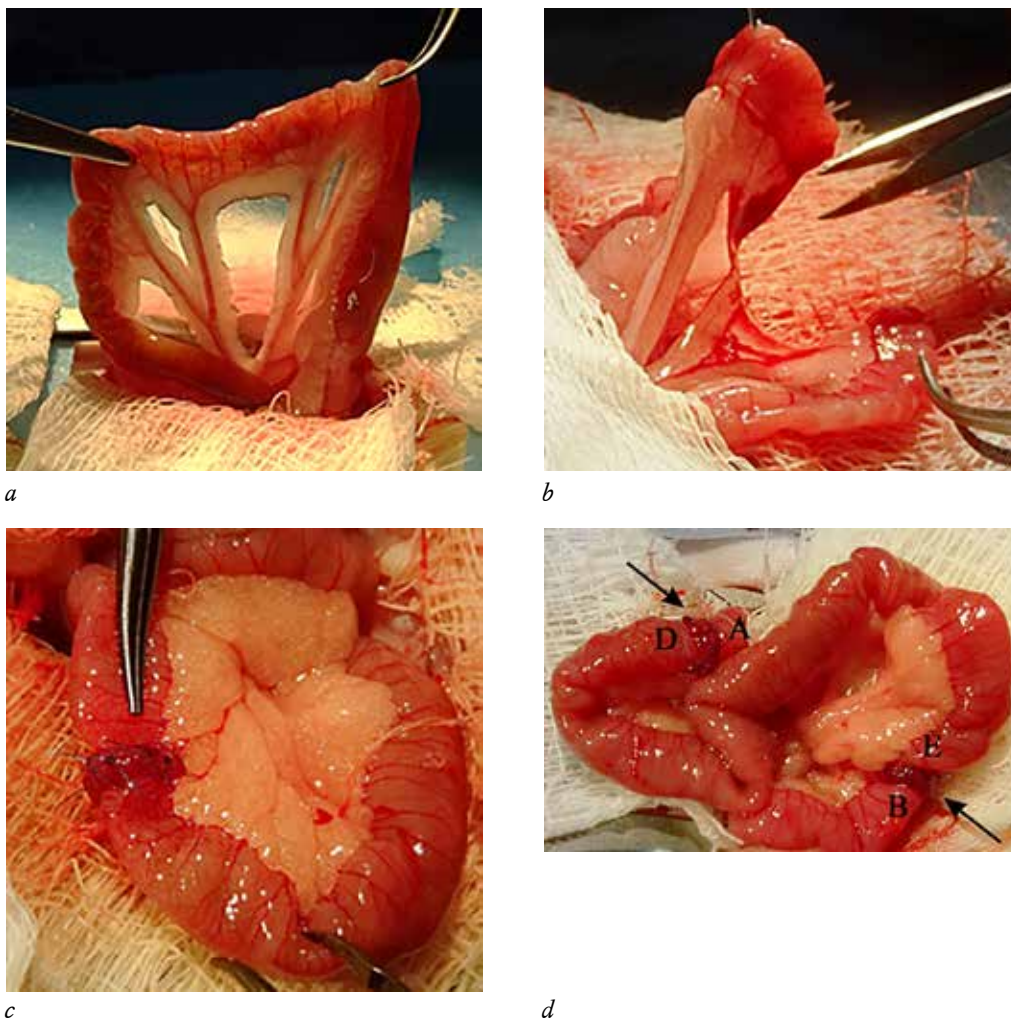


Рис. 5. Основные этапы хирургического моделирования ИТ: *a* – определение места пересечения тонкой кишки, *b* – пересечение тонкой кишки, *c* – сформированный межкишечный анастомоз, *d* – вид тонкой кишки после ИТ
Fig. 5. The main stages of ileal transposition modeling: *a* – the location of the small intestine, *b* – the intersection of the small intestine, *c* – the formed interintestinal anastomosis, *d* – the form of the small intestine after ileal transposition

Особенности послеоперационного периода

Ушивание передней брюшной стенки после всех видов операций выполняется одинаковым способом, а именно послойно атравматической иглой с нерассасывающейся нитью (пролен 4-0). При использовании непрерывного шва сокращается время операции. Значительно облегчает работу экспериментатора станция послеоперационного восстановления, в которой за счет более быстрого согревания животного ускоряется процесс восстановления после наркоза. Животное можно возвращать в домашнюю клетку только после полного пробуждения. При этом нужно помнить об индивидуальном размещении прооперированных животных в первые несколько суток после операции. В течение первых 12 ч послеоперационного периода животное ограничивается в приеме жидкости, что компенсируется подкожным введением 8–10 мл подогретого до 37°C физиологического раствора. Следующие 3 сут после операции животные получали адаптированное жидкое питание. С 4-х сут после процедуры возвращается нормальная диета. Как правило, в первые 2–3 сут послеоперационного периода требуется проведение аналгезии, для чего применяются нестероидные противовоспалительные средства (мелоксикам, кетопрофен), вводимые подкожно 1–2 раза в сутки. Первое введение необходимо выполнить сразу после завершения операции, еще до выхода животного из наркоза.

Осложнения при выполнении хирургических вмешательств в эксперименте. На каждом из этапов периоперационного периода могут возникнуть различные осложнения. Рекомендации, которые даны в статье, направлены на их предупреждение или уменьшение.

Причинами наиболее частых интраоперационных осложнений являются неадекватная анестезия или кровотечение. Помимо хирургических навыков, большое значение имеет подготовка исследователя-экспериментатора к выполнению общей анестезии. При выполнении больших хирургических операций, к которым относятся вмешательства, описанные в статье, большое значение имеет вид анестезии. Наиболее оптимальным вариантом является использование ингаляционного наркоза, при котором есть возможность более точного дозирования анестетика; его замена другими способами анестезии может привести к передозировке или недостаточной анестезии [39].

На этапе освоения хирургических вмешательств наиболее частым интраоперационным хирургическим осложнением является кровоте-

чение. При выполнении БО наибольший риск данного осложнения связан с этапом поперечного пересечения желудка в области малой кривизны при ГШ. Во избежание последнего при выполнении данной манипуляции необходимо ограничиться рассечением серозной оболочки без перехода за ее пределы. Кровотечения, отмечающиеся при пересечении тонкой кишки или мобилизации желудка, как правило, не требуют дополнительных мероприятий. Для профилактики кровотечения из стенки желудка и двенадцатиперстной кишки используется наложение гемостатического непрерывного шва, накладываемого до снятия зажимов типа «бульдог» [40].

Послеоперационные осложнения можно разделить на две большие группы – хирургические и инфекционные. Ранние хирургические осложнения, как правило, возникают на 1–2-е сут после операции и связаны с перитонитом, обусловленным несостоятельностью ручного шва при дефектах хирургической техники или недостаточностью кровоснабжения краев анастомоза. С целью улучшения качества ручного шва рекомендуется применять оптику (например, очки или стереомикроскоп), а также проверять герметичность уже наложенного анастомоза с помощью тонкого пуговчатого зонда.

Более поздним осложнением является острая кишечная непроходимость, которая может возникнуть после шунтирующих операций и особенно часто после операции ИТ (по нашим данным, в 15–20% случаев). Для профилактики острой кишечной непроходимости необходимо бережное отношение к тканям кишки во время операции. Кишка, находящаяся вне брюшной полости, все время должна быть накрыта салфеткой, смоченной теплым физиологическим раствором. При завершении операции, особенно после наложения анастомозов, кишка бережно погружается в брюшную полость. Погружение тонкой кишки необходимо начинать от проксимальных отделов по направлению к дистальным. Перед ушиванием брюшной стенки необходимо еще раз осмотреть расположение петель кишечника.

Минимизации инфекционных осложнений способствуют соблюдение всех рекомендаций по подготовке животного к операции, а также мер асептики и антисептики, использование антибактериальной терапии, тщательное наблюдение в послеоперационном периоде. Перед пересечением полого органа – желудка или кишки – место пересечения обкладывается влажными салфетками.

Редкой причиной смерти животных в послеоперационном периоде может быть эвентрация – выпадение органов брюшной полости через

дефект передней брюшной стенки, обусловленный несостоятельностью хирургического шва послеоперационной раны [37, 41]. В случае эвентрации животное нуждается в экстренной операции. При сомнении в жизнеспособности кишки необходимо сделать резекцию поврежденного участка. При возникновении послеоперационной вентральной грыжи решение о необходимости устранения последней принимает экспериментатор. Как правило, эти грыжи не несут опасности для жизни животного, но при необходимости их можно устранить с помощью повторной операции.

В хирургии мелких животных не всегда возможно с точностью воспроизвести все то, что выполняется в клинической практике. Так, например, при продольной резекции желудка невозможно завести в желудок зонд, с помощью которого можно было бы калибровать ширину формируемого нового желудка. В нашей практике был отмечен случай избыточного сужения последнего,

что привело к затруднению приема твердой пищи и постепенному истощению животного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение необходимо провести сравнительную характеристику описанных БО (таблица). Для удобства сложность выполнения каждой операции при условии наложения хирургического шва ручным способом выражена в баллах от 1 до 10. Операции с уровнем сложности 1–5 баллов условно отнесены к простым, свыше 5 баллов – к сложным. Оптимальный результат достигается при выполнении одним хирургом двух операций в день. При планировании эксперимента следует избегать выполнения более трех простых или двух операций повышенной сложности в день. Нарушение данных рекомендаций нередко приводило к совершению ошибок опытными исследователями и неоправданной гибели животных в послеоперационном периоде.

Т а б л и ц а

Сравнительная характеристика метаболических операций					
Показатель	Механизм действия	Наиболее часто изучаемые физиологические эффекты	Время выполнения, мин*	Уровень сложности, баллы	Летальность, %
ПРЖ	Рестриктивный, умеренный инкретиновый	Ожирение, коррекция гипергликемии, инкретиновый	60–120	5	5
ГЕШ	Мальабсорбция, инкретиновый (модель гипотезы передней кишки)	Ожирение, коррекция гипергликемии, инкретиновый, пролиферация β-клеток, рециркуляция желчных кислот	60–120	5	5
ИТ	Инкретиновый (модель гипотезы задней кишки)	Коррекция гипергликемии, инкретиновый, пролиферация β-клеток, рециркуляция желчных кислот	90–180	6–7	10–15
ГШ	Рестриктивный, мальабсорбтивный, инкретиновый	Ожирение, коррекция гипергликемии, инкретиновый, пролиферация β-клеток, рециркуляция желчных кислот	90–180	8	10–15
ИТ + ПРЖ	Рестриктивный, инкретиновый	–	180–240	10	50–60 при одновременном выполнении

* первая цифра при хорошо освоенной методике, вторая – при начальном уровне освоения.

Дискутабельным является вопрос выполнения сочетанных операций в эксперименте. Так, в нашей практике части животных одновременно выполняли ИТ и ПРЖ. Опыт выполнения каждой из операций отдельно не предвещал возникновения осложнений при их сочетании. Однако, как показал опыт, принятое решение было ошибочным. Выполнение двух операций одновременно значительно повысило смертность животных по сравнению с раздельным выполнением двух операций.

В статье представлены различные типы операций, наиболее часто выполняющиеся в экспериментальной метаболической хирургии. Следует отметить, что с момента выполнения первой БО в клинической практике было предложено более 40 видов различных вмешательств. Теоретическому обоснованию каждой новой операции способствовало накопление экспериментального материала, что позволяло устранять недостатки предшествующих операций и усиливать их положительные эффекты. Моделирование БО в экспе-

рименте на животных позволяет изучать тонкие молекулярные механизмы метаболических эффектов данных операций, что будет способствовать дальнейшей реализации еще не полностью раскрытого потенциала как метаболических, так и системных плейотропных эффектов БО.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Корнюшин О.В. – анализ литературы, подготовка рукописи, участие в формировании концепции работы, разработка методологии оперативных вмешательств. Торопова Я.Г., Неймарк А.Е. – подготовка рукописи, участие в формировании концепции работы. Берко О.М. – участие в подготовке рукописи, участие в проведении операций. Глистенкова Д.Д. – участие в подготовке рукописи. Карелли А.Г. – разработка методологии оперативных вмешательств. Полозов А.С. – участие в проведении операций. Галагудза М.М. – руководитель проекта, формирование концепции работы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена на средства гранта РНФ № 17-75-30052 «Разработка персонализированной терапии ожирения и сахарного диабета 2 типа в целях снижения сердечно-сосудистых рисков».

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ имени В.А. Алмазова (протокол № 16-7 от 19.08.2016 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Звенигородская Л.А. Эндоканнабиноидная система, пищевая аддикция, морбидное ожирение. *Consilium medicum. Гастроэнтерология*. 2014; 16 (8): 67–72. [Zvenigorodskaya L.A. Endocannabinoid system, food addiction, morbid obesity. *Consilium medicum. Gastroenterology*. 2014; 16 (8): 67–72 (in Russ.)].
2. Inzucchi S.E., Bergenstal R.M., Buse J.B., Diamant M., Ferrannini E., Nauck M., Peters A.L., Tsapas A., Wender R., Matthews D.R. American Diabetes Association (ADA); European Association for the Study of Diabetes (EASD). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2012; 35 (6): 1364–1379. DOI: 10.2337/dc12-0413.
3. Ивашкин В.Т., Маевская М.В. Липотоксичность и другие метаболические нарушения при ожирении. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. 2010; 1 (2): 4–13. [Ivashkin V.T., Maevskaya M.V. Lipotoxicity and other metabolic disorders with obesity. *Rossiiskij zhurnal gastroe'nterologii, gepatologii i koloproktologii – Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology*. 2010; 1 (2): 4–13 (in Russ.)].
4. Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E., Diehl A.M., Brunt E.M., Cusi K., Charlton M., Sanyal A.J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012; 142 (7): 1592–1609. DOI: 10.1002/hep.25762.
5. Buchwald H., Avidor Y., Braunwald E., Jensen M.D., Pories W., Fahrbach K., Schoelles K. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004; 292 (14): 1724–1737. DOI: 10.1001/jama.292.14.1724.
6. Angrisani L., Santonicola A., Hasani A., Nosso G., Capaldo B., Iovino P. Five-year results of laparoscopic sleeve gastrectomy: effects on gastroesophageal reflux disease symptoms and co-morbidities. *Surg. Obes. Relat. Dis.* 2016; 12 (5): 960–968. DOI: 10.1016/j.soard.2015.09.014.
7. Fried M., Yumuk V., Oppert J.M., Scopinaro N., Torres A.J., Weiner R., Yashkov Y., Fruhbeck G. European Association for the Study of Obesity; International Federation for the Surgery of Obesity – European Chapter. Interdisciplinary European Guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes. Facts*. 2013; 6 (5): 449–468. DOI: 10.1159/000355480.
8. Корнюшин О.В., Торопова Я.Г., Семикова Г.В., Неймарк А.Е., Дора С.В., Давыдова Е.Е., Карелли А., Ткачук О.В., Маркитантова А.С. Патофизиологические аспекты плейотропных эффектов гастроинтестинальных гормонов. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016; 10: 4–14. [Kornyushin O.V., Toropova Ya.G., Semikova G.V., Nejmark A.E., Dora S.V., Davy'dova E.E., Karelli L., Tkachuk O.V., Markitantova A.S. Pathophysiological aspects of the pleiotropic effects of gastrointestinal hormones. *E'ksperimental'naya i klinicheskaya gastroe'nterologiya – Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2016; 10: 4–14 (in Russ.)].
9. Xu G., Stoffers D.A., Habener J.F., Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999; 48 (12): 2270–2276. DOI: 10.2337/diabetes.48.12.2270.
10. Chai W., Dong Z., Wang N., Wang W., Tao L., Cao W., Liu Z. Glucagon-like peptide 1 recruits microvasculature and increases glucose use in muscle via a nitric oxide-dependent mechanism. *Diabetes*. 2012; 61 (4): 888–896. DOI: 10.2337/db11-1073.
11. Perry T., Lahiri D.K., Sambamurti K., Chen D., Mattson M.P., Egan J.M., Greig N.H. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (Abeta) lev-

- els and protects hippocampal neurons from death induced by Abeta and iron. *J. Neurosci. Res.* 2003; 72 (5): 603–612. DOI: 10.1002/jnr.10611.
12. D'Alessio D.A., Kahn S.E., Leusner C.R. et al. Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal. *J. Clin. Invest.* 1994; 93 (8): 2263–2266. DOI: 10.1172/JCI117225.
 13. Ban K., Noyan-Ashraf M.H., Hoefer J. et al. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagonlike peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation.* 2008; 117 (1): 2340–2350. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.739938.
 14. Kodama Y., Johannessen H., Furnes M.W., Zhao C.-M., Johnsen G., Marvik R., Kulseng B., Chen D. Mechanistic comparison between gastric bypass vs. duodenal switch with sleeve gastrectomy in rat models. *PLoS ONE.* 2013; 8 (3): 34–40. DOI: org/10.1371/journal.pone.0072896.
 15. De Sesso J.M., Jacobson C.F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2001; 39 (11): 209–228.
 16. Granger D.N., Barrowman J.A., Hviety P.R. Clinical Gastrointestinal Physiology. U.B. Saunders, Philadelphia. 1985; 12 (7): 27–38.
 17. Kodama Y., Johannessen H., Furnes M.W., Zhao C.-M., Johnsen G., Marvik R., Kulseng B., Chen D. Mechanistic comparison between gastric bypass vs. duodenal switch with sleeve gastrectomy in rat models. *PLoS One.* 2013; 8 (3): 11–17. DOI: 10.1371/journal.pone.0072896.
 18. Acholonu E., McBean E., Court I., Bellorin O., Szoststein S., Rosenthal R.J. Safety and short-term outcomes of laparoscopic sleeve gastrectomy as a revisional approach for failed laparoscopic adjustable gastric banding in the treatment of morbid obesity. *Obes. Surg.* 2009; 19 (10): 1612–1616. DOI: 10.1007/s11695-009-9941-4.
 19. Angrisani L., Santonicola A., Iovino P., Vitiello A., Zundel N., Buchwald H., Scopinaro N. Bariatric surgery and endoluminal procedures: IFSO worldwide survey 2014. *Obes. Surg.* 2017; 14 (5): 140–145. DOI: 10.1007/s11695-017-2666-x.
 20. Chang X, Cai H, Yin K. The regulations and mechanisms of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) for obesity and type 2 diabetes: a systematic review. *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.* 2017; 10 (8): 73–77. DOI: 10.1097/SLE.0000000000000468.
 21. Vives M., Molina A., Danus M., Rebenaque E., Blanco S., Paris M., Sanchez A., Sabench F., Del Castillo D. Analysis of gastric physiology after laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) with or without antral preservation in relation to metabolic response: a randomized study. *Obes. Surg.* 2017; 18 (8): 55–61. DOI: 10.1007/s11695-017-2700-z.
 22. Braghetto I., Taladriz C., Lanzarini E., Romero C. Plasma ghrelin levels in the late postoperative period of vertical sleeve gastrectomy. *Rev. Med. Chil.* 2015; 143 (17): 864–869. DOI: 10.4067/S0034-98872015000700006.
 23. Wang Q., Tang W., Rao W.S., Song X., Shan C.X., Zhang W. Changes of Ghrelin/GOAT axis and mTOR pathway in the hypothalamus after sleeve gastrectomy in obese type-2 diabetes rats. *World J. Gastroenterol.* 2017; 23 (34): 6231–6241. DOI: 10.3748/wjg.v23.i34.6231.
 24. Kodama Y., Johannessen H., Furnes M.W., Zhao C.-M., Johnsen G., Marvik R., Kulseng B., Chen D. Mechanistic comparison between gastric bypass vs. duodenal switch with sleeve gastrectomy in rat models. *PLoS One.* 2013; 23 (9): 12–18. DOI: org/10.1371/journal.pone.0072896.
 25. Schlager A., Khalaileh A., Mintz Y., Abu Gazala M., Globerman A., Ilani N., Rivkind A.I., Salpeter S., Dor Y., Zamir G. A mouse model for sleeve gastrectomy: applications for diabetes research. *Microsurgery.* 2011; 31 (1): 66–71. DOI: 10.1002/micr.20797.
 26. Bruinsma B.G., Uygun K., Yarmush M.L., Saeidi N. Surgical models of Roux-en-Y gastric bypass surgery and sleeve gastrectomy in rats and mice. *Nat. Protoc.* 2015; 10 (3): 495–507. DOI: 10.1038/nprot.2015.027.
 27. Mason E.E., Ito C. Gastric bypass in obesity. *Obes. Res.* 1996; 4 (3): 316–319.
 28. Buchwald H., Estok R., Fahrbach K., Banel D., Jensen M.D., Pories W.J., Bantle J.P., Sledge I. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* 2009; 122 (3): 248–256. DOI: 10.1016/j.amjmed.2008.09.041.
 29. Liu J.Y., Mu S., Zhang S.P., Guo W., Li Q.F., Xiao X.Q., Zhang J., Wang Z.H. Roux-en-Y gastric bypass surgery suppresses hypothalamic PTP1B protein level and alleviates leptin resistance in obese rats. *Exp. Ther. Med.* 2017; 14 (3): 2536–2542. DOI: 10.3892/etm.2017.4801.
 30. Angrisani L., Santonicola A., Iovino P., Vitiello A., Zundel N., Buchwald H., Scopinaro N. Bariatric surgery and endoluminal procedures: IFSO worldwide survey 2014. *Obes. Surg.* 2017; 18 (3): 56–61. DOI: 10.1007/s11695-017-2666-x.
 31. Woelnerhanssen B., Peterli R., Steinert R.E., Peters T., Borbely Y., Beglinger C. Effects of postbariatric surgery weight loss on adipokines and metabolic parameters: comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy – a prospective randomized trial. *Surg. Obes. Relat. Dis.* 2011; 7 (5): 561–568. DOI: 10.1016/j.soard.2011.01.044.
 32. Bruinsma B.G., Uygun K., Yarmush M.L., Saeidi N. Surgical models of Roux-en-Y gastric bypass surgery and sleeve gastrectomy in rats and mice. *Nat. Protoc.* 2015; 10 (3): 495–507. DOI: 10.1038/nprot.2015.027.
 33. Kraljevic M., Delko T., Kustler T., Osto E., Lutz T., Thommen S., Droezer R.A., Rothwell L., Oertli D., Zingg U. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass versus laparoscopic mini gastric bypass in the treatment of obesity: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2017; 18 (1): 226. DOI: 10.1186/s13063-017-1957-9.
 34. Sanchez-Pernaute A., Herrera M.A., Perez-Aguirre M.E., Talavera P., Cabrerizo L., Matia P., Diez-Valladares L.,

- Barabash A., Martin-Antona E., Garcia-Botella A., Garcia-Almenta E.M., Torres A. Single anastomosis duodeno-ileal bypass with sleeve gastrectomy (SADI-S). One to three-year follow-up. *Obes. Surg.* 2010; 20 (12): 1720–1726. DOI: 10.1007/s11695-010-0247-3.
35. Rubino F., Marescaux J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. *Ann. Surg.* 2004; 239 (1): 1–11. DOI: 10.1097/01.sla.0000102989.54824.fc.
36. Speck M., Cho Y.M., Asadi A., Rubino F., Kieffer T.J. Duodenal-jejunal bypass protects GK rats from {beta}-cell loss and aggravation of hyperglycemia and increases enteroendocrine cells coexpressing GIP and GLP-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 300 (5): 923–932. DOI: 10.1152/ajpendo.00422.2010.
37. De Paula A.L., Macedo A.L.V., Rassi N. Laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus for patients with a body mass index less than 35. *Surg. Endosc.* 2008; 22 (3): 706–716. DOI: 10.1007/s00464-007-9472-9.
38. Бабенко А.Ю., Неймарк А.Е., Анисимова К.А., Гринева Е.Н. Эффекты бариатрических операций на уровень гормонов, регулирующих массу тела. В чем основа успеха? *Ожирение и метаболизм.* 2014; 4: 3–11. DOI: 10.14341/OMET201443-11. [Babenko A.Yu., Nejmark A.E., Anisimova K.A., Grineva E.N. Effects of bariatric surgery on the level of hormones that regulate body weight. What is the basis of success? *Ozhirenie i metabolism – Obesity and Metabolism.* 2014; 4: 3–11 (in Russ.)].
39. De Paula A.L., Stival A.R., Macedo A. Prospective randomized controlled trial comparing 2 versions of laparoscopic ileal interposition associated with sleeve gastrectomy for patients with type 2 diabetes with BMI 21–34 kg/m². *Surg. Obes. Relat. Dis.* 2010; 6 (3): 296–304. DOI:10.1016/j.soard.2009.10.005.
40. Kota S.K., Ugale S., Gupta N., Modi K.D. Laparoscopic ileal interposition with diverted sleeve gastrectomy for treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Syndr.* 2012; 6 (3): 125–131. DOI: 10.1016/j.dsx.2012.09.014.
41. Yang Y.H., Yan J., Wu Y.J. Impact of sleeve gastrectomy with ileal interposition duodenojejunal bypass operation on lipid metabolism in nonobese type 2 diabetes mellitus patients. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery.* 2013; 16 (3): 273–275. DOI: 10.1186/s40064-015-1216-z.

Поступила в редакцию 07.11.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Корнюшин Олег Викторович, канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория метаболических нарушений, Институт эндокринологии, НМИЦ имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Торопова Яна Геннадьевна, канд. биол. наук, зав. лабораторией биопротезирования и кардиопротекции, Институт экспериментальной медицины, НМИЦ имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Неймарк Александр Евгеньевич, канд. мед. наук, зав. лабораторией метаболических нарушений, Институт эндокринологии, НМИЦ имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Берко Олеся Михайловна, студент, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

Глистенкова Диана Дмитриевна, студент, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

Карелли Лукас Гумарес, студент, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

Полозов Александр Сергеевич, мл. науч. сотрудник, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург.

Галагудза Михаил Михайлович, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины, НМИЦ имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

(✉) Корнюшин Олег Викторович, e-mail: o.kornyushin@gmail.com.

УДК 616-008.9-089]-092.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-59–74

For citation: Korniyushin O.V., Toropova Ya.G., Neimark A.E., Berko O.M., Glistenkova D.D., Carelli L.G., Polozov A.S., Galagudza M.M. Surgical correction of metabolic syndromes in rats: methodological aspects. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2018; 17 (1): 59–74.

Surgical correction of metabolic syndromes in rats: methodological aspects

Korniyushin O.V.¹, Toropova Ya.G.¹, Neimark A.E.¹, Berko O.M.²,
Glistenkova D.D.², Carelli L.G.², Polozov A.S.³, Galagudza M.M.¹

¹ V.A. Almazov National North-West Medical Research Centre
2, Akkuratova Str., Saint Petersburg, 197341, Russian Federation

² Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University
6/8, Lva Tolstogo Str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation

³ *I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences
6, Emb. Makarova., Saint Petersburg, 199034, Russian Federation*

ABSTRACT

Aim. The study was aimed at detailed description of the technique of bariatric surgical interventions with varying metabolic effects in the rat. We also provided comparison between different surgical operations and considered rationale for making several types of surgery simultaneously.

Materials and methods. The study was performed on 120 male Wistar rats (380–510 g) housed in the SPF rodent facility. The animals were anesthetized using isoflurane anesthesia. The following types of surgery were performed and described: sleeve gastrectomy, gastric bypass, gastrojejunal bypass, ileal transposition, and combination of sleeve gastrectomy and ileal transposition. The technical complexity of surgery was scored according to 10-point scale.

Results. The methodological aspects of sleeve gastrectomy, gastric bypass, gastrojejunal bypass, and ileal transposition in rats are considered in detail. Sleeve gastrectomy and gastric bypass are the most commonly used types of bariatric surgery, while gastrojejunal bypass and ileal transposition are specifically aimed at modeling of metabolic effects. The article considered preoperative planning as well as major stages of surgery. We focused attention on perioperative complications and technical nuances.

Conclusion. Modeling of bariatric surgical interventions on the small laboratory rodents is challenging, requires sophisticated manual skills and microsurgical equipment. The illustrated description of these surgical interventions will provide a useful reference for beginners in this laborious part of experimental surgery.

Key words: obesity, diabetes mellitus type 2, metabolic syndrome, bariatric surgery, sleeve gastrectomy, gastric bypass, gastrojejunal bypass, ileal transposition.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The work is supported by the RSF grant No. 17-75-30052.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre (Protocol No. 16-7 of August 19, 2016).

Received 07.11.2017

Accepted 06.02.2018

Kornyushin Oleg V., PhD, Leading Researcher, Laboratory of Metabolic Disorders, Institute of Endocrinology, V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation.

Toropova Yana G., PhD, Head of the Laboratory of Bioprosthesis and Cardioprotection, Institute of Experimental Medicine, V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation.

Berko Olesya M., Student, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation.

Glistenkova Diana D., Student, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation.

Carelli Lucas G., Student, Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation.

Polozov Alexander S., Researcher, I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russian Federation.

Galagudza Mikhail M., DM, Director of the Institute of Experimental Medicine, V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation.

(✉) **Kornyushin Oleg V.**, e-mail: o.kornyushin@gmail.com.

УДК 616.12-005.4-036.12-039.71-085.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-75–84

Для цитирования: Котловский М.Ю., Дыгай А.М., Трифонова О.Ю., Жданов В.В., Удуд В.В., Чурин А.А., Якимович И.Ю., Титов В.Н., Краснов Е.В., Котловская Л.Ю. Дозозависимое влияние статинов на изменение содержания отдельных жирных кислот плазмы крови и их комплексов при вторичной профилактике хронической формы ишемической болезни сердца у мужчин и женщин. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 75–84.

Дозозависимое влияние статинов на изменение содержания отдельных жирных кислот плазмы крови и их комплексов при вторичной профилактике хронической формы ишемической болезни сердца у мужчин и женщин

Котловский М.Ю.¹, Дыгай А.М.¹, Трифонова О.Ю.¹, Жданов В.В.¹, Удуд В.В.¹, Чурин А.А.¹, Якимович И.Ю.², Титов В.Н.³, Краснов Е.В.², Котловская Л.Ю.²

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФиРМ) им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

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

³ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Россия, 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучить дозозависимое влияние симvastатина на изменение содержания отдельных жирных кислот (ЖК) плазмы крови и их комплексов при вторичной профилактике хронической формы ишемической болезни сердца (ИБС) у мужчин и женщин.

Материалы и методы. Методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии проведено исследование абсолютного и относительного содержания ЖК и их комплексов в плазме крови у 125 больных хронической формой ИБС до и после 2 мес терапии симvastатином в дозах 40 мг (89 человек) и 80 мг (36 человек).

Результаты. Терапия симvastатином способствовала пропорциональному снижению суммы ЖК как за счет уменьшения содержания ненасыщенных (НЖК), которые понизились преимущественно за счет полиненасыщенных ЖК (ПНЖК), так и насыщенных (НасЖК) жирных кислот. Содержание мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) снизилось только у женщин на фоне приема симvastатина в дозе 40 мг. Статин увеличил эндогенное образование $\omega 6$ ПНЖК, $\omega 9$ МНЖК и НасЖК четных (кроме дозы 80 мг), у женщин при приеме статина в дозе 40 мг – $\omega 3$ ПНЖК, а у мужчин при приеме статина в дозе 80 мг – $\omega 7$ МНЖК. У женщин при приеме статина в дозе 80 мг соотношение $\omega 3/\omega 6$ ПНЖК сместилось в сторону $\omega 6$ ПНЖК, а у мужчин при приеме статина в дозе 40 мг – в сторону $\omega 3$ ПНЖК. Только доза статина 80 мг как фактор сдвинула соотношение C20:5/C20:4 в сторону тимнодовой $\omega 3$ ПНЖК. У женщин при приеме статина в дозе 40 мг/сут отмечался сдвиг в сторону β -окисления C18:1(9), а у мужчин при дозе 80 мг – в сторону образования. Во всех случаях усилилась антиоксидантная защита ПНЖК, но менее сильной она была при дозе 40 мг/сут. В то же время образование МНЖК преобладало над

✉ Котловский Михаил Юрьевич, e-mail: m.u.kotlovskiy@mail.ru.

образованием НасЖК. Во всех случаях выражено снизилось при приеме статина содержание очень длинноцепочечных ЖК (C22–26). Более сильным оно было у женщин. Понижилось абсолютное содержание ЖК-субстратов энергии.

Заключение. Симвастатин, контролируя количественный состав циркулирующего пула липопротеидов, жирных кислот и холестерина, неоднозначно, в зависимости от дозы препарата, влиял на метаболизм ЖК, изменяя их количественное и качественное содержание и выполнение биологических функций.

Ключевые слова: жирные кислоты, ишемическая болезнь сердца, симвастатин.

ВВЕДЕНИЕ

Ведущая роль во вторичной профилактике сердечно-сосудистых осложнений отводится статинам [1, 2]. Эффективность и безопасность гиполипидемической терапии симвастатином подтверждены во многих исследованиях, ставших основой доказательной базы для всей группы статинов [1, 2]. Сравнение двух стратегий вторичной профилактики ишемической болезни сердца (ИБС) разными дозами препарата (средней 40 мг и максимальной 80 мг) свидетельствовало о том, что «агрессивная» терапия способствовала более выраженному снижению риска основных сердечно-сосудистых событий без признаков осложнений [2]. В то же время известно, что статины оказывают влияние на метаболизм жирных кислот (ЖК). Механизм действия препаратов связан с интенсивным поглощением клетками транспортеров ЖК – липопротеинов низкой (ЛПНП) и очень низкой (ЛПОНП) плотности, а также со способностью статинов оказывать влияние на экспрессию десатураз и элонгаз [3]. В свою очередь ЖК, обеспечивая целостность биомембран, регулируя активность клеточных функций, участвуя в процессах энергообразования и воспаления, играют важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [4].

Цель исследования – изучить дозозависимое влияние симвастатина на изменение содержания отдельных ЖК плазмы крови и их комплексов при вторичной профилактике хронической формы ИБС у мужчин и женщин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 155 человек (58 женщин и 67 мужчин) с верифицированным диагнозом ИБС, стенокардия напряжения функционального класса (ФК) I–II. Средний возраст мужчин составил ($57,94 \pm 8,5$) лет, женщин – ($63,14 \pm 10,3$) лет. Критерии исключения: инфаркт миокарда, прогрессирующая стенокардия, мозговой инсульт, тромбоэмболия легочной артерии давностью менее 6 мес до исследования, стено-

кардия напряжения ФК III–IV, тяжелые нарушения функции печени и почек, злоупотребление алкоголем, отсутствие добровольного информированного согласия на участие в исследовании. На протяжении 2 мес 89 пациентов получали симвастатин (симвагексал) в дозе 40 мг и 36 пациентов – в дозе 80 мг.

Уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), триацилглицеролов (ТГЛ) и общего холестерина (ОХС) в плазме крови определяли гомогенным энзиматическим колориметрическим методом на автоматическом анализаторе COBAS INTEGRA 400 plus (США). Рассчитывали содержание ЛПОНП, ЛПНП и коэффициент атерогенности (КА). Исследование жирно-кислотного состава плазмы крови проводилось после 12-часового голодания. Метилловые эфиры ЖК получали методом кислого метанолиза [5]. Разделение ЖК проводили на капиллярной колонке HP-5MS (Agilent Technologies, США), определение эфиров ЖК – на хромато-масс-спектрометре (Agilent Technologies, США). Идентификация ЖК осуществлялась по времени выхода стандартов ЖК, а также по масс-спектрометрии электронных облаков с использованием библиотеки масс-спектрометрических отпечатков (NIST MS Search 2.0 и AMDIS Analysis). Содержание ЖК выражалось в абсолютных величинах (мкмоль/мл) и процентах от общей суммы площадей пиков ЖК. В качестве интегрального показателя использовался индекс ненасыщенности (ИН), рассчитанный как отношение процентного содержания ненасыщенных жирных кислот (НЖК) к насыщенным жирным кислотам (НасЖК), умноженное на 100. Анализ полученных результатов проводили с помощью статистического пакета прикладных программ SPSS 18.0 for Windows. Достоверность различий пула ЖК исходно и после 2 мес лечения симвастатином определяли методом Вилкоксона. Значимость гендерных и дозовых различий в спектре ЛП и ЖК до и после лечения симвастатином определяли методом Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Терапия симвастатином в дозе 40 и 80 мг способствовала прогрессивному снижению общего содержания ЖК в плазме крови больных ИБС. Уменьшение суммарного содержания ЖК в плазме крови произошло за счет пропорционального

снижения абсолютного уровня НЖК и НасЖК при неизменном их относительном содержании (рис. 1).

Снижение суммы ЖК было обусловлено усилением поглощения печенью ЛПНП и ЛПОНП из циркулирующей крови (рис. 2) вследствие блокирования ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы эндогенного синтеза холестерина [3].

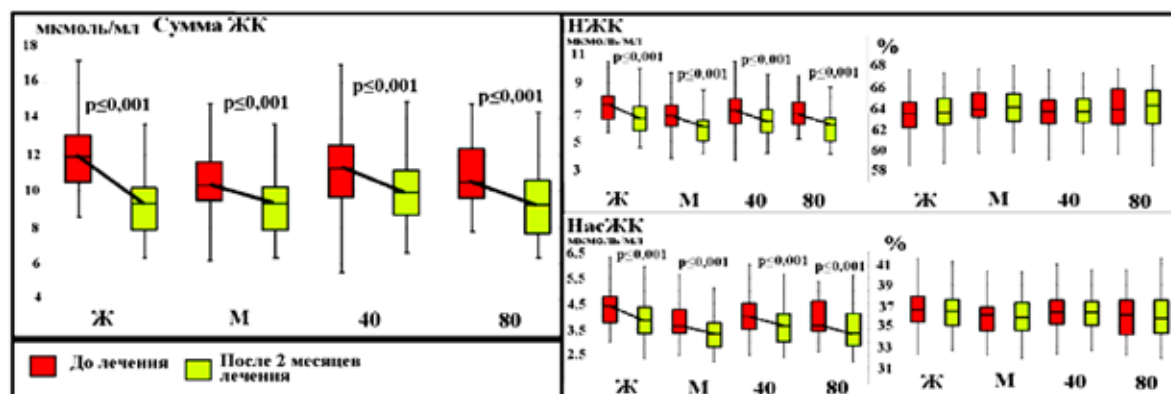


Рис. 1. Влияние симвастатина в дозе 40 и 80 мг на уровень суммарного содержания ЖК, НЖК и НасЖК в плазме крови у мужчин и женщин с ИБС: Ж – женщины; М – мужчины; 40 – доза симвастатина 40 мг; 80 – доза симвастатина 80 мг

Fig. 1. The effect of simvastatin at the amount of 40 and 80 mg over the total level of FA, UFA and SFA in plasma in men and women with ischemic heart disease: hereinafter: F – women; M – men; 40 – dose of simvastatin 40 mg; 80 – a dose of simvastatin 80 mg

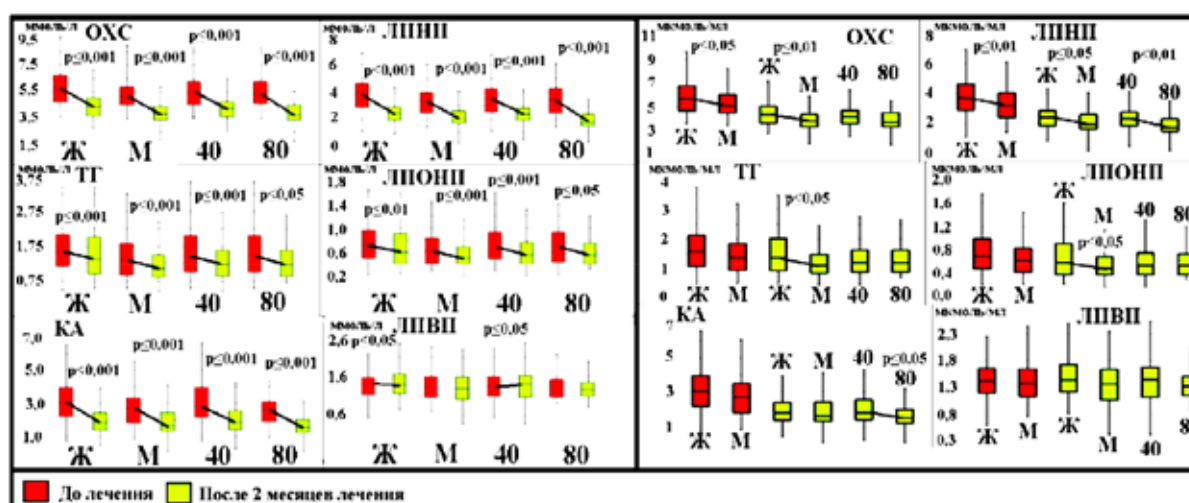


Рис. 2. Влияние симвастатина в дозе 40 и 80 мг на показатели липидного спектра у мужчин и женщин с ИБС

Fig. 2. Effect of simvastatin at the amount of 40 and 80 mg on the lipid profile in men and women with ischemic heart disease

Аналогичная динамика была характерна и для уровня триглицеридов (ТГ), ОХС в плазме крови и КА. Женский пол явился фактором, способствующим снижению содержания в плазме крови ЛПВП. Терапия симвастатином в дозе 40 мг, напротив, увеличивала значение данного показателя.

Симвастатин снизил абсолютное содержание полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) и ЖК-субстра-

тов витамина F в плазме крови в сочетании с увеличением относительного содержания мононенасыщенных ЖК (МНЖК). Снижение абсолютного содержания МНЖК отмечено только у женщин в дозе 40 мг (рис. 3).

Симвастатин только в дозе 80 мг у лиц обоих пола качественно изменил ЛП, сместив отношение ПНЖК/МНЖК и ЖК-субстратов ви-

тамина F/МНЖК в сторону МНЖК. Другим качественным изменением ЛП является аналогичное смещение отношения МНЖК/НасЖК в сторону МНЖК. ЛПОНП, переносящие ТГ и состоящие из МНЖК, в силу своих физико-химических свойств более чувствительны к действию липаз, чем включающие НасЖК. Это способствует уменьшению срока их циркуляции в плазме крови и ускоряет процесс поглощения

тканями [6]. Симвастатин снизил абсолютное содержание $\omega 3$ и $\omega 6$ ПНЖК. У женщин в дозе 80 мг соотношение $\omega 3/\omega 6$ изменилось в сторону $\omega 6$ ПНЖК, а у мужчин в дозе 40 мг – в сторону $\omega 3$. Это произошло за счет более сильного снижения содержания ЛПОНП под воздействием статина у мужчин и аналогичного изменения содержания ЛПНП при терапии симвастатином в дозе 80 мг.

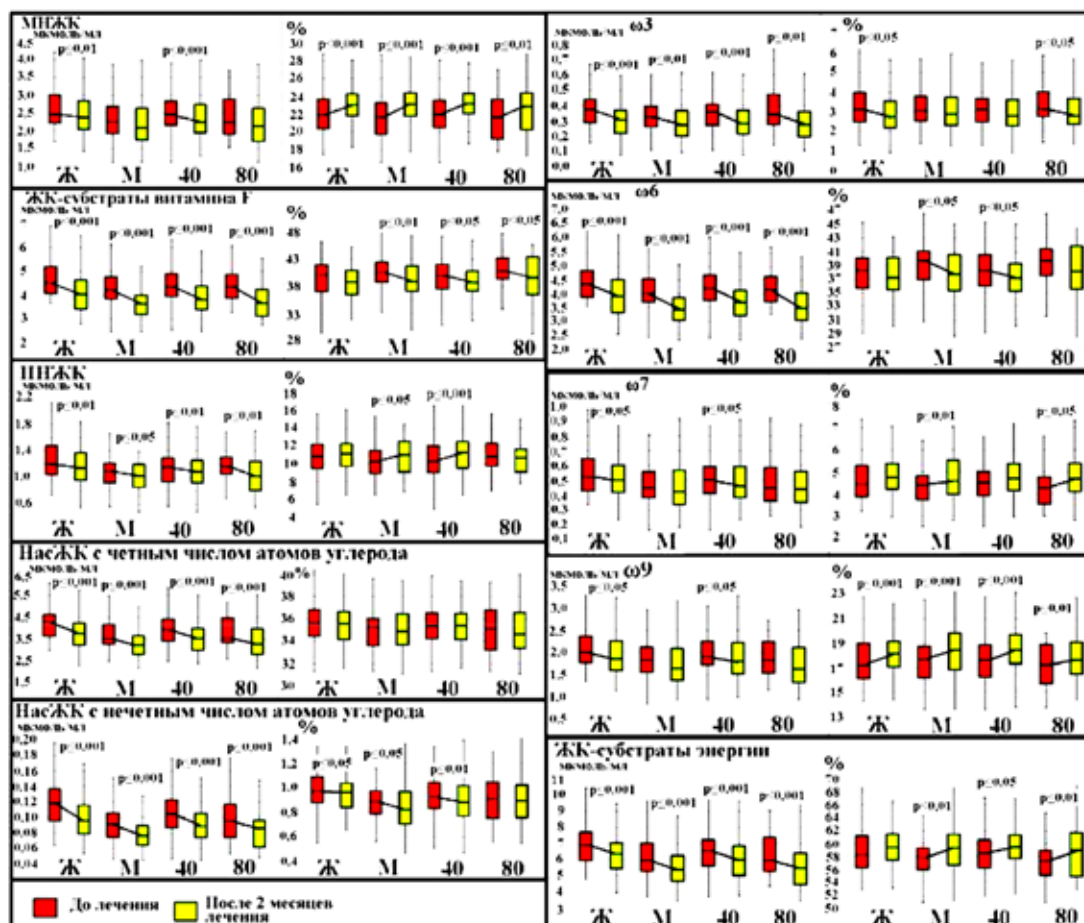


Рис. 3. Влияние симвастатина в дозе 40 и 80 мг на содержание комплексов ЖК в плазме крови у мужчин и женщин с ИБС

Fig. 3. Effect of simvastatin at the amount of 40 and 80 mg on the content of FA complexes in the blood plasma in men and women with ischemic heart disease

Одной из важнейших функций ЖК является обеспечение тканей энергией [4]. В качестве субстратов энергии используются преимущественно НасЖК и МНЖК, обеспечивая в физиологических концентрациях до 80% АТФ в миокарде [7]. Терапия статином снизила абсолютное содержание ЖК-субстратов энергии. У мужчин с ИБС эти изменения сочетались с увеличением их относительного содержания. У женщин симвастатин в дозе 40 мг снизил абсолютное содержание $\omega 7$, $\omega 9$

МНЖК и удельный вес $\omega 9$ МНЖК. Увеличение относительного содержания $\omega 7$ МНЖК отмечено у мужчин на фоне приема 80 мг статина. Симвастатин в дозе 40 мг у женщин сдвинул отношение $\omega 7/\omega 9$ МНЖК в сторону $\omega 9$. У мужчин с ИБС на фоне приема 80 мг имело место пропорциональное увеличение образования $\omega 7$ и $\omega 9$ МНЖК.

Влияние симвастатина в дозе 40 и 80 мг на содержание отдельных ЖК в плазме крови у мужчин и женщин с ИБС представлено на рис. 4.

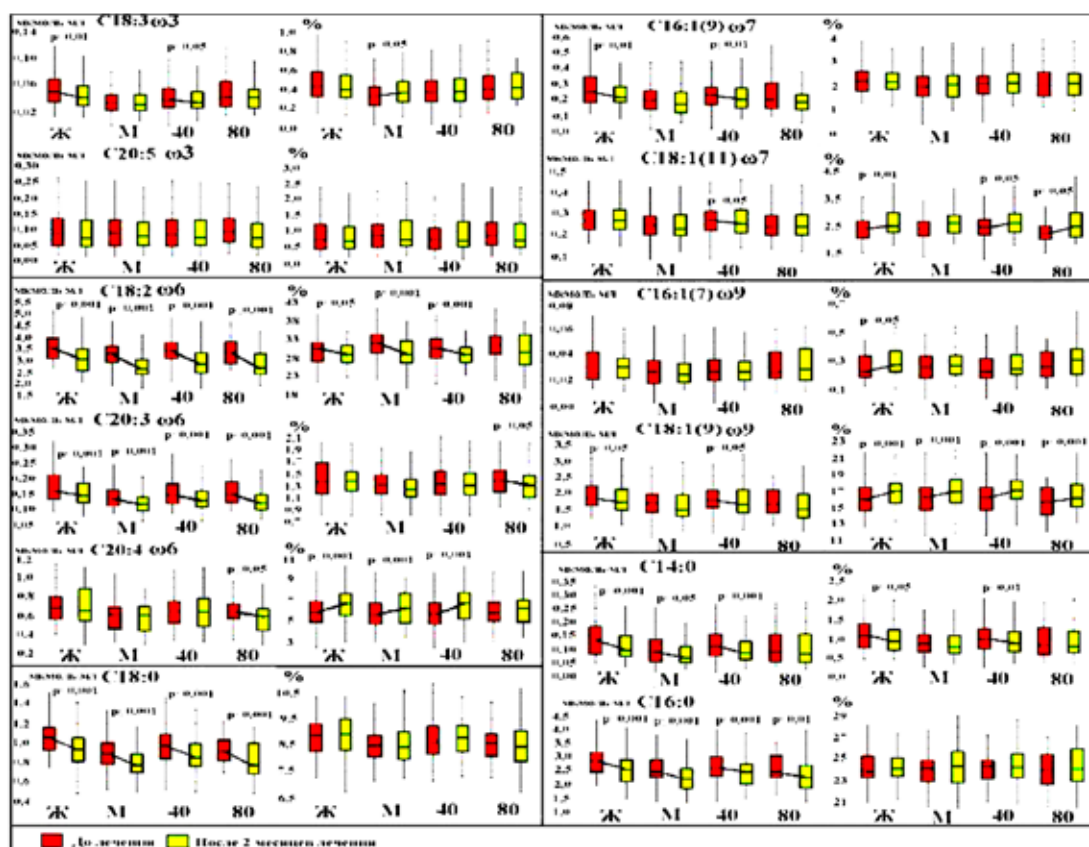


Рис. 4. Влияние симвастатина в дозе 40 и 80 мг на содержание отдельных ЖК в плазме крови у мужчин и женщин с ИБС

Fig. 4. The effect of simvastatin at the amount of 40 and 80 mg on the concentration of particular FA in the blood plasma in men and women with ischemic heart disease

Терапия симвастатином в дозе 40 мг у женщин обеспечила снижение содержания α-линолевой (C18:3) НЖК при отсутствии влияния на содержание тимнодовой (C20:5) НЖК, которая является непосредственным субстратом синтеза ω3 эйкозаноидов. Отношение C18:3/C20:5 позволило оценить изменение активности эндогенного образования ω3 ПНЖК из экзогенных предшественников. Только у женщин в дозе 40 мг статины сдвинул его в сторону продукта реакции, что свидетельствовало об усилении эндогенного образования ω3 ПНЖК. При нарастании инсулинорезистентности происходит ингибирование активности Δ5 и 6 десатуразы и эндогенного синтеза ПНЖК [8]. Отсутствие влияния на этот показатель симвастатина в дозе 80 мг свидетельствует об увеличении поступления в ткани экзогенных ПНЖК, что делает их эндогенное образование ненужным.

Препарат снизил абсолютное содержание линолевой (C18:2) и дигомо-γ-линоленовой (C20:3) ω6 ПНЖК. Симвастатин в дозе 80 мг способство-

вал снижению абсолютного содержания арахидоновой (C20:4) НЖК, а в дозе 40 мг у лиц обоего пола увеличил ее относительное содержание. Увеличение содержания арахидоновой (C20:4) ПНЖК обуславливает повышение концентрации ее метаболитов и повышает риск тромбообразования, формирования атеросклеротических бляшек, развитие аллергических, воспалительных заболеваний, ускорение клеточной пролиферации и замедление кровотока [9]. Синтез арахидоновой ω6 ПНЖК преобладает над скоростью образования ω3 ПНЖК [3]. Анализ влияния статина на отношение C18:2/C20:4 и C20:3/C20:4 позволил оценить изменение эндогенного синтеза ω6 ПНЖК из экзогенных предшественников. Симвастатин сдвинул отношение C20:3/C20:4 в сторону арахидоновой (C20:4) НЖК, что свидетельствовало об усилении активности Δ5 десатуразы. Сдвиг отношения C18:2/C20:4 в сторону продукта реакции (C20:4) у лиц обоего пола при воздействии дозой 40 мг свидетельствовал об усилении активности системы Δ5 и Δ6 десатураз. В дозе

80 мг статинов изменил отношение непосредственных субстратов синтеза эйкозаноидов (C20:5/C20:4) в сторону тимнодовой (C20:5) ω 3 НЖК. Тимнодовая (C20:5) ω 3 ПНЖК модулирует активность каскада арахидоновой (C20:4) НЖК. Уменьшение образования из арахидоновой (C20:4) НЖК тромбоксана A₂ и снижение тромбоцит-активирующего фактора лежит в основе антитромбоцитарного действия данной ω 3 ПНЖК [10].

Симвастатин увеличил относительное содержание вакценовой (C18:1) НЖК и олеиновой (C18:1) МНЖК. У женщин в дозе 40 мг способствовал снижению абсолютного содержания олеиновой (C18:1) и пальмитолеиновой (C16:1) ω 7 МНЖК, а также изменил отношение C16:1(9)/C18:1(11), характеризующее изменение активности элонгазы пальмитолеиновой (C16:1) МНЖК, в сторону продукта реакции – вакценовой (C18:1) МНЖК. Пальмитолеиновая (C16:1) МНЖК может образовываться в процессе β -окисления олеиновой (C18:1) МНЖК. Изменение отношения C16:1(7)/C18:1(9) МНЖК позволило оценить изменение под воздействием статина соотношения процессов окисления и образования олеиновой (C18:1) МНЖК. Симвастатин в дозе 40 мг у женщин изменил данное соотношение в сторону окисления, а у мужчин в дозе 80 мг – в сторону ее образования. Одним из ключевых патогенетических звеньев развития инсулинорезистентности является нарушение метаболизма свободных ЖК с повышением их концентрации в крови и последующим усилением окисления, что снижает интенсивность утилизации глюкозы тканями [11]. Изменение отношения C16:1(9)/C18:1(9) позволило уточнить: инсулинорезистентную или инсулинорезистентную десатуразу симвастатин активировал в большей степени. На фоне приема статина в дозе 40 мг у женщин произошел сдвиг в сторону олеиновой (C18:1) МНЖК. Это свидетельствовало о более сильной активации именно инсулинорезистентной десатуразы, тогда как у мужчин при воздействии дозы 80 мг активация десатураз была пропорциональной. Олеиновая (C18:1) МНЖК играет роль основного антиоксиданта, защищая ПНЖК от окисления в плазме крови [4]. Статин сдвинул отношение ЖК-субстратов витамина F/C18:1(9) МНЖК в сторону олеиновой (C18:1) МНЖК. Симвастатин в дозе 80 мг изменил и отношение ПНЖК/C18:1(9) в сторону олеиновой МНЖК. Это свидетельствует о прогрессирующем усилении антиоксидантной защиты ПНЖК при увеличении дозы препарата.

Статин снизил абсолютное содержание НасЖК с четным и нечетным числом атомов

углерода. В организме человека нечетные НасЖК не образуются [4]. Отношение четные НасЖК/нечетные НасЖК позволяет оценить эндогенное образование НасЖК с четным числом атомов углерода под воздействием статина. Только в дозе 40 мг симвастатин усилил их образование, изменив это отношение в сторону четных НасЖК. Ранее была доказана связь ИБС с содержанием в крови миристиновой (C14:0), пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) НасЖК [12]. Позитивный эффект симвастатина подтвержден способностью препарата уменьшать абсолютное содержание пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) НасЖК. В дозе 40 мг статинов снизил и абсолютное содержание миристиновой (C14:0) НасЖК. Чем более выражена инсулинорезистентность, тем большее количество глюкозы будет использовано для синтеза пальмитиновой (C16:0) НасЖК [10]. Гиполипидемическая терапия оказала влияние на отношение C14:0/C16:0 НасЖК. У женщин в дозе 40 мг был отмечен сдвиг в сторону продукта реакции пальмитиновой (C16:0) НасЖК, при увеличении дозы статина до 80 мг данное отношение сместилось в сторону субстрата реакции – миристиновой (C14:0) НасЖК.

В организме ω 7 МНЖК могут быть и эндогенно синтезированы из НасЖК. Ферменты (десатуразы и элонгазы) являются инсулинорезистентными [13]. Через отношение C16:0/C16:1(9) НасЖК было оценено изменение активности инсулинорезистентной десатуразы. Только у мужчин в дозе 80 мг статинов сдвинул это соотношение в сторону продукта реакции – пальмитолеиновой (C16:1) ω 7 НасЖК. Из эндогенно синтезированной пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) НасЖК с помощью Δ 9-десатуразной ферментативной системы образуется олеиновая (C18:1) ω 9 МНЖК. Этот процесс нарушается при наличии резистентности к инсулину [14]. Динамика отношения C18:0/C18:1(9) позволила оценить изменение активности инсулинорезистентной десатуразы. Терапия симвастатином способствовала увеличению активности инсулинорезистентной десатуразы. Клетки организма защищаются от патологического действия пальмитиновой (C16:0) НасЖК путем ее десатурации и превращения в олеиновую (C18:1) МНЖК с последующей этерификацией в ТГЛ. Избыток пальмитиновой (C16:0) НасЖК усиливает апоптоз [4]. Симвастатин повысил защиту организма от негативного действия пальмитиновой (C16:0) НасЖК за счет смещения отношения C16:0/C18:1(9) в сторону олеиновой (C18:1) МНЖК. Кроме того, митохондрии окисляют олеиновую (C18:1) МНЖК с более высокой скоростью реакции, чем пальмитиновую

(C16:0) НасЖК, а внутриклеточная гормонозависимая липаза быстрее гидролизует олеиновую (C18:1) НЖК, чем пальмитиновую (C16:0) НасЖК из ТГА [4].

Влияние симвастатина в дозе 40 и 80 мг на содержание очень длинноцепочечных ЖК митохондриях в плазме крови у мужчин и женщин с ИБС представлено на рис. 5.

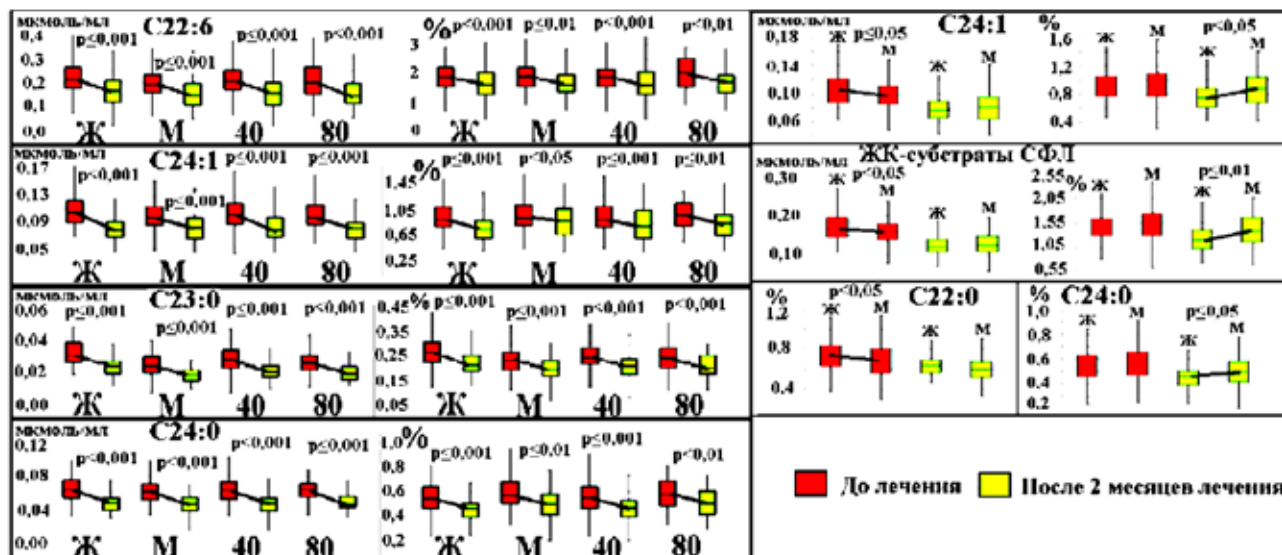


Рис. 5. Влияние симвастатина в дозе 40 и 80 мг на содержание очень длинноцепочечных ЖК в плазме крови у мужчин и женщин с ИБС

Fig. 5. Effect of simvastatin at the amount of 40 and 80 mg on the concentration of long-chain FA in the blood plasma in men and women with ischemic heart disease

В физиологических условиях все поступившие в кровь с пищей ЖК должны быть окислены. Окисление может происходить как в митохондриях, так и в пероксисомах [4]. Доказана способность статинов усиливать активность пероксисом [15]. Практически все очень длинные ЖК (C22–26) являются экзогенными, поэтому система карнитин-ацилтрансферазы не переносит их через мембрану митохондрий [4]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что симвастатин способствовал прогрессивному снижению абсолютного и относительного содержания данных ЖК, более выраженному у женщин с ИБС. Это дает основание предположить более сильную активацию пероксисомального окисления у лиц данного пола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффекты статина, применяемого в пределах доз терапевтического диапазона при вторичной профилактике ИБС, позволяя контролировать количественный состав циркулирующего пула липопротеидов, жирных кислот и холестерина, были неоднозначны в отношении изменения их качественных характеристик и межтканевого перераспределения, зависящего от дозы и гендерной принадлежности. Ингибиторы ГМГ-КоА-ре-

дуктазы в средней и максимальной дозе изменяли качественный состав эндогенно образованных ЛПОНП, приводя к прогрессивному дозе преобладанию МНЖК. Одним из внедозовых эффектов статинов явилась индукция эндогенного образования ПНЖК из экзогенных предшественников с более выраженным образованием ЖК семейства $\omega 6$. При этом только при воздействии высоких доз был установлен приоритет $\omega 3$ субстратов синтеза эйкозаноидов в соотношении с $\omega 6$ производными.

Индукционное статином перераспределение (плазма/ткани) ЖК и их катаболизм, через механизмы пероксисомального и митохондриального окисления, вне зависимости от дозы препарата привело к количественному снижению пула ЖК-субстратов энергии в плазме крови. В то же время было отмечено позитивное прогрессивное качественное изменение ЖК-субстратов энергии. Для статина в отношении его влияния на систему антиоксидантной защиты ПНЖК в плазме крови выявлен дозозависимый эффект, где средние и высокие дозы обеспечивали прогрессивное повышение антиоксидантного статуса за счет изменения соотношения субстрата окисления и антиоксиданта (олеиновой МНЖК) в сторону антиоксиданта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Котловский М.Ю., Дыгай А.М., Трифонова О.Ю., Якимович И.Ю., Титов В.Н., Краснов Е.В., Котловская Л.Ю. – проведение практической части исследования, разработка концепции, дизайна, анализ и интерпретация данных. Котловский М.Ю., Дыгай А.М., Трифонова О.Ю., Жданов В.В., Удуд В.В., Чуринов А.А., Титов В.Н. – разработка концепции, дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом при Красноярском государственном медицинском университете им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 12/2008 от 26 ноября 2008 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Рекомендации по лечению стабильной ишемической болезни сердца. EAS 2013. *Российский кардиологический журнал*. 2014; 7: 7–79. [Recommendations for treatment of stable ischemic heart disease. EAS 2013. *Rossiiskij kardiologičeskij žurnal – Russian Journal of Cardiology*. 2014; 7: 7–79 (in Russ.)].
2. Аронов Д.М. Статины – основное лекарственное средство для реального снижения смертности от ИБС. *Русский медицинский журнал*. 2012; 4: 1–7 [Aronov D.M. Statins – the basic medicine for a real decline in mortality from CHD. *Russkij medicinskij žurnal – Russian Medical Journal*. 2012. 4: 1–7 (in Russ.)].
3. Zhou G.S. Atorvastatin reduces plaque vulnerability in an atherosclerotic rabbit model by altering the 5-lipoxygenase pathway. *Cardiology*. 2010; 115: 221–228.
4. Титов В.Н. Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы патогенеза, диагностики, профилактики и лечения атеросклероза. М.: Алтис, 2002: 730. [Titov V.N. Atherosclerosis as a pathology of polyene fatty acids. Biological basis of pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment of atherosclerosis. M.: Altis Publ., 2002: 730 (in Russ.)].
5. Струкова Е.Г. Количественное определение микробных сообществ полости рта с использованием хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02. Томск, 2010: 184. [Strukova E.G. Quantifying microbial communities of the oral cavity with the use of chromat-mass-spectrometry of microbial markers: dis. ... kand. him. nauk. Tomsk, 2010: 184 (in Russ.)].
6. Gillingham L.G. High-oleic rapeseed (canola) and flaxseed oils modulate serum lipids and inflammatory biomarkers in hyper cholesterolaemic subjects. *Br. J. Nutr.* 2011; 105 (3): 417–427.
7. MacDonald J.I.S. Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biachim. Biophys. Acta*. 1991; 1084: 105–119.
8. Ghebremeskel K. Liver triacylglycerols and free fatty acids in streptozotocin induced diabetic rats have atypical n-6 and n-3 pattern. *Comp. Biochem. Physiol. Part*. 2002; 132: 349–354.
9. Сергеева М.Г. Каскад арахидоновой кислоты. М.: Народное образование, 2006: 256. [Sergeeva M.G. The cascade of arachidonic acid. M.: Narodnoe obrazovanie Publ., 2006: 256 (in Russ.)].
10. Harper C.R., Jacobson T.A. The fats of life. *Arch. Intern. Med.* 2001; 161: 2185–2192.
11. Delarue J., Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2007; 10 (2): 142–148.
12. Kris-Etherton P.M., Griel A.E., Psota T.L. et al. Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: intake, sources, digestion, and absorption. *Lipids*. 2005; 40: 1193–1200.
13. Jiang Z., Michal J.J., Wu X.L. et al. The Heparan and Heparin Metabolism Pathway is Involved in Regulation of Fatty Acid Composition. *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7 (5): 659–663.
14. Hodson L., Frayn K.N. Hepatic fatty acid partitioning. *Curr. Opin. Lipidol.* 2011; 22: 216–224.
15. Бойцов С.А., Кухарчук В.В., Карпов Ю.А. и др. Субклинический атеросклероз как фактор риска сердечно-сосудистых осложнений. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2012; 11 (3): 82–86. [Bojcov S.A., Kuharchuk V.V., Karpov Ju.A. i dr. Subclinical atherosclerosis as a risk factor for cardiovascular complications. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika – Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2012; 11 (3): 82–86 (in Russ.)].

Поступила в редакцию 11.01.2018

Утверждена к печати 20.02.2018

Котловский Михаил Юрьевич, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория лекарственной токсикологии, НИИ-Фирм им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Дыгай Александр Михайлович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, академик-секретарь секции медико-биологических наук Отделения медицинских наук РАН, научный руководитель НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Трифорова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, врач-кардиолог, терапевтическое отделение клиники, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Жданов Вадим Вадимович, д-р мед. наук, профессор, директор НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Удут Владимир Васильевич, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, заслуженный деятель науки РФ, зав. лабораторией физиологии, молекулярной и клинической фармакологии, зам. директора по научной и лечебной работе, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Чурин Алексей Александрович, д-р мед. наук, зав. отделом лекарственной токсикологии, зам. директора по стандартизации доклинических исследований, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Якимович Инесса Юрьевна, канд. мед. наук, доцент, зав. кафедрой гигиены, СибГМУ, г. Томск.

Титов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории клинической биохимии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс, г. Москва.

Краснов Евгений Валерьевич, ассистент, кафедра гигиены, СибГМУ, г. Томск.

Котловская Лариса Юрьевна, ассистент, кафедра гигиены, СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Котловский Михаил Юрьевич**, e-mail: m.u.kotlovskiy@mail.ru.

УДК 616.12-005.4-036.12-039.71-085.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-75-84

For citation: Kotlovsky M.Yu., Dygai A.M., Trifonova O.Yu., Zhdanov V.V., Udut V.V., Churin A.A., Yakimovich I.Yu., Titov V.N., Krasnov E.V., Kotlovskaya L.Yu. Dose-dependent effect of statins on the change in the content of individual fatty acids of blood serum and their complexes of men and women with secondary prevention of chronic coronary heart disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 75–84.

Dose-dependent effect of statins on the change in the content of individual fatty acids of blood serum and their complexes of men and women with secondary prevention of chronic coronary heart disease

Kotlovsky M.Yu.¹, Dygai A.M.¹, Trifonova O.Yu.¹, Zhdanov V.V.¹, Udut V.V.¹, Churin A.A.¹, Yakimovich I.Yu.², Titov V.N.³, Krasnov E.V.², Kotlovskaya L.Yu.²

¹ *Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPRM), National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences (RAS)
3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russian Federation*

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

³ *National Medical Research Center of Cardiology (NMRCC)
15a, Cherepkovskaya Str., Moscow, 121552, Russian Federation*

ABSTRACT

Objective. To study the dose-dependent effect of simvastatin on the change of content of individual fatty acids (FA) profile of blood serum and their complexes with secondary prevention of chronic coronary heart disease (CHD) in groups of men and women.

Materials and methods. Gas-liquid chromatography-mass spectrometry was used to establish the absolute and relative levels of FA in serum of 155 CHD patients before and after treatment by simvastatin in doses of 40 mg (89 people) and 80 mg (36 people).

Results. The statin lowered the content of the FA proportionally by reducing the unsaturated (UFA), mainly polyunsaturated (PUFA) FA, and saturated (SFA) FA. The level of monounsaturated fatty acids

(MUFA) decreased in women at a dose of 40 mg. The statin increased endogenous formation of $\omega 6$ PUFA, $\omega 9$ MUFA, and SFA even (except 80 mg), in group of women (40 mg) – $\omega 3$ PUFA, and in men (80 mg) – $\omega 7$ MUFA. In women after receiving simvastatin 80 mg, the ratio $\omega 3/\omega 6$ PUFA has been shifted to $\omega 6$ PUFA, but in men after receiving simvastatin 40 mg in the direction of $\omega 3$ PUFA. Only the dose of 80 mg shifted the ratio of C20:5/C20:4 in the direction of $\omega 3$ PUFA. In group of women after receiving simvastatin 40 mg was observed a shift to β -oxidation of C18:1(9), and in men at the dose of 80 mg in the direction of its synthesis. In all cases, increased antioxidant protection of PUFA, but less strong it was at the dose of 40 mg. At the same time the formation of MUFA prevailed over the synthesis of SFA. Absolute content of FA - substrates of energy decreased. In all cases, was noticed the decrease of content of FA this very long chain (C22-26), stronger in women.

Conclusion. Simvastatin controlling the quantitative composition of the pool of circulating lipoproteins, FA and cholesterol, is ambiguous, depending on dose, affect the metabolism of fatty acids, changing their quantitative and qualitative composition and performing biological functions.

Key words: fatty acids, ischemic heart disease, simvastatin.

Received 11.01.2018

Accepted 20.02.2018

Kotlovsky Mikhail Yu., PhD, Researcher, GRIPRM, NRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Dygai Aleksandr M., DM, Professor, Academician of the RAS, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Secretary of the Life Science Section of the Russian Academy of Science Medical Department, Academic Advisor of GRIPRM, NRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Trifonova Olga Yu., DM, Cardiologist, Department of Therapy, GRIPRM, NRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Zhdanov Vadim V., DM, Professor, Director of GRIPRM, NRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Udut Vladimir V., DM, Professor, Corresponding Member of the RAS, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Head of the Physiology, Molecular and Clinical Pharmacology Laboratory, Deputy Director for Scientific and Medical Works, GRIPRM, NRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Churin Aleksei A., DM, Head of the Medical Toxicology Department, Deputy Director for Preclinical Research Standardization, GRIPRM, NRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Yakimovich Inessa Yu., PhD, Associate Professor, Head of the Department of Hygiene, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Titov Vladimir N., DM, Professor, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, NMRCC, Moscow, Russian Federation.

Krasnov Evgeny V., Assistant, Department of Hygiene, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Kotlovskaya Larisa Yu., Assistant, Department of Hygiene, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Kotlovsky Mikhail Yu., e-mail: m.u.kotlovskiy@mail.ru.

УДК 616.14-005.755-089.168.1-06-053.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-85–93

Для цитирования: Краснова Н.М., Сычев Д.А., Александрова Т.Н., Венгеровский А.И. Риск развития послеоперационных венозных тромбоэмболических осложнений у пожилых больных. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 85–93.

Риск развития послеоперационных венозных тромбоэмболических осложнений у пожилых больных

Краснова Н.М.¹, Сычев Д.А.², Александрова Т.Н.¹, Венгеровский А.И.³

¹ Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова
Россия, 677000, г. Якутск, ул. Белинского, 58

² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования
Россия, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, 2/1

³ Сибирский государственный медицинский университет
Россия, 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – оценить риск развития венозных тромбоэмболических осложнений у пожилых больных травматологического и ортопедического профиля, изучить распространенность и структуру коморбидности, ее влияние на риск тромбообразования, оценить эффективность и безопасность терапии антикоагулянтами.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ историй болезни 120 пациентов старше 65 лет и 64 пациентов моложе 65 лет, поступивших в отделение травматологии и ортопедии многопрофильного стационара. Учитывали демографические данные, основной диагноз, сопутствующие заболевания согласно рубрикам Международной классификации болезней X пересмотра, характер оперативного вмешательства и методы профилактики венозных тромбоэмболических осложнений. Риск развития тромбозов оценивали по шкале Caprini, возможные лекарственные взаимодействия – с помощью интернет-ресурса Drug Interaction Checker на сайте www.drugs.com.

Результаты. Наиболее частыми причинами госпитализации пожилых больных являлись артрозы крупных суставов (40%), переломы пояснично-крестцового отдела позвоночника, бедренной кости и костей таза (21,7%). Оперативные вмешательства со средней продолжительностью ($87 \pm 31,4$) мин выполнены 85% больным: большие операции – 58,3%, малые – 26,7%. Коморбидные состояния диагностировали у 90% больных. Чаще всего болезни костно-мышечной системы сочетались с болезнями системы кровообращения (81,7%). Высокий риск венозных тромбоэмболических осложнений выявлен у 75% пациентов, умеренный – у 10%. Для фармакопрофилактики тромбозов 80% пациентам назначали прямой ингибитор фактора Ха ривароксабан или низкомолекулярный гепарин эноксапарин натрия. Пациентов моложе 65 лет госпитализировали по поводу артрозов и переломов, а также для коррекции внутрисуставных повреждений колена. Операции средней продолжительностью ($58,4 \pm 25,8$) мин потребовались 51,6% больным: большие операции – 32,8%, малые – 18,8%. Коморбидные заболевания диагностировали у 73,4%, в основном болезни системы кровообращения. Высокий риск развития венозных тромбоэмболических осложнений выявлен у 29,7%, умеренный – у 50,0%; 73% больных принимали эноксапарин натрия или ривароксабан в течение ($8,6 \pm 4,2$) дней.

✉ Венгеровский Александр Исаакович, e-mail: pharm-sibgmu@rambler.ru.

Заключение. У 85% пожилых пациентов с патологией костно-мышечной системы возрастает риск развития венозных тромбоэмболических осложнений. Основными факторами риска являются характер и длительность оперативного вмешательства и коморбидность.

Ключевые слова: венозные тромбоэмболические осложнения, больные пожилого возраста, коморбидность, антикоагулянты.

ВВЕДЕНИЕ

Старение населения – одна из доминирующих тенденций XXI в. Заболеваемость пожилых людей в два раза выше, людей старческого возраста – в шесть раз выше, чем лиц молодого возраста [1]. В структуре заболеваемости пожилых пациентов одно из ведущих мест занимают болезни костно-мышечной системы. По распространенности они уступают лишь сердечно-сосудистой патологии [2]. Клинические проявления инволютивно-дегенеративных изменений диагностируют более чем у половины пожилых людей [3].

Многим пожилым больным требуются реконструктивно-пластические операции на костях и суставах. Они сопряжены с высоким риском венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО) вследствие возрастных изменений и сопутствующей соматической патологии (коморбидность). При обширных хирургических операциях выраженный стресс-ответ способен истощать метаболические резервы стареющего организма [4, 5].

Крупные ортопедические и травматологические операции создают высокую тромбогенную опасность из-за застоя крови, компенсаторной активации свертывающей системы, торможения фибринолиза, дистрофических изменений гладких мышц сосудов [6]. Частота ВТЭО после протезирования тазобедренного сустава достигает 42–57%, после протезирования коленного сустава – 41–87%, при переломах костей голени – 59%, при переломе бедра – 67% [7, 8]. У пациентов старше 70 лет частота послеоперационных тромбозов в 10 раз выше по сравнению с их частотой у молодых больных [9]. Риск ВТЭО увеличивают коморбидные заболевания – атеросклероз, сердечная недостаточность, сахарный диабет 2 типа, онкологическая патология [10, 11].

В последние десятилетия благодаря тактике ранней активизации пациентов, применению новых фармакологических подходов и разработке современных клинических рекомендаций достигнут значительный прогресс в лечении и профилактике ВТЭО. Согласно данным наблюдательного регистра RIETE, смертность пожилых пациентов от тромбоэмболии легочной артерии снизилась с 3,3 до 1,8%, длительность госпитализации сокра-

тилась на 32% [12]. В международных исследованиях установлена низкая приверженность врачей к соблюдению клинических рекомендаций по профилактике ВТЭО, не всем больным назначают антикоагулянты. В международном регистре ENDORSE сообщается, что в Российской Федерации адекватная профилактика ВТЭО проводилась только у 26% больных хирургического профиля с факторами риска. Это ниже среднего мирового показателя в 2,3 раза [13]. Отсутствие единых прогностических шкал для стратификации риска ВТЭО создает трудности для клинициста при выборе индивидуальной тактики ведения больных.

Цель данной работы – оценить риск развития ВТЭО у больных старше 65 лет травматологического и ортопедического профиля, изучить распространенность и структуру коморбидности, ее влияние на риск тромбообразования, оценить эффективность и безопасность терапии антикоагулянтами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

По медицинской информационной системе ретроспективно анализировали истории болезни 120 пациентов старше 65 лет и 64 пациентов моложе 65 лет (контрольная группа). Больные лечились в ортопедическом и травматологическом отделениях многопрофильного стационара. Учитывали демографические данные, основной диагноз, сопутствующую патологию согласно рубрикам Международной классификации болезней (МКБ-10), характер оперативного вмешательства. Риск развития ВТЭО оценивали по шкале Caprini [14]. Коморбидность регистрировали по количеству классов МКБ-10 у одного больного, изучали ее структуру и влияние на риск развития ВТЭО. Лекарственные взаимодействия выявляли с помощью интернет-ресурса Drug Interaction Checker на сайте www.drugs.com [15]. Полученные данные статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группе пациентов в возрасте $(72,3 \pm 5,8)$ лет было 31,7% (38/120) мужчин и 68,3% (82/120) жен-

щин. Контрольная группа включала больных в возрасте ($55,8 \pm 3,7$) лет, в том числе мужчин – 48,4% (31/64), женщин – 51,6% (33/64). Наиболее часто пожилых больных госпитализировали по поводу артрозов тазобедренного и коленного суставов (40%, 48/120), переломов пояснично-крестцового отдела позвоночника, костей таза и бедренной кости (21,7%, 26/120). Другие причины госпитализации – бурсопатии, деформации конечностей, травмы синовиальных оболочек и сухожилий, вывихи суставов и злокачественные новообразования. У больных моложе 65 лет диагностировали артрозы крупных суставов (28,1%, 18/64), переломы по-

звоночника, костей таза и бедренной кости (11%, 7/64), такому же количеству больных требовалась коррекция внутрисуставных повреждений колена. Сравнительная характеристика пациентов разного возраста представлена в табл. 1.

Оперативные вмешательства средней продолжительностью ($87 \pm 31,4$) мин выполнены 85,0% больным пожилого возраста (102/120): большие операции – 58,3% (70/120), малые – 26,7% (32/120). Операции средней продолжительностью ($58,4 \pm 25,8$) мин потребовались 51,6% (33/64) пациентам моложе 65 лет: большие операции – 32,8% (21/64), малые – 18,8% (12/64).

Т а б л и ц а 1

Диагнозы у пациентов с заболеваниями опорно-двигательного аппарата			
Диагноз по МКБ-10		Пациенты старше 65 лет, абс. (%)	Пациенты младше 65 лет, абс. (%)
<i>Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани</i>			
M15–M19 Артрозы	M17 Гонартроз [артроз коленного сустава]	38 (31,7)	12 (18,7)
	M16 Коксартроз [артроз тазобедренного сустава]	10 (8,3)	6 (9,4)
M20–M25 Другие поражения суставов	M23 Внутрисуставные поражения колена	6 (5,0)	7 (11,0)
M70–M79 Другие болезни мягких тканей	M71 Другие бурсопатии	6 (5,0)	3 (4,7)
M20–M25 Другие поражения суставов	M21 Другие приобретенные деформации конечностей	4 (3,3)	2 (3,1)
M80–M85 Нарушения плотности и структуры кости	M84.1 Несрастание перелома [псевдоартроз]	4 (3,3)	1 (1,5)
M65–M68 Поражения синовиальных оболочек и сухожилий	M66 Спонтанный разрыв синовиальной оболочки и сухожилия	2 (1,7)	1 (1,5)
M60–M63 Болезни мышц	M61 Кальцификация и оссификация мышцы	2 (1,7)	0
<i>Новообразования</i>			
C00–C97 Злокачественные новообразования	C40 Злокачественное новообразование костей и суставных хрящей	2 (1,7)	0
<i>Травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин</i>			
S30–S39 Травмы живота, нижней части спины, поясничного отдела позвоночника и таза	S32 Перелом пояснично-крестцового отдела позвоночника и костей таза	8 (6,7)	5 (7,8)
S70–S79 Травмы области тазобедренного сустава и бедра	S72 Перелом бедренной кости	18 (15,0)	2 (3,1)
S80–S89 Травмы колена и голени	S83 Вывих, растяжение и перенапряжение капсульно-связочного аппарата коленного сустава	6 (5,0)	6 (9,4)
S40–S49 Травмы плечевого пояса и плеча	S42 Перелом на уровне плечевого пояса и плеча	4 (3,3)	5 (7,8)
S60–S69 Травмы запястья и кисти	S62 Перелом на уровне запястья и кисти	2 (1,7)	7 (11,0)
S80–S89 Травмы колена и голени	S89 Перелом голени, включая голеностопный сустав	6 (5,0)	7 (11,0)
T80–T88 Осложнения хирургических и терапевтических вмешательств, не классифицированные в других рубриках	T84 Осложнения, связанные с внутренними ортопедическими протезными устройствами, имплантатами и трансплантатами	2 (1,7)	0

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: абс. – абсолютное число больных.

У 90,0% (108/120) пациентов старше 65 лет, поступивших в многопрофильный стационар по поводу патологии костно-мышечной системы, диагностировали коморбидные заболевания. Среднее число заболеваний у одного пациента составляло $5,0 \pm 2,3$. Два заболевания диагностировали у 5,0% больных (6/120), от трех до пяти – у 40,0% (48/120), от шести до восьми – у 40,0%

(48/120), более восьми – у 5,0% (6/120). В группе пациентов моложе 65 лет коморбидные заболевания регистрировали у 73,4% (47/64), среднее число заболеваний у одного пациента составляло $2,8 \pm 1,6$. Два заболевания диагностировали у 32,8% больных (21/64), от трех до пяти – у 21,8% (14/64), от шести до восьми – у 14,1% (9/64), более восьми – у 4,7% (3/64) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Сопутствующие заболевания больных с патологией опорно-двигательного аппарата		
Сопутствующие заболевания	Пациенты старше 65 лет, абс. (%)	Пациенты младше 65 лет, абс. (%)
Болезни системы кровообращения	98 (81,7)	46 (71,9)
Болезни органов пищеварения	40 (33,3)	58 (90,6)
Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм	40 (33,3)	30 (46,9)
Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ	32 (26,5)	21 (32,8)
Болезни органов дыхания	30 (25,0)	18 (28,1)
Болезни мочеполовой системы	28 (23,3)	32 (50,0)
Психические расстройства и расстройства поведения	10 (8,3)	3 (4,7)
Некоторые инфекционные и паразитарные болезни	8 (6,7)	2 (3,1)
Болезни уха и сосцевидного отростка	8 (6,7)	3 (4,7)
Симптомы, признаки и отклонения от нормы, выявленные при клинических и лабораторных исследованиях, не классифицированные в других рубриках	2 (1,7)	4 (6,3)

Болезни системы кровообращения в различных сочетаниях сопутствовали ортопедической и травматологической патологии у 81,7% (49/60) пожилых больных. Наиболее часто выявляли артериальную гипертензию (73,3%, 88/120), преимущественно высокого и очень высокого кардиоваскулярного риска, ишемическую болезнь сердца (46,7%, 56/120) и атеросклероз (22,5%, 27/120). Диагностировали также атрофические и (или) эрозивные гастриты и дуодениты (55,0%, 66/120), железодефицитную анемию (33,3%, 40/120). Всем пожилым пациентам с эрозивными поражениями верхних отделов желудочно-кишечного тракта назначали ингибиторы протонной помпы омепразол или пантопразол в терапевтических дозах. У пациентов моложе 65 лет коморбидные заболевания также представлены патологией органов кровообращения (71,9%, 46/64), пищеварения (90,6%, 58/64), мочеполовой системы (50,0%, 32/64). У женщин диагностировали железодефицитную анемию.

Риск развития ВТЭО по балльной системе Caprini у пожилых больных составлял от 2 до 12 баллов, в среднем ($8,27 \pm 1,04$) балла: высокий риск выявлен у 75,0% (90/120) пациентов, умерен-

ный – у 10,0% (12/120). В зависимости от степени риска выбирали методы профилактики тромбозов. Они включали раннюю активизацию, механические методы и назначение антикоагулянтов. Ранняя активизация и использование компрессионного трикотажа были необходимы пациентам независимо от риска развития ВТЭО. Большинству пациентов (80,0%, 96/120) с высоким и умеренным риском дополнительно проводили фармакопрофилактику согласно Российским клиническим рекомендациям по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозов и тромбоэмболий [16]. Больным (3,4%, 4/120) с низкой скоростью клубочковой фильтрации (15–29 мл/мин/1,73 м²) антикоагулянты были противопоказаны, для пациентов (1,7%, 2/120) со скоростью клубочковой фильтрации 30–44 мл/мин/1,73 м² антикоагулянт выбора являлся препарат низкомолекулярного гепарина эноксапарин натрия с коррекцией дозы согласно клиническим рекомендациям [16]. Больные со скоростью клубочковой фильтрации >30 мл/мин/1,73 м² (75%, 90/120) получали эноксапарин натрия или прямой ингибитор фактора Ха ривароксабан. Средняя продолжительность

терапии антикоагулянтами у пациентов старше 65 лет составляла $(12,4 \pm 4,6)$ дней. В группе пациентов моложе 65 лет высокий риск развития ВТЭО выявлен у 29,7% (19/64), умеренный – у 50,0% (32/64). Скорость клубочковой фильтрации у всех больных превышала 30 мл/мин/1,73 м², 73% пациентов принимали эноксапарин натрия или ривароксабан в течение $(8,6 \pm 4,2)$ дней.

Состояние вен нижних конечностей методом ультразвукового дуплексного сканирования оценивали у 13,0% (16/120) пожилых больных с подозрением на тромбоз глубоких вен, при этом признаков тромбоза не выявлено. У пациентов ортопедического и травматологического профиля диагностическая ценность инструментального обследования невелика, так как в 85% случаев тромбозы протекают бессимптомно. Для ранней верификации тромбоза глубоких вен в послеоперационном периоде при высоком риске ВТЭО необходимо ультразвуковое сканирование вен [17, 18].

Около трети пожилых пациентов (29,6%, 52/120) получали потенциально опасные комбинации эноксапарина натрия или ривароксабана с нестероидными противовоспалительными средствами. На фоне комбинированной терапии у 20% (24/120) пациентов на $(25,3 \pm 4,8)\%$ уменьшался уровень гемоглобина, что можно рассматривать как триггер развития кровотечения. В контрольной группе антикоагулянты и нестероидные противовоспалительные средства принимали 12,5% (8/64) больных, у 1,6% (1/64) уменьшалось содержание гемоглобина.

ОБСУЖДЕНИЕ

У хирургических больных риск венозного тромбоза зависит от травматичности и продолжительности оперативного вмешательства. При протезировании тазобедренного и коленного сустава и операциях при переломах нижней конечности вероятность ВТЭО у пожилых пациентов увеличивается более чем в 10 раз, при артроскопических операциях на коленном суставе – в 2–9 раз [17]. У пожилых больных повышается прокоагулянтный статус: возникает дефицит антитромбина III, протеинов С и S, тканевого активатора плазминогена, интенсивно синтезируются факторы свертывания крови и антифосфолипидные антитела [19, 20].

Развитию тромбозов способствует коморбидность. В проведенном нами исследовании более чем у 80% пациентов старше 65 лет встречалась патология сердечно-сосудистой системы. Общи-

ми факторами риска являются ограничение физической активности и диетические погрешности. Воспаление в перихондральных тканях и сосудах имеет близкие патогенетические механизмы [21, 22]. При атеросклерозе, ишемической болезни сердца и повреждении костей и суставов возрастают адгезия и агрегация тромбоцитов, в плазме увеличивается количество фактора 4, β -тромбоглобулина и других маркеров активации тромбоцитов [10]. Опасность ВТЭО повышают метаболические нарушения при сахарном диабете 2 типа и ожирении. У таких больных операции на костях и суставах и длительная гипоксия повреждают значительную массу тканей [17].

Высокая частота ВТЭО у пожилых пациентов с патологией костно-мышечной системы и сопутствующими гастроэнтерологическими заболеваниями обусловлена уменьшением биодоступности и ускоренной элиминацией антикоагулянтов [23]. Применение антикоагулянтов у пожилых больных требует особой осторожности из-за высокого риска кровотечений. У большинства больных опасна комбинация антикоагулянтов с нестероидными противовоспалительными средствами [24, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возраст старше 65 лет повышает у 85,0% пациентов с патологией костно-мышечной системы риск развития ВТЭО. Основными факторами риска являются характер и длительность оперативного вмешательства, коморбидность, изменения фармакокинетики и активности антикоагулянтов. Коморбидность выявлена у 90% пациентов ортопедического и травматологического профиля, при этом наиболее часто встречались патология сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта и метаболические нарушения. Пациентам с умеренным и высоким риском развития ВТЭО необходимо назначать антикоагулянты с учетом их индивидуальной эффективности и переносимости.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Краснова Н.М., Александрова Т.Н. – проведение клинического исследования, написание статьи. Сычев Д.А. – разработка дизайна исследования. Венгеровский А.И. – редактирование статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова» (протокол № 19 от 12 октября 2007 г.)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Газизов Р.М. Основы лекарственной терапии в пожилом и старческом возрасте. *Практическая медицина*. 2010; 41 (2): 11–14. [Gazizov R.M. Foundations of drug therapy in elderly and senile age. *Prakticheskaya meditsina – Practical Medicine*. 2010; 41 (2): 11–14 (in Russ.)].
- Шляффер С.И. Заболеваемость населения старше трудоспособного возраста Российской Федерации. *Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики*. 2014; 1: 15–28. [Shlyafser S.I. Morbidity of working age population in Russian Federation. *Sovremennye problemy zdavookhraneniya i meditsinskoy statistiki – Current Problems of Health Care and Medical Statistics*. 2014; 1: 16–27 (in Russ.)].
- Ярыгин В.Н., Мелентьев А.С. Руководство по геронтологии и гериатрии в 4 томах. Т. 1. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010: 720. [Yarygin V.N., Melent'ev A.S. Manual for gerontology and geriatrics in 4 volumes. Vol. 1. M.: GEOTAR-Media Publ., 2010: 720 (in Russ.)].
- Naughton C., Feneck R.O. The impact of age on 6-month survival in patients with cardiovascular risk factors undergoing elective non-cardiac surgery. *Int. J. Clin. Pract.* 2007; 61 (6): 768–776. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2007.01304.x.
- Овечкин А.М. Хирургический стресс-ответ, его патофизиологическая значимость и способы модуляции. *Региональная анестезия и лечение острой боли*. 2008; 2 (2): 49–62. [Ovechkin A.M. Surgical stress-response, its pathophysiological significance and methods of modulation. *Regionarnaya anesteziya i lechenie ostroy boli – Regional Anesthesia and Acute Pain Management*. 2008; 2 (2): 49–62 (in Russ.)].
- Кавалерский Г.М., Ченский А.Д., Катунян П.И., Петров Н.В., Прохорова М.Ю. Анализ риска тромбоэмболических осложнений при эндопротезировании суставов в раннем послеоперационном периоде у пациентов пожилого возраста. *Московский хирургический журнал*. 2015; 44 (4): 9–14. [Kavalerskiy G.M., Chenskiy A.D., Katunyan P.I., Petrov N.V., Prokhorova M.Yu. Analysis of the risk of thromboembolic complications in early postoperative period after arthroplasty replacement in elderly. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal – Moscow Surgical Journal*. 2015; 44 (4): 9–14 (in Russ.)].
- Зубков В.И., Тхоревский А.В., Лазарчук Н.Д. Выбор оптимального метода тромбопрофилактики в травматологии. *Травма*. 2011; 12 (1): 39–41. [Zubkov V.I., Tkhorovskiy A.V., Lazarchuk N.D. Choice of optimal method of thromboprophylaxis in traumatology. *Trauma – Trauma*. 2011; 12 (1): 39–41 (in Russ.)].
- Фирсов С.А., Верещагин Н.А., Матвеев Р.П., Любошевский П.А., Федотов Е.А. Рациональная тромбопрофилактика при травме нижних конечностей: расставляем приоритеты. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; 5: 67. [Firsov S.A., Vereshchagin N.A., Matveev R.P., Lyuboshevskiy P.A., Fedotov E.A. Rational thromboprophylaxis in trauma of the lower limbs: prioritize. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya – Modern Problems of Science and Education*. 2016; 5: 67 (in Russ.)].
- Копёнкин С.С., Бут-Гусаим А.Б., Скорогляд А.В., Кондрашенко Е.Н., Голенко С.В., Мильто А.С. Система профилактики венозных тромбоэмболических осложнений в травматолого-ортопедических отделениях стационара. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2008; 6 (1): 141–150. [Kopenkin S.S., But-Gusaim A.B., Skoroglyadov A.V. System of prophylaxis of venous thromboembolic complications in trauma-orthopedic departments of the hospital. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina – Annals of People's Friendship University of Russia. Series: Medicine*. 2008; 6 (1): 141–150 (in Russ.)].
- Момот А.П., Баркаган З.С. Исследование системы гемостаза у лиц пожилого возраста: основные цели и методы. *Клиническая геронтология*. 2007; 4 (1): 44–49. [Momot A.P., Barkagan Z.S. Investigation of hemostasis in elderly patients: main aims and methods. *Klinicheskaya gerontologiya – Clinical Gerontology*. 2007; 4 (1): 44–49 (in Russ.)].
- ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur. Heart J.* 2014; 35 (43): 3033–3073. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu283.
- Jiménez D., de Miguel-Díez J., Guijarro R., Trujillo-Santos J., Otero R., Barba R., Muriel A., Meyer G., Yusen R., Monreal M. Trends in the management and outcomes of acute pulmonary embolism: analysis from the RIETE registry. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016; 67 (2): 162–170. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.10.060.
- Сулимов В.А., Беленцов С.М., Головина Н.И., Дубровная Н.П., Жилков К.П., Елисеева К.В., Казанчан П.О., Редькин А.В., Родоман Г.В., Фитилева Т.В., Фридман И.А., Шершнева В.Н. ENDORSE: международный проект по выявлению госпитальных больных, имеющих риск венозных тромбоэмболических осложнений. Результаты российского регистра у больных хирургического профиля. *Флебология*. 2009; 3 (1): 54–62. [Sulimov V.A., Belentsov S.M., Golovina N.I., Dubrovnyaya N.P., Zhilkov K.P., Eliseeva K.V., Kazanchan P.O., Red'kin A.V., Rodoman G.V., Fitileva T.V., Fridman I.A., Shershnev V.N. ENDORSE: International study to detect hospital patients at risk of venous thromboembolism. Results of the Rus-

- sian register of surgical patients. *Flebologiya – Phlebology*. 2009; 3 (1): 54–62 (in Russ.)].
14. Caprini J.A. Thrombotic risk assessment: A hybrid approach. URL: <http://www.venousdisease.com>. DOI: 10.1016/b978-012369515-4/50044-2.
 15. Drug Interaction Checker. URL: <http://www.drugs.com>.
 16. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО). *Флебология*. 2015; 9 (4–2): 1–52. [Russian clinical guidelines for the diagnosis, treatment and prophylaxis of venous thromboembolic complications. *Flebologiya – Phlebology*. 2015; 9 (4–2): 1–52 (in Russ.)].
 17. Мишустина Н.Н. Анализ распространенности венозного тромбоза у травматологических и ортопедических больных и методов прогнозирования рисков его развития. *Актуальные направления научных исследований: от теории к практике*. 2016; 2 (2–1): 81–85. [Mishustina N.N. Analysis of prevalence of venous thromboembolic complications in trauma and orthopedics patients and methods for predicting its development. *Aktual'nye napravleniya nauchnykh issledovaniy: ot teorii k praktike – Current Ways of Scientific Research: From Theory to Practice*. 2016; 2 (2–1): 81–85 (in Russ.)].
 18. Ершов Д.С., Копенкин С.С., Скороглядов А.В. Профилактика и лечение тромбозов глубоких вен нижних конечностей при эндопротезировании тазобедренного сустава. *Вестник РГМУ*. 2015; 3: 14–19. [Ershov D.S., Kopenkin S.S., Skoroglyadov A.V. Prophylaxis and treatment of deep vein thrombosis of lower extremities at total hip replacement. *Vestnik RGMU – Bulletin of Russian State Medical University*. 2015; 3: 14–19 (in Russ.)].
 19. Griffin F.A., Resar R.K. IHI global trigger tool for measuring adverse events. IHI Innovation Series white paper. Cambridge, MA: Institute for Healthcare Improvement; 2009. URL: <http://www.IHI.org>.
 20. Жаринова В.Ю. Особенности диагностики и лечения тромбоэмболии легочной артерии у пациентов пожилого возраста. *Проблемы старения и долголетия*. 2015; 24 (3–4): 327–339. [Zharinova V.Yu. Pulmonary embolism in the geriatric patients: peculiarities of diagnosis and treatment. *Problemy stareniya i dolgoletiya – Problems of Aging and Longevity*. 2015; 24 (3–4): 327–339 (in Russ.)].
 21. Мендель О.И. Остеоартроз и сердечно-сосудистые заболевания у лиц пожилого возраста: клинические и патогенетические взаимосвязи. *Успехи геронтологии*. 2010; 23 (2): 304–313. [Mendel' O.I. Osteoarthritis and cardiovascular pathology in older persons: clinical and pathogenesis relationship. *Uspekhi gerontologii – Advances in Gerontology*. 2010; 23 (2): 304–313 (in Russ.)].
 22. Супрун Э.В. Коморбидность при остеоартрозе у пожилых пациентов: выбор тактики лечения. *Рациональная фармакотерапия*. 2013; 28 (3): 47–52. [Suprun E.V. Comorbidity in osteoarthritis in older patients: the choice of treatment. *Ratsional'naya farmakoterapiya – Rational Pharmacotherapy*. 2013; 28 (3): 47–52 (in Russ.)].
 23. Abraham N.S., Singh S., Alexander G.C., Heien H., Haas L.R., Crown W., Shah N.D. Comparative risk of gastrointestinal bleeding with dabigatran, rivaroxaban and warfarin: population based cohort study. *BMJ*. 2015; 350 (4): h1857. DOI: 10.1136/bmj.h1857.
 24. Моисеев С.В. Антикоагулянтная терапия у пациентов в возрасте 75–80 лет и старше с неклапанной фибрилляцией предсердий. *Клин. фармакол. тер.* 2017; 26 (4): 5–14. [Moiseev S.V. Oral anticoagulants in the very elderly patients with atrial fibrillation. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya – Clinical Pharmacology and Therapy*. 2017; 26 (4): 5–14 (in Russ.)].
 25. Глушков Н.И., Жане А.К., Опенченко С.В. Комплексная профилактика послеоперационных венозных тромбоэмболических осложнений у пациентов пожилого и старческого возраста. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2010; 123 (9): 60–63. [Glushkov N.I., Zhane A.K., Openchenko S.V. Results of intermittent pneumatic compression of lower extremities in complex preventive of postoperative venous thrombotic complications in patients of elderly and senile age. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik – Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2010; 123 (9): 60–63 (in Russ.)].

Поступила в редакцию 07.11.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Краснова Наталья Михайловна, канд. мед. наук, доцент, кафедра госпитальной терапии, профессиональных болезней и клинической фармакологии медицинского института, Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, г. Якутск.

Сычев Дмитрий Алексеевич, д-р мед. наук, профессор РАН, член-корр. РАН, зав. кафедрой клинической фармакологии и терапии, Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования, г. Москва.

Александрова Туйара Никоновна, врач-гематолог, Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, г. Якутск.

Венгеровский Александр Исаакович, д-р мед. наук, профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, зав. кафедрой фармакологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Венгеровский Александр Исаакович, e-mail: pharm-sibgmu@rambler.ru.

УДК 616.14-005.755-089.168.1-06-053.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-85-93

For citation: Krasnova N.M., Sychev D.A., Aleksandrova T.N., Vengerovskii A.I. Risk of postoperative venous thromboembolic complication development in elderly patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 85–93.

Risk of postoperative venous thromboembolic complication development in elderly patients

Krasnova N.M.¹, Sychev D.A.², Aleksandrova T.N.¹, Vengerovskii A.I.³

¹ Ammosov North-Eastern Federal University
58, Belinsky Str., Yakutsk, 677000, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
2/1, Barrikadnaya Str., Moscow, 125993, Russian Federation

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

ABSTRACT

Aim. To evaluate venous thromboembolic complication risk in elderly patients admitted to trauma and orthopedics departments, prevalence of comorbidity, its impact on the risk of thrombotic events, efficacy and safety of prophylactic anticoagulant therapy.

Materials and methods. Authors performed a retrospective analysis of medical records of 120 patients aged 65 years and over. Analyzed data included demographic data, main diagnosis, co-existing pathology according to International Classification of Diseases X, type of surgery and anticoagulant prophylaxis. Risk of development of venous thromboembolic complications was assessed by the Caprini scale. Potential drug-drug interactions were checked using Drug Interaction Checker available, created by company Cerner Multum according to FDA recommendations.

Results. The most frequent causes of hospitalization were destructive large joint arthritis (40%) and fractures of lower extremities (21.7%). Surgeries with an average duration of 87 ± 31.4 min were performed in 85% of patients, of which major surgery – 68.6%, minor – 31.4%. Comorbidity was detected in 90% of elderly patients admitted to hospital because of pathology of the musculoskeletal system. Pathology of musculoskeletal system most often was combined with cardiovascular diseases (81.7%). A moderate risk of venous thromboembolic complications was detected in 10% patients, high risk in 75%. Anticoagulant prophylaxis with a direct factor Xa inhibitor rivaroxaban or low-molecular weight heparin enoxaparine sodium was performed in 80% of patients.

Conclusion. The study demonstrated that 75% of elderly patients with pathology of the musculoskeletal system are at high risk for the development of venous thromboembolic complications. The main risk factors include the type and duration of surgery and comorbidity.

Key words: venous thromboembolic complications, Caprini scale, elderly, comorbidity, anticoagulant therapy.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the Ammosov North-Eastern Federal University (Protocol No. 19 of 12.10.2007).

Received 07.11.2017

Accepted 06.02.2018

Krasnova Natalia M., PhD, Associate Professor, Department of Hospital Therapy, Professional Diseases and Clinical Pharmacology, Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation.

Sychev Dmitry A., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Clinical Pharmacology and Therapy Department, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation.

Aleksandrova Tuiara N., Researcher, Department of Hematology of Republican Hospital N 1, National Centre of Medicine, Yakutsk, Russian Federation.

Vengerovskii Alexander I., DM, Professor, Head of the Pharmacology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Vengerovskii Alexander I.**, e-mail: pharm-sibgmu@rambler.ru.

УДК 616.145.154-005.6-02-007.272-08
DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-94–101

Для цитирования: Крылова А.А., Кривошеина О.И., Уразова О.И. Экспериментальное обоснование эффективности «массажа» ретинальных вен для лечения окклюзии вен сетчатки. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 94–101.

Экспериментальное обоснование эффективности «массажа» ретинальных вен для лечения окклюзии вен сетчатки

Крылова А.А., Кривошеина О.И., Уразова О.И.

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

РЕЗЮМЕ

Цель работы: на экспериментальной модели фотоиндуцированного тромбоза центральной вены сетчатки и ее ветвей оценить эффективность лечения окклюзии вен сетчатки с применением «массажа» ретинальных вен.

Материалы и методы. Исследование проведено на 30 кроликах породы шиншилла (30 глаз) массой 1,5–2,0 кг. На первом этапе эксперимента всем животным моделировали фотоиндуцированный тромбоз при помощи лазерного облучения ретинальных вен в течение 0,3–0,4 с при плотности воздействия 200 Дж/см² и длине волны 662 нм после введения фотодитазина в дозе 2,5 мг/кг массы.

На втором этапе эксперимента животных разделяли на основную группу и группу сравнения в зависимости от метода лечения: 15 животным основной группы выполняли «массаж» пораженной ретинальной вены в виде 5–7 движений силиконовым наконечником скраппера Тапо, 15 животным группы сравнения эпиретинально вводили рекомбинантную проурокиназу в дозе 500 международных единиц (МЕ).

Результаты. Формирование пристеночного тромба при моделировании фотоиндуцированной окклюзии ретинальных вен в эксперименте приводит к замедлению перфузии в пораженном сосуде на $(8,0 \pm 2,5)$ с (по данным флуоресцентной ангиографии), увеличению толщины центральных отделов сетчатки на $(70,2 \pm 9,7)$ мкм (по данным оптической когерентной томографии), появлению извитости и неравномерности просвета вен сетчатки, обширных плазмо- и геморрагий (по данным офтальмоскопии). На модели тромбоза ретинальных вен апробирован новый метод лечения окклюзии вен сетчатки, показавший значительную эффективность. Установлено, что применение «массажа» пораженной ретинальной вены сокращает время венозной перфузии и в 1,45 раза ускоряет резорбцию отека центральных отделов сетчатки по сравнению с ферментным тромболизисом.

Выводы. «Массаж» ретинальных вен является эффективным методом лечения окклюзии вен сетчатки и не сопровождается повреждением хориоретинальных структур во время манипуляции.

Ключевые слова: тромбоз, окклюзия вен сетчатки, «массаж» ретинальных вен.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время распространенность тромбоза центральной вены сетчатки (ЦВС) и ее ветвей составляет 0,8 и 4,42 случая на 1 000 че-

ловек соответственно [1]. Однако, несмотря на низкий уровень заболеваемости, сложно переоценить медико-социальную значимость окклюзии вен сетчатки как патологии, потенциально приводящей к значительному и необратимому снижению зрительных функций [2, 3]. Согласно статистическим данным, при неишемической форме

✉ Крылова Анна Андреевна, e-mail: krilovane@yandex.ru.

обтурации ретинальных вен острота зрения восстанавливается до 0,5 только у половины пациентов, тогда как при ишемическом тромбозе ЦВС и ее ветвей даже на фоне лечения зрительные функции редко достигают 0,1, составляя сотые и тысячные [4–6]. Учитывая, что причины окклюзии ретинальных вен сетчатки носят системный характер [7–13], а данная патология является предиктором более серьезных кардиоваскулярных заболеваний в будущем [14–18], возникает необходимость детального изучения патогенеза тромбоза ЦВС и ее ветвей для разработки новых методов лечения обтурации вен сетчатки.

Цель работы – изучить особенности проявлений экспериментального фотоиндуцированного *in vivo* тромбоза центральной вены сетчатки и ее ветвей и на основе выявленных нарушений оценить эффективность лечения окклюзии вен сетчатки с применением «массажа» ретинальных вен.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 30 кроликах породы шиншилла (30 глаз) массой 1,5–2,0 кг. На первом этапе эксперимента для анализа проявлений окклюзии вен сетчатки всем животным моделировали фотоиндуцированный тромбоз ЦВС и ее ветвей по Д.С. Велибековой [19]. На втором этапе исследования апробировали новый метод хирургического лечения обтурации вен сетчатки, разработанный на основе выявленных закономерностей тромбоза ЦВС и ее ветвей, и проводили оценку его эффективности в сравнении с эпиретинальным введением рекомбинантной проурокиназы в дозе 500 международных единиц (МЕ).

Для воспроизведения фотоиндуцированной модели тромбоза ЦВС и ее ветвей [19] в условиях операционной под общим наркозом всем животным внутривенно вводили фотодитазин в дозе 2,5 мг/кг массы. Через 15 мин после инфузии препарата проводили лазерное облучение ретинальных вен правых глаз кроликов с использованием аппарата «АЛОД-Алком» («Алком-Медика», г. Санкт-Петербург) в течение 0,3–0,4 с при плотности воздействия 200 Дж/см² и длине волны 662 нм [19].

Данная модель тромбоза ретинальных вен сетчатки максимально приближена к реальным условиям возникновения окклюзии ЦВС и ее ветвей [19]. Тромбообразование в ретинальных сосудах инициируется повреждением мембран эндотелиоцитов синглетным кислородом, образующимся при фотохимической реакции во время

лазерного воздействия, а не за счет нарушения целостности всей толщи сосудистой стенки, как при лазеркоагуляционной модели тромбоза ветви [19, 20]. Свободные кислородные радикалы также повреждают мембраны тромбоцитов, повышая их склонность к агрегации, вызывают деструкцию цитолеммы эндотелиоцитов, индуцируют эндотелиальную дисфункцию, запуская процесс фибринообразования по внешнему пути гемостаза, активируют перекисное окисление липидов, что потенцирует повреждение мембраны тромбоцитов и эндотелиоцитов [21, 22]. Аналогичные изменения в организме наблюдаются при гиперкоагуляции вследствие активации свободнорадикального окисления у пациентов, страдающих дислипидемией, атеросклерозом, ишемической болезнью сердца, метаболическим синдромом, злокачественными новообразованиями [23]. Другими преимуществами фотоиндуцированной модели окклюзии вен сетчатки являются дозируемость, малотравматичность, адекватность клинических проявлений и простота проведения манипуляции [19]. Выбор фотодитазина обусловлен высокой фотохимической активностью, достигаемой введением низкой дозы препарата (0,8 мг/кг), высоким квантовым выходом синглетного кислорода – 75%, низкой световой токсичностью и полным отсутствием темновой токсичности, в отличие от ранее применявшихся фотосенсибилизаторов фталоцианинового ряда [24].

На втором этапе эксперимента, через 3 сут после развития окклюзии ретинальных вен, в зависимости от планируемого лечения животные были разделены на две группы: основную и группу сравнения. В условиях операционной кроликам основной группы (15 животных) выполняли «массаж» пораженной ретинальной вены правых глаз в виде 5–7 касательных движений силиконовым наконечником скраппера Тапо вдоль сосудистого ствола от дистального отдела к проксимальному. Животным группы сравнения (15 кроликам) эпиретинально вводили 500 МЕ рекомбинантной проурокиназы.

До лечения, через 1, 7, 14, 21 сут после операции животным обеих групп выполняли офтальмоскопию; до лечения, через 7, 21 сут после вмешательства проводили оптическую когерентную томографию (ОКТ), флуоресцентную ангиографию (ФАГ), а также из эксперимента выводили по пять животных с последующей энуклеацией, фиксацией полученного материала и окраской гематоксилином и эозином для световой микроскопии под 50-, 200- и 400-кратным увеличением. Забой экспериментальных животных на

всех этапах эксперимента осуществляли с соблюдением правил и норм Европейского общества (86/609ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics 20. Нормальность распределения показателей проверялась при помощи кривой Гаусса и критерия Шапиро – Уилка. Анализ переменных, имеющих нормальное распределение, осуществлялся с помощью *t*-критерия Стьюдента, при малой выборке использовался точный критерий Фишера. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – ошибка среднего. Статистически значимыми различия считали при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Офтальмоскопическая картина тромбоза ЦВС и ее ветвей отмечалась у всех животных уже на 3-и сут после моделирования окклюзии ретинальных вен: обнаруживались извитость и неравномерность просвета вен сетчатки, обширные плазмо- и геморрагии, окружавшие отечный диск зрительного нерва (ДЗН).

Данные офтальмоскопии подтверждались результатами ОКТ: у всех животных определялись участки отслойки нейрорепителлия за счет интерстициального отека и геморрагий вблизи ДЗН и увеличение толщины центральных отделов сетчатки до 270 мкм при нормальных показателях интактной сетчатки кроликов до 132 мкм [25].

Гистологические исследования, проведенные на 3-и сут после моделирования тромбоза ЦВС и ее ветвей, позволили верифицировать окклюзию ретинальных вен. В 100% случаев (у 10 животных) при световой микроскопии в просвете венулы обнаруживался смешанный тромб, занимающий, как правило, больше половины просвета сосуда (рис.). Тромбы ретинальных вен состояли из агрегированных эритроцитов, тромбоцитов, волокон свернувшегося фибрина, ближе к периферии обнаруживались глыбки пикнотичных ядер лейкоцитов. Регистрировались выраженный отек центральных отделов сетчатки, диапедез форменных элементов крови в толщу ретинальной ткани.

Данные ФАГ также подтверждали факт тромбообразования в ЦВС и ее ветвях. Исследования, проведенные на 3-и сут после воспроизведения окклюзии ретинальных вен, выявили увеличение времени венозной перфузии, неравномерность контрастирования вен, зернистость кровотока, экстравазаль-

ный выход флуоресцеина. У 70,0% животных (у 21 из 30 кроликов) пораженная вена сетчатки не заполнялась контрастом, отсутствовала перфузия в ретинальных капиллярах на границах ишемических

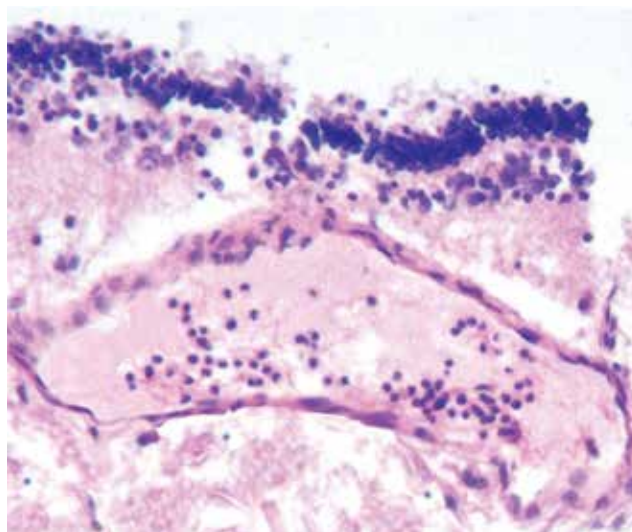


Рисунок. Фотоиндуцированный тромб ретинальной вены, 3-и сут после моделирования заболевания. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$
Figure. Photo-induced thrombus of the retinal vein, 3rd day after modeling the disease. Staining with hematoxylin and eosin, 400x magnification

зон, что свидетельствовало о формировании ишемического тромбоза вен сетчатки.

После инструментального и морфологического подтверждения развития тромбоза ретинальных вен при его моделировании *in vivo* переходили ко второму этапу эксперимента, в ходе которого апробировали новый метод хирургического лечения обтурации вен сетчатки путем «массажа» пораженного сосуда и проводили оценку его эффективности в сравнении с эпиретинальным введением рекомбинантной проурокиназы.

Согласно данным офтальмоскопии, уже на 7-е сут после проведения «массажа» ретинальных вен в основной группе в 86,7% случаев (у 13 из 15 животных) регистрировался лизис геморрагий, тогда как в группе сравнения рассасывание кровоизлияний отмечалось только у 66,7% (у 10 из 15) животных. Кроме того, через 7 сут после вмешательства в основной группе было зафиксировано уменьшение отека центральных отделов сетчатки и ДЗН, в то время как в группе сравнения резорбция отека возникала только через 2 нед после лечения. Полное рассасывание отека ДЗН и нормализация толщины прилежащей сетчатки происходили на 14-е сут в основной группе и на 21-е сут в группе сравнения.

Показатели ОКТ коррелировали с данными офтальмоскопической картины. До лечения у животных обеих групп отмечалось увеличение толщины центральных отделов сетчатки на $(70,2 \pm 9,7)$ мкм. На 7-е сут после операции развивались признаки резорбции отека центральных от-

делов сетчатки, происходившей более быстрыми темпами в основной группе (табл. 1). На 21-е сут после вмешательства у 80,0% животных основной группы и лишь у 60,0% животных группы сравнения толщина сетчатки достигла нормальных значений.

Т а б л и ц а 1

Динамика изменений толщины центральных отделов сетчатки у экспериментальных животных в зависимости от метода лечения, мкм, $M \pm m$			
Группа исследования	До лечения	Сроки после лечения, сут	
		7	21
Основная группа	$210,1 \pm 50,3$	$192,6 \pm 31,4$ $p_1 = 0,044$	$140,2 \pm 15,2$ $p_1 = 0,039$
Группа сравнения	$224,5 \pm 55,1$	$208,9 \pm 38,8$ $p_1 = 0,035$	$189,3 \pm 19,0$ $p_1 = 0,030, p_2 = 0,049$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: уровень статистической значимости различий по сравнению с исходными данными – p_1 , по сравнению с показателями у животных основной группой – p_2 .

При сравнительном анализе показателей ФАГ выявлена значительная эффективность «массажа» ретинальных вен. Уже на 7-е сут после операции у животных основной группы уменьшалась экстравазация флуоресцеина, а также сокращалось время венозной перфузии в 1,4 раза по сравнению с исходными данными (табл. 2). На 21-е сут отмечалось восстановление проходимости тромбированного сосуда с нормализацией показателей ФАГ. В группе сравнения на 7-е сут после вмешательства время венозной перфузии

сокращалось в 1,3 раза по сравнению с данными до лечения, однако контрастирование пораженной вены сетчатки отмечалось только в 73,3% случаев (у 11 животных). Кроме того, к моменту завершения эксперимента у животных группы сравнения время венозной перфузии было больше, чем в основной группе (см. табл. 2). У одного кролика группы сравнения обнаруживалась облитерация тромбированной ретинальной вены, вследствие чего перфузия так и не была восстановлена.

Т а б л и ц а 2

Динамика показателей ФАГ у экспериментальных животных в зависимости от метода лечения, с				
Исследуемая фаза ФАГ	Группа животных	До лечения	Сроки наблюдения, сут	
			7	21
Ранняя ретиновенозная фаза	основная	$20,83 \pm 3,01$	$15,14 \pm 2,47$ $p_1 = 0,042$	$10,21 \pm 0,49$ $p_1 = 0,046$
	сравнения	$21,02 \pm 3,52$	$19,01 \pm 3,52$ $p_1 = 0,039$	$11,54 \pm 0,50$ $p_1 = 0,045, p_2 = 0,037$
Время ретиновенозной перфузии	основная	$13,04 \pm 3,04$	$9,04 \pm 2,02$ $p_1 = 0,030$	$5,03 \pm 0,52$ $p_1 = 0,041$
	сравнения	$13,51 \pm 2,48$	$10,46 \pm 2,51$ $p_1 = 0,041$	$6,01 \pm 0,48$ $p_1 = 0,038, p_2 = 0,047$

Проведенные гистологические исследования также показали эффективность нового метода лечения окклюзии ретинальных вен. До хирургического вмешательства у животных обеих групп обнаруживался тромб, занимающий $1/2-3/4$ просвета сосуда. На 7-е сут после операции у животных основной группы просвет пораженного сосуда был заполнен рыхлыми тромботическими массами, однако ни в одном случае их плотного

прикрепления к стенке сосуда не отмечалось, тогда как в группе сравнения в 26,7% случаев (у четырех кроликов) просвет сосуда был obturated тромбом. На 21-е сут после операции отмечалась полная резорбция пре- и интратретиальных геморрагий, отека сетчатки и ДЗН. В группе сравнения на 21-е сут выявлялись значительное рассасывание плазмо- и геморрагий, уменьшение отека сетчатки и ДЗН, однако у одного кролика

регистрировалась облитерация ретинальной вены. Необходимо отметить, что ни в одном случае не найдено слущенных эндотелиоцитов в просвете сосуда или нарушения гистоархитектоники ткани сетчатки, которые являются признаком ятрогенного повреждения сосудов сетчатки или следствием биологической реакции ткани в ответ на их повреждение.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные гистологические исследования позволили выявить, что клеточный состав тромба, образующегося при моделировании окклюзии ретинальных вен, был смешанным – помимо эритроцитов и тромбоцитов, обнаруживалось большое количество лейкоцитов. Согласно данным литературы [22], арахидоновая кислота, образующаяся при гидролизе мембранных фосфолипидов фосфолипазой A2, метаболизируется с образованием 12-гидроперокси- и гидроксипропановых жирных кислот HPETE и 12-HEETE, усиливающих активацию и агрегацию тромбоцитов, а также улучшающих взаимодействие тромбоцитов и лейкоцитов.

При физиологическом тромбообразовании данный механизм, с одной стороны, позволяет остановить кровотечение в более короткие сроки, однако при патологии выделяемые активированными лейкоцитами цитокины опосредуют увеличение размеров тромба и усиливают его адгезию к стенке сосуда [22]. С другой стороны, лейкоциты клеточной агрегации тромба при взаимодействии «тромбоцит – лейкоцит» выделяют медиаторы воспаления (простагландины E2 и I_b2, IL-1, IL-6, VEGF и др.), которые, помимо индукции воспалительной реакции с развитием классических местных проявлений (*rubor, tumor, color, dolor, functio laesa*), стимулируют продукцию прокоагулянтов. Так, например, IL-6 увеличивает концентрацию фибриногена в плазме и усиливает продукцию ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) [22]. Таким образом, тромбообразование характеризуется не только присущими данному процессу биохимическими и морфологическими реакциями, но и дополняется эффектами медиаторов воспаления с развитием отека центральных отделов сетчатки при окклюзии ЦВС и ее ветвей, что подтверждается при экспериментальном моделировании фотоиндуцированного тромбоза ретинальных вен. Следовательно, эвакуация тромба в ранние сроки заболевания при проведении «массажа» ретинальных вен, помимо очевидного эффекта – восстановления гемодинамики пора-

женного сосуда, может предупреждать либо значительно уменьшать проявления отека сетчатки в центральных отделах глазного дна, встречающегося в 60–100% случаев тромбоза ЦВС и ее ветвей в клинической практике [4].

Результаты исследований, полученных на втором этапе эксперимента, показали эффективность предложенного метода лечения окклюзии ретинальных вен. Проведение «массажа» пораженной вены сетчатки позволяет достичь более быстрого восстановления гемодинамики в тромбированном сосуда, что подтверждается данными ФАГ и ОКТ (см. табл. 1, 2). Согласно полученным данным, применение нового метода хирургического лечения обтурации ретинальных вен сокращает время венозной перфузии (по сравнению с ферментным тромболизом) и способствует более быстрой (в 1,45 раза) резорбции отека центральных отделов сетчатки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воспроизведение фотоиндуцированного тромбоза ЦВС и ее ветвей в эксперименте *in vivo* сопровождается развитием характерных для данного патологического процесса нарушений кровотока в венозном отделе микроциркуляторного русла сетчатки и изменений в заднем полюсе глазного яблока. Применение «массажа» ретинальной вены способствует восстановлению гемодинамики в пораженном сосуда, нормализации времени ретиновенозной перфузии по данным ФАГ, ускорению резорбции отека и кровоизлияний сетчатки по данным ОКТ и офтальмоскопии. Результаты морфологического и инструментального методов исследования подтверждают эффективность и безопасность применения нового метода хирургического лечения окклюзии ретинальных вен.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ для молодых ученых № МК-2650.2012.7 за 2012–2013 гг. и № МД-6207.2016.7 за 2016–2017 гг.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом при СибГМУ (регистрационный № 3506 от 11.11.2013 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rogers S., McIntosh R.L., Cheung N., Lim L., Wang J.J., Mitchell P., Kowalski J.W., Nguyen H., Wong T.Y. The prevalence of retinal vein occlusion: pooled data from population studies from the United States, Europe, Asia, and Australia. *Ophthalmology*. 2010 Feb.; 117 (2): 313–319.e1. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.07.017.
2. Либман Е.С., Калеева Э.В. Комплексная характеристика инвалидности вследствие офтальмологии в Российской Федерации. *Российская офтальмология*. 2012; 5: 24–26. [Liebman E.S., Kaleeva E.V., Ryazanov D.P. Complex characterization of disability due to ophthalmology in the Russian Federation. *Rossiyskaya oftalmologiya – Russian ophthalmology*. 2012; 5: 24–26 (in Russ.)].
3. Либман Е.С., Шахова Е.В. Состояние и динамика слепоты и инвалидности вследствие патологии органа зрения в России. *Актуальные вопросы офтальмологии*. 2007; 2: 12–19. [Libman Ye.S., Shakhova Ye.V. The state and dynamics of blindness and disability due to pathology of the organ of vision in Russia. *Aktualnyye voprosy oftalmologii – Actual Questions of Ophthalmology*. 2007; 2: 12–19 (in Russ.)].
4. Тульцева С.Н., Астахов Ю.С. Окклюзии вен сетчатки (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение). СПб.: Изд-во Н-Л, 2010: 112. [Tultseva S.N., Astakhov Yu.S. Retinal veins occlusion (etiology, pathogenesis, clinic, diagnosis, treatment). Spb.: N-L Publ., 2010: 112 (in Russ.)].
5. Natural history and clinical management of central retinal vein occlusion. The Central Vein Occlusion Study Group. *Arch. Ophthalmol.* 1997; Apr. 115(4): 486–491.
6. Rogers S.L., McIntosh R.L., Lim L., Mitchell P., Cheung N., Kowalski J.W., Nguyen H.P., Wang J.J., Wong T.Y. Natural history of branch retinal vein occlusion: an evidence-based systematic review. *Ophthalmology*. 2010; Jun. 117 (6): 1094–1101. e5. DOI: 10.1016/j.ophtha.2010.01.058.
7. Hayreh S.S. Ocular vascular occlusive disorders: natural history of visual outcome. *Prog Retin Eye Res*. 2014; Jul. 41: 1–25. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.04.001.
8. Glueck C.J., Hutchins R.K., Jurantee J., Khan Z., Wang P. Associations of thrombophilia, hypofibrinolysis, and retinal vein occlusion. *Clin. Ophthalmol.* 2012; 6: 1377–1384. DOI: 10.2147/OPTH.S34627.
9. Тульцева С.Н. Гипергомоцистеинемия – основной фактор риска развития ишемического тромбоза вен сетчатки. *Медицинские науки*. 2008; 6: 8–16. [Tultseva S.N. Hyperhomocysteinemia is the main risk factor for the development of ischemic thrombosis of retinal veins. *Meditsinskiye Nauki – Medical Sciences*. 2008; 6: 8–16 (in Russ.)].
10. Glueck C.J., Bell H., Vadlamani L., Gupta A., Fontaine R.N., Wang P., Stroop D., Gruppo R. Heritable thrombophilia and hypofibrinolysis. Possible causes of retinal vein occlusion. *Arch. Ophthalmol.* 1999; Jan. 117 (1): 43–49. DOI:10.1001/archophth.117.1.43.
11. Recommendations from the EGAPP Working Group: Routine testing for Factor V Leiden (R506Q) and prothrombin (20210G>A) mutations in adults with a history of idiopathic venous thromboembolism and their adult family members. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. *Genet. Med.* 2011; Jan. 13 (1): 67–76. DOI:10.1097/GIM.0b013e3181fbc46f.
12. Schockman S., Glueck C.J., Hutchins R.K., Patel J., Shah P., Wang P. Diagnostic ramifications of ocular vascular occlusion as a first thrombotic event associated with factor V Leiden and prothrombin gene heterozygosity. *Clin Ophthalmol.* 2015; 9: 591–600. DOI: 10.2147/OPTH.S80714.
13. Risse F., Frank R.D., Weinberger A.W. Thrombophilia in patients with retinal vein occlusion: a retrospective analysis. *Ophthalmologica*. 2014; 232 (1): 46–52. DOI: 10.1159/000360013.
14. Khan Z., Almeida D.R., Rahim K., Belliveau M.J., Bona M., Gale J. 10-Year Framingham risk in patients with retinal vein occlusion: a systematic review and meta-analysis. *Can. J. Ophthalmol.* 2013; Feb. 48 (1): 40–45. e1. DOI: 10.1016/j.jcjo.2012.08.017.
15. Martin S.C., Butcher A., Martin N., Farmer J., Dobson P.M., Bartlett W.A., Jones A.F. Cardiovascular risk assessment in patients with retinal vein occlusion. *Br. J. Ophthalmol.* 2002; Jul. 86 (7): 774–776. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.86.7.774>.
16. Capua M.D., Minno M.N., Guida A., Loffredo M., Cucaro C., Coppola A., Izzo R., Palmieri N.M., Crispo A., Cerbone A.M., Minno G.D. Coronary artery disease, cerebral non-fatal ischemic stroke in retinal vein occlusion: an 8-yr follow-up. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2012; Jan. 22 (1): 23–27. DOI: 10.1016/j.numecd.2010.03.008.
17. Cugati S., Wang J.J., Knudtson M.D., Rochtchina E., Klein R., Klein B.E., Wong T.Y., Mitchell P. Retinal vein occlusion and vascular mortality: pooled data analysis of 2 population-based cohorts. *Ophthalmology*. 2007; Mar. 114 (3): 520–524. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.06.061>.
18. Lee J., Kim S.W., Lee S.C., Kwon O.W., Kim Y.D., Byeon S.H. Co-occurrence of acute retinal artery occlusion and acute ischemic stroke: diffusion-weighted magnetic resonance imaging study. *Am. J. Ophthalmol.* 2014; Jun. 157 (6): 1231–1238. DOI: 10.1016/j.ajo.2014.01.033.
19. Велибекова Д.С. Экспериментальная модель фотоиндуцированного тромбоза ветви центральной вены сетчатки : автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2012: 22. [Velibekova D.S. Experimental model of photoinduced thrombosis of the branch of the central vein of the retina: avtoref. dis. ... kand. med. nauk. M., 2012: 22 (in Russ.)].
20. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Володин П.А., Каплан М.А., Пономарев Г.В. Сравнительное изучение фотодинамических эффектов фотосенсибилизаторов хлоринового ряда на интактной сетчатке экспериментальных животных. *Рефракционная хирургия и офтальмология*. 2006; 6 (2): 55–59. [Bely Yu.A., Te-

- reshchenko A.V., Volodin P.L., Kaplan M.A., Ponomarev G.V. A comparative study of the photodynamic effects of chlorine-type photosensitizers on the intact retina of experimental animals. *Refraktsionnaya khirurgiya i oftalmologiya – Refractive Surgery and Ophthalmology*. 2006; 6 (2): 55–59 (in Russ.).
21. Сушкевич Н.Г. Патологические системы гемостаза при тромбофилиях. Патогенез. 2008; 6 (4): 4–23. [Sushkevich N.G. Pathological systems of hemostasis in thrombophilia. *Patogenez – Pathogenesis*. 2008; 6 (4): 4–23 (in Russ.).]
22. Muller G., Goettsch C., Morawietz H. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Haemostaseologie*. 2007; 27 (1): 5–12.
23. Podrez E.A., Byzova T.V., Febbraio M., Salomon R.G., Ma Y., Valiyaveetil M., Poliakov E., Sun M., Paula J., Finton P.J., Curtis B.R., Chen J., Zhang R., Silverstein R.L., Hazen S.L. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat. Med.* 2007; Sep. 13 (9): 1086–1095. DOI: 10.1038/nm1626.
24. Wilson C.A., Hatchell D.L. Photodynamic retinal vascular thrombosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1991; 32: 2357–2365.
26. Alkin Z., Kashani A.H., Lypez-Jaime G.R., Ruiz Garcina H., Humayun M.S., Sadda S.R. Quantitative analysis of retinal structures using spectral domain optical coherence tomography in normal rabbits. *Curr. Eye Res.* 2013; Feb. 38 (2): 299–304. DOI: 10.3109/02713683.2012.757625.

Поступила в редакцию 01.11.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Крылова Анна Андреевна, очный аспирант, кафедра офтальмологии, СибГМУ, г. Томск.
 Кривошеина Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой офтальмологии, СибГМУ, г. Томск.
 Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Крылова Анна Андреевна, e-mail: krilovane@yandex.ru.

УДК 616.145.154-005.6-02-007.272-08

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-94-101

For citation: Krylova A.A., Krivosheina O.I., Urazova O.I. Experimental substantiation of the effectiveness of the “massage” retinal veins for treatment of retinal vein occlusion. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 94–101.

Experimental substantiation of the effectiveness of the “massage” retinal veins for treatment of retinal vein occlusion

Krylova A.A., Krivosheina O.I., Urazova O.I.

Siberian State Medical University (SSMU)
 2, Moskow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Objective: evaluate the effectiveness of treatment of retinal vein occlusion with the use of “massage” of retinal veins on the experimental model of photoinduced retinal venous occlusive disease.

Materials and methods. Studies were carried out on 30 rabbits of the Chinchilla breed (30 eyes) weighing 1.5–2.0 kg. In the first stage of the experiment, for all animals the photoinduced thrombosis were modeled by laser irradiation of its retinal veins for 0.3–0.4 seconds at a density of 200 J/cm² and a wavelength of 662 nm after the administration of “Photoditazine” at a dose of 2.5 mg/kg weight.

In the second stage of the experiment, the animals were divided into the main group and the comparison group, depending on the method of treatment: 15 animals of the main group with “massage” of the retinal vein in the form of 5–7 movements with a silicone tip of the scanner Tano, 15 animals of the comparison group with epiretinal administration of recombinant prourokinase in a dose 500 international units (IU).

Results. The formation of a parietal thrombus in the simulation of photoinduced the central retinal vein occlusion in the experiment leads to a slowing of perfusion in the affected vessel by (8.0 ± 2.5) s (according

to fluorescence angiography), an increase in the thickness of the central parts of the retina by (70.2 ± 9.7) μm (according to optical coherence tomography), to the appearance of crimp and uneven lumen of the retina veins, extensive plasma and hemorrhages (according to the data of ophthalmoscopy). On the model of retinal veins thrombosis, a new method of treating retinal vein occlusion was tested, which showed significant efficacy. It has been established that the use of “massage” of the affected retinal vein reduces the time of venous perfusion by 1.3 times and 1.45 times accelerates the resorption of the edema of the central parts of the retina compared to enzymatic thrombolysis.

Conclusions. “Massage” of the retinal veins is an effective method of treating retinal vein occlusion and is not accompanied by damage to chorioretinal structures during manipulation.

Key words: thrombosis, retinal vein occlusion, “massage” of retinal veins.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The work was supported by grants of the President of the Russian Federation for young scientists No. MK-

2650.2012.7 for 2012–2013. and No. МД-6207.2016.7 for 2016–2017.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the SSMU (Protocol No. 3506 of 11.11.2013).

Received 01.11.2017

Accepted 06.02.2018

Krylova Anna A., Postgraduate Student, Ophthalmology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Krivosheina Olga I., DM, Professor, Head of the Ophthalmology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Urazova Olga I., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Pathophysiology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Krylova Anna A., e-mail: krilovane@yandex.ru.

УДК 577.112.3:547.388.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-102–111

Для цитирования: Ларькина М.С., Семенов А.С., Зельчан Р.В., Подрезова Е.В., Брагина О.Д., Юсубов М.С., Скуридин В.С., Чернов В.И., Белоусов М.В., Тимофеев М.С. Способ получения и изучение биологических свойств меченной йодом-123 производной аминоглюкозы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 102–111.

Способ получения и изучение биологических свойств меченной йодом-123 производной аминоглюкозы

Ларькина М.С.¹, Семенов А.С.², Зельчан Р.В.^{2,3}, Подрезова Е.В.², Брагина О.Д.^{2,3}, Юсубов М.С.^{1,2}, Скуридин В.С.², Чернов В.И.^{2,3}, Белоусов М.В.¹, Тимофеев М.С.⁴

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

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

³ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

⁴ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФирМ) им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

РЕЗЮМЕ

В настоящее время являются актуальными поиск и синтез производных глюкозы для ядерной медицины. В последние годы D-глюкозамин является перспективным аналогом глюкозы, модифицированные йодпроизводные которого, возможно, могут быть применены в радионуклидной диагностики, и радиойодтерапии ревматоидного артрита в качестве радиофармацевтического препарата (РФП).

Цель исследования. Синтез нового йодсодержащего производного D-глюкозамина, разработка методики его мечения йодом-123 и биологическое изучение свойств полученного препарата.

Материалы и методы. Синтез 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина проводили с использованием общепринятых приемов в органической химии. Для установления структуры исследуемого соединения использовали инфракрасную спектроскопию и спектроскопию ядерно-магнитного резонанса. Изотопный обмен стабильного йода-127, присутствующего в алифатической цепи, на его радиоактивный аналог – йод-123 проводили при нагревании смеси полученного производного D-глюкозамина с натрий йодидом Na¹²³I в ацетоне с последующим синтезом в твердой фазе.

Для оценки радиохимической чистоты 2-N-(6-йод¹²³гексаноил)-D-глюкозамина использовали метод хроматографии в тонком слое сорбента. Изучение безопасности применения и фармакокинетических параметров исследуемого препарата производилось на интактных самцах крыс линии Вистар.

Результаты. Была предложена оригинальная методика синтеза 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина, по которой промежуточный продукт синтеза сукцимид-1-ил 6-йодгексаноат был получен по реакции окислительного расщепления циклогексанола, являющейся экологически безопасной. Радиохимическая чистота 2-N-(6-йод¹²³гексаноил)-D-глюкозамина составила более 97%.

✉ Ларькина Мария Сергеевна, e-mail: marialarkina@mail.ru.

Заключение. Синтезирован 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамин и проведено его мечение йодом-123. При исследовании безопасности применения и изучении фармакокинетики предлагаемого РФП было показано, что препарат не обладает острой токсичностью при внутривенном введении и выводится почками путем клубочковой фильтрации.

Ключевые слова: D-глюкозамин, 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина, циклогексанон, йод-123, РФП.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что раковые клетки при росте усиленно поглощают углеводы, в частности глюкозу [1]. С учетом такого метаболизма помеченный радионуклидом фтором-18 (2-[¹⁸F]) аналог глюкозы – фтордезоксиглюкоза ([¹⁸F]-FDG) – широко применяется в позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). В 2001 г. фтордезоксиглюкоза была признана «молекулой тысячелетия», или «рабочей лошадкой». Тем не менее такие факторы, как очень короткий период полураспада фтора-18 (около 110 мин), сложный многоступенчатый синтез, ограниченная доступность и очень высокая стоимость позитронно-эмиссионных томографов резко ограничивают диагностику с использованием этого препарата в нашей стране [2–6].

По сравнению с фтором-18 йод-123 и технеций-99м (^{99m}Tc) имеют оптимальные физические и химические характеристики, недорогую стоимость и доступность в России.

В последние годы были синтезированы несколько аналогов глюкозы, помеченные технецием-99м [7–13]. Однако эти аналоги глюкозы с точки зрения их использования для визуализации и диагностики имеют общие недостатки – относительно низкое поглощение опухолевыми клетками и медленное выведение из крови.

Среди них ^{99m}Tc-этиленцистеин-дезоксиглюкоза (^{99m}Tc-ECDG) является наиболее перспективным кандидатом в качестве визуализации опухоли. Фаза II клинических исследований ^{99m}Tc-ECDG была проведена зарубежными исследователями. Тем не менее отношение опухоли к фону для ^{99m}Tc-ECDG гораздо ниже, чем для [¹⁸F]-FDG [14, 15].

Как уже было отмечено ранее авторами данной статьи [16], в настоящее время в научных публикациях не отражены успешные результаты по разработке устойчивых йодированных производных глюкозы, являющихся подходящими метаболическими маркерами для проведения диагностических исследований в организме.

С этой точки зрения представляет интерес производное глюкозы D-глюкозамин – вещество,

вырабатываемое хрящевой тканью суставов, которое является необходимым строительным компонентом хондроитина и входит в состав других важных для сустава веществ. По своей структуре оно является аминомоносахаридом, служит в качестве важного прекурсора в биохимическом синтезе гликозилированных белков и липидов. Известно использование D-глюкозамина для терапии остеоартроза [17], поэтому модифицированные производные D-глюкозамина могут быть перспективны в радионуклидной диагностике и радиойодтерапии ревматоидного артрита (радиосиноэктомия) в качестве радиофармацевтического препарата (РФП). Интерес к D-глюкозамину как перспективному аналогу глюкозы отражается и в зарубежных научных публикациях в высокорейтинговых журналах [18–22].

Таким образом, разработка меченных йодом-123 производных глюкозы и, в частности на основе D-глюкозамина, для получения РФП представляет значительный научный и практический интерес. Цель данной работы – синтез нового йодсодержащего производного D-глюкозамина, разработка методики его мечения йодом-123 с последующим изучением безопасности применения и фармакокинетики полученного РФП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований были использованы субстраты, реагенты и органические растворители, являющиеся товарными продуктами фирм Aldrich (США), Fluka и др., соответствующей чистоты, которые использовались без предварительной очистки.

Изучение свойств полученных соединений проводили методом хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) на пластинках «Сорбфил-ПТСХ П-В-УФ» в системах растворителей: гексан – этилацетат (1 : 1; 5 : 1), раствор гидроксида аммония (2 моль/л) – раствор аммония нитрата (2 моль/л) – метанол (4 : 2 : 27). Для отбора аликвот использовали механические дозаторы Thermo Scientific («Ленпипет», г. Санкт-Петербург). В качестве детекторов использовали фильтрованный ультрафиолетовый свет, ванилин-серный реактив.

Для оценки радиохимической чистоты продуктов синтеза использовали метод восходящей ТСХ с последующим детектированием радиохроматограмм на гамма-сканере с применением полупроводникового детектора на основе высокочастотного Ge (Canberra Industries Inc., США), имеющего разрешение 2 кэВ.

Для установления структуры исследуемого соединения использовали инфракрасную спектроскопию (ИК) и спектроскопию ядерно-магнитного резонанса (ЯМР). ИК-спектры регистрировали с помощью ИК-Фурье-спектрометра СИМЕКС ФТ-801 в области 400–4 000 см^{-1} . Спектры ПМР записывали на спектрометре Фурье AVANCE AV 300 (Bruker, Германия), рабочая частота – 300 МГц, растворители – дейтерированная вода, ацетон, ДМСО, хлороформ. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан (ТМС). Все значения химических сдвигов выражены в м.д. (δ – шкала) по отношению к ТМС.

Отгонку растворителей осуществляли на ротационном испарителе BUCHI Rotavapor R-3 с использованием в качестве вакуумного насоса Vacuubrand CVC 3000. Температуру плавления определяли на приборе STUART SMP 30.

Методика синтеза 6-йодгексановой кислоты. К раствору циклогексанона (3 ммоль, 0,294 г, $\rho = 0,946 \text{ г/см}^3$) в 10 мл этанола добавляют йод (1,5 ммоль, 0,381 г), катализатор меди (I) хлорида (0,3 ммоль, 0,03 г). Затем при перемешивании при комнатной температуре по каплям вносят раствор пергидроля (6 ммоль, 0,638 г, 567 мкл пергидроля 32%-го H_2O_2 , $\rho = 1,125 \text{ г/см}^3$) в 4 мл этанола в течение 2 ч. Далее добавляют еще пергидроля (6 ммоль, 0,638 г, 567 мкл) и меди (I) хлорида (0,15 ммоль, 0,015 г), перемешивают при комнатной температуре 4 ч и после этого добавляют последнюю порцию пергидроля (3 ммоль, 0,319 г, 284 мкл) и перемешивают еще 6 ч в тех же условиях. К реакционной смеси добавляют натрия сульфит для удаления остатка йода. Затем проводят экстракцию фильтрата метилхлоридом (3 x 5 мл). К полученному извлечению (15 мл) добавляют 5 мл воды и 1 мл трифторуксусной кислоты, перемешивают при комнатной температуре в течение 5 ч и отгоняют растворители. Полученные белые кристаллы, плавящиеся при комнатной температуре и желтеющие на свету, досушивают под вакуумом. Выход 6-йодгексановой кислоты 95% с температурой плавления 26–28 °С.

6-йодгексановая кислота. R_f 0,12 (этилацетат – гексан (1 : 1)). Спектры ЯМР ^1H (300 МГц, CDCl_3), δ , м.д.: 3,19 (т, 2H, CH_2I), 2,38 (т, 2H, CH_2CO), 1,86 (м, 2H, CH_2), 1,63 (м, 2H, CH_2), 1,47 (м, 2H,

CH_2). ИК-спектр 3 300–2 500 см^{-1} $\nu(\text{O-H}$ и $\text{C-H})$, 1 313 – 1 117 см^{-1} и 1 450 – 1 350 см^{-1} $\nu(\text{C-O})$, $\delta(\text{O-H})$; 1 260 см^{-1} $\nu(\text{C-O})$, 1 408 см^{-1} $\delta(\text{C-O-H})$, 1 300 – 1 150 см^{-1} $\delta(\text{CH}_2)$, 594 см^{-1} $\nu(\text{C-I})$.

Методика синтеза сукцимид-1-ил 6-йодгексаноата. 6-йодгексановую кислоту (0,918 г, 3,8 ммоль) растворяют в 8 мл метилхлорида, добавляют N-гидроксисукцинимид (0,438 г, 3,8 ммоль) и N,N-дициклогексилкарбодиимид (0,873 г, 4,23 ммоль). Перемешивают 24 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок N,N-дициклогексилмочевины отфильтровывают, промывают метилхлоридом и фильтраты объединяют. Объединенный фильтрат последовательно промывают водой, насыщенными растворами натрия гидрокарбоната и натрия хлорида. Растворитель отгоняют и осадок досушивают под вакуумом. Выход 92%.

Сукцимид-1-ил 6-йодгексаноат. R_f 0,43 (этилацетат – гексан (1 : 1)). Спектры ЯМР ^1H (300 МГц, CDCl_3), δ , м.д.: 3,19 (т, 2H, 6-H), 2,82 (т, 4H, HO-Su), 2,38 (т, 2H, 2-H), 1,85 (м, 2H, 5-H), 1,63 (м, 2H, 3-H), 1,47 (м, 2H, 4-H).

Методика синтеза 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина. D-глюкозамина гидрохлорид (0,102 г, 0,43 ммоль) растворяют в 1,15 мл метанола, в котором было предварительно растворено натрия металлического (0,0115 г, 0,5 ммоль). Затем добавляют сукцимид-1-ил 6-йодгексаноата (0,146 г, 0,43 ммоль) и 1 мл дихлорметана. После перемешивания при комнатной температуре в течение 24 ч осадок, содержащий 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина, отфильтровывают, промывают на фильтре дихлорметаном и сушат под вакуумом при комнатной температуре. 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина очищают перекристаллизацией из воды при 100 °С и получают белые кристаллы 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина: 0,147 г (85%) с температурой плавления 189–190 °С. Спектры ЯМР ^1H (300 МГц, D_2O), δ , м.д.: 1,3–1,8 (м, 6H, 3-H, 4-H, 5-H), 2,25 (м, 2H, 2-H), 3,19 (т, 2H, 6-H), 3,3–3,9 (м, 6H, D-глюкозамин), 5,16 (с, 1H, D-глюкозамин). ИК-спектр: 2 930 см^{-1} $\nu(\text{C-H})$, 3 291 см^{-1} $\nu(\text{O-H, N-H})$, 1 020 см^{-1} $\nu(\text{C-O})$, 1 423–1 300 см^{-1} $\delta(\text{O-H})$, 1 640 см^{-1} $\nu(\text{C=O})$, 1 551 см^{-1} $\delta(\text{N-H})$, 1 273 см^{-1} $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{N-H})$, 589 см^{-1} $\nu(\text{C-I})$.

Радиохимический синтез. 5 мг субстанции 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина растворяют в 1 мл ацетона при нагревании в реакционном сосуде (рис. 1). Затем добавляют 0,5 мл раствора Na^{123}I . Далее реакционный сосуд закрывают пробкой с вмонтированной в нее трубкой для отвода паров в поглотитель и полученную смесь упаривают досуха при температуре 100 °С.

После охлаждения сухой остаток растворяют в 1 мл физиологического раствора и фильтруют через фильтр Minisart с размером пор 0,20 мкм в стерильный флакон и укупоривают пробкой с алюминиевым колпачком.

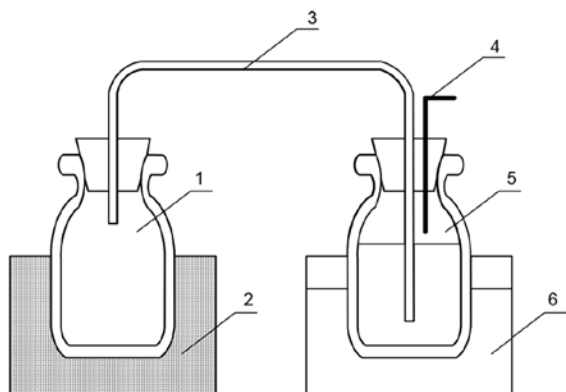


Рис. 1. Схема установки для радиосинтеза: 1 – реакционный сосуд; 2 – нагревательный элемент; 3 – отводящая трубка; 4 – игла; 5 – поглотитель йода-123; 6 – охлаждающая емкость

Fig. 1. Installation diagram for radio-synthesis: 1 – reaction vessel; 2 – heating element; 3 – outlet tube; 4 – the needle; 5 – iodine-123 absorber; 6 – cooling capacity

Изучение безопасности применения и фармакокинетики препарата осуществлялось на интактных самцах крыс линии вистар. В исследование были включены 20 половозрелых особей, возраст 12 нед. Средняя масса животных на момент проведения исследования составила (250 ± 30) г.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета программ Statistica for Windows. Для оценки отличий количественных признаков между группами применялся непараметрический тест Манна – Уитни. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости p принимали равным 0,05. Содержание животных осуществлялось в

соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986).

С целью изучения безопасности применения исследуемый препарат вводили 10 животным внутривенно в терапевтической дозе 20 МБк, после этого все животные были оставлены под динамическое наблюдение в течение 7 сут. В ходе наблюдения за животными ежедневно оценивались общее состояние каждой особи, изменение поведенческих реакций и основных физиологических функций.

Для определения фармакокинетических параметров изучаемого радиофармпрепарата исследуемый образец вводили внутривенно 10 экспериментальным животным после предварительной наркотизации в дозе 20 МБк. Непосредственно после внутривенного введения исследуемого образца выполняли динамическое сцинтиграфическое исследование на двухдетекторной гамма-камере Есам (Siemens, Германия). При этом производили запись 80 кадров по 15 с на кадр в течение 20 мин в матрицу 64 x 64 пикселя без аппаратного увеличения. Во время исследования крысы располагались таким образом, что в поле зрения детектора гамма-камеры оказывалось все тело животного. При исследовании использовались низкоэнергетические коллиматоры для энергии 140 кэВ. Полученные сцинтиграммы подвергались постпроцессинговой обработке с использованием фирменного пакета программ E.Soft (Siemens, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для синтеза 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина были использованы D-глюкозамина гидрохлорид и сукцимид-1-ил 6-йодгексаноат, синтез которого осуществляли из циклогексанона (рис. 2). Ранее нами для получения 6-йодгексановой кислоты и ее этилового эфира был предложен способ, который был защищен патентом РФ [23].

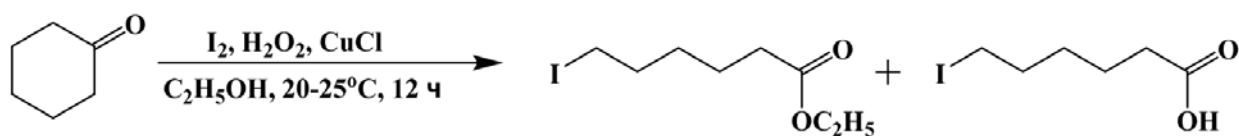


Рис. 2. Окислительное расщепление циклогексанона

Fig. 2. Oxidative cleavage of cyclohexanone

Данный способ отличается простотой выполнения, что создает перспективы для его использования в промышленных масштабах, суммарный выход продуктов достигает 95–98%.

Окислительное расщепление циклогексанона проводили по описанной методике [23]. Способ

получения 6-йодгексановой кислоты заключается в расщеплении циклогексанона под действием перекиси водорода в присутствии катализатора меди (I) хлорида и йода при комнатной температуре. Процесс проводят при перемешивании в течение 10–12 ч. Для выделения 6-йодгексановой

кислоты реакционную массу, содержащую смесь кислоты и ее этилового эфира, экстрагировали метиленхлоридом, добавляли воду и трифторуксусную кислоту, перемешивали при комнатной температуре в течение 10 ч. Затем растворитель отгоняли и получали 6-йодгексановую кислоту, не требующую дополнительной очистки.

Учитывая низкую ацилирующую способность карбоксильной группы, важным этапом в синтезе конечного продукта явилась активация карбоксильной группы посредством получения ее эфира с N-гидроксисукцинимидом (NHS) под действием

N,N-дициклогексилкарбодиимида (DCC) (рис. 3). Данный способ отличается простотой, доступностью реактивов, не требует в данном случае нагревания, имеет высокий выход активированной кислоты. Экспериментальным путем был подобран оптимальный растворитель метиленхлорид. Для процесса активации принципиальными оказались температурный режим и время проведения реакции. Оптимальным является проведение активации при комнатной температуре в течение 24 ч, при этом выход активированной карбоновой кислоты составляет свыше 92%.

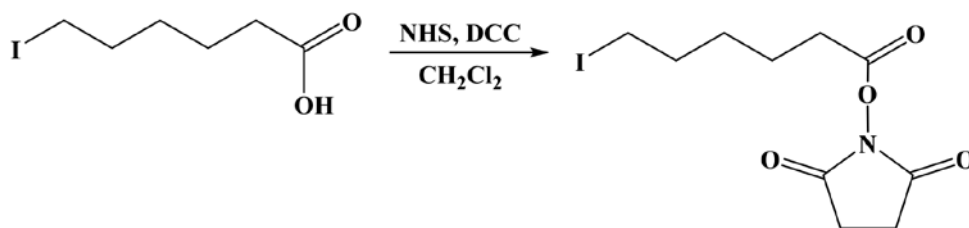


Рис. 3. Активация 6-йодгексановой кислоты

Fig. 3. Activation of 6-iodohexanoic acid

В синтезе 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина основная сложность состояла в том, что глюкозамин коммерчески доступен только в виде соли гидрохлорида, что не позволяет проводить ацилирование напрямую, поэтому важным в синтезе был подбор метода депротонизации аминогруппы

(рис. 4). Депротонизацию глюкозамина гидрохлорида проводили с применением натрия метилата или триэтиламина. Для очистки целевого продукта от побочных продуктов и исходных веществ была предложена перекристаллизация 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина из горячей воды.

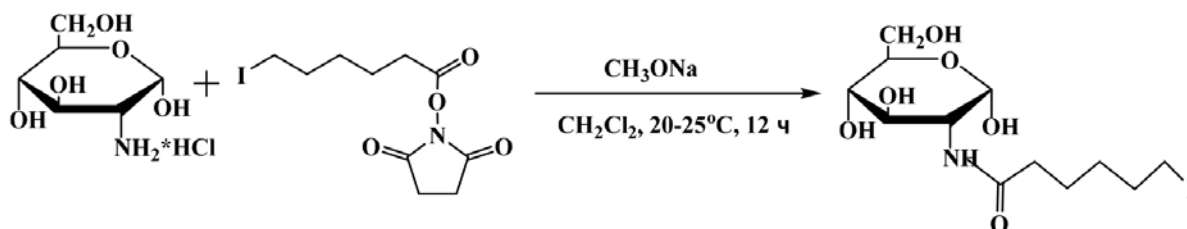


Рис. 4. Схема синтеза 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина

Fig. 4. Diagram for the synthesis of 2-N-(6-iodohexanoyl)-D-glucosamine

Таким образом, нами предлагается трехстадийный синтез 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина. На первом и втором этапах осуществляется синтез промежуточных продуктов 6-йодгексановой кислоты и сукцимид-1-ил 6-йодгексаноата соответственно, на третьем этапе – синтез конечного продукта 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина.

Для введения метки радиоактивного йода в молекулу 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина использовали метод изотопного (нуклеофильного) замещения [24, 25]. Общее время получения образца по данной методике составляет около 30 мин. Вследствие небольшой прочности связи «углерод – йод» реакция изотопного обмена

проходит достаточно легко, за короткое время и не требует присутствия катализирующих добавок. Для оценки радиохимической чистоты полученного образца и содержания в нем примеси непрореагировавшего йода-123 использовали метод радио-ТСХ в системе: раствор гидроксида аммония (2 моль/л) – раствор аммония нитрата (2 моль/л) – метанол (2 : 1 : 27). Результаты измерений представлены в табл. 1, 2. Радиохимическая чистота полученного продукта составила более 97%. Изучение ПМР-спектра исследуемой субстанции, снятого после мечения, показало, что условия радиохимического синтеза не привели к изменению в структуре исследуемого образца.

Т а б л и ц а 1

Результаты определения радиохимической чистоты раствора натрия йодида-123				
Показатель	R_f	Максимальное количество импульсов	Интегральное количество импульсов	Относительная активность, %
Примесь 1	0,55	21,9	249,0	1,6
Na ¹²³ I	0,86	2 761,9	14 962,3	98,4

Т а б л и ц а 2

Результаты определения радиохимической чистоты 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина, меченного йодом-123				
Показатель	R_f	Максимальное количество импульсов	Интегральное количество импульсов	Относительная активность, %
Примесь 1	0,44	25,9	280,1	2,3
2-N-(6-йод ¹²³ гексаноил)-D-глюкозамина	0,79	2418,9	12126,0	97,5
Примесь 2	1,00	29,9	29,9	0,2

При исследовании безопасности применения 2-N-(6-йод¹²³гексаноил)-D-глюкозамина на интактных самцах крыс линии Вистар установлено, что исследуемый препарат не вызывает гибели лабораторных животных. За весь период наблюдения у экспериментальных животных не выявлено патологических реакций со стороны основных органов и систем, что свидетельствует о безопасности и удовлетворительной переносимости исследуемого препарата.

При изучении фармакокинетики исследуемого РФП отмечено, что после внутривенного введения указанный препарат достаточно быстро перераспределяется в кровяном русле и практически не покидает его. Выводится данный препарат в основном почками путем клубочковой фильтрации. Период полувыведения исследуемого препарата составил 10 мин (рис. 5).



Рис. 5. Фармакокинетическая кривая «концентрация 2-N-(6-йод¹²³гексаноил)-D-глюкозамина – время» в крови после его внутривенного введения

Fig. 5. Pharmacokinetic curve “concentration of 2-N-(6-iodo-123-hexanoyl) -D-glucosamine - time” in the blood after its intravenous administration

На серии скинтиграмм отмечается гиперфиксация препарата в проекции почек и мочевого пузыря.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований разработана оригинальная методика синтеза 2-N-(6-йодгексаноил)-D-глюкозамина, по которой промежуточный продукт синтеза сукцимид-1-ил 6-йодгексаноат был получен по экологически безопасной реакции окислительного расщепления циклогексанола. Предложена методика мечения йодом-123, при этом радиохимическая чистота 2-N-(6-йод¹²³гексаноил)-D-глюкозамина составила более 97%. Экспериментальные исследования на лабораторных животных продемонстрировали безопасность применения препарата, а фармакокинетические параметры изучаемого радиофармацевтического препарата являются оптимальными для диагностических средств.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Ларькина М.С., Подрезова Е.В., Зельчан Р.В., Брагина О.Д., Семенов А.С., Трофимов М.С. – проведение практической части исследования, разработка концепции, дизайна, анализ и интерпретация данных. Чернов В.И., Юсубов М.С., Скуридин В.С., Белоусов М.В. – разработка концепции, дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии ТНИМЦ РАН.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Wahl L.R. Targeting glucose transporters for tumor imaging. "Sweet" idea, "Sour" result. *J. Nucl. Med.* 1996; 37: 1038–1041.
- Hamacher K., Coenen H.H., Stocklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J. Nucl. Med.* 1986; 27: 235–238.
- Красикова Р.Н. Автоматизированные радиохимические технологии для обеспечения клинических ПЭТ исследований. *Нейроиммунология.* 2011; 9 (1–2): 4–12. [Krasikova R.N. Automated radiochemical technologies for providing clinical PET studies. *Neuroimmunology.* 2011; 9 (1–2): 4–12 (in Russ.)].
- Чернов В.И., Медведева А.А., Синилкин И.Г., Зельчан Р.В., Брагина О.Д., Скуридин В.С. Опыт разработки инновационных радиофармпрепаратов в Томском НИИ онкологии. *Сибирский онкологический журнал.* 2015; Приложение 2: 45–47. [Chernov V.I., Medvedeva A.A., Sinilkin I.G., Zelchan R.V., Bragina O.D., Skuridin V.S. Experience of developing innovative radiopharmaceuticals in Tomsk Research Institute of Oncology. *Siberian Oncological Journal.* 2015; Appendix 2: 45–47 (in Russ.)].
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г. и др. Радионуклидная тераностика злокачественных образований. *Вестник рентгенологии и радиологии.* 2016; 97 (5): 306–313. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G. et al. Radionuclide teranostic of malignancies. *Vestnik rentgenologii and radiologii.* 2016; 97 (5): 306–313 (in Russ.)].
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г. и др. Радиоиммунотерапия: современное состояние проблемы. Вопросы онкологии. 2016; 62 (1): 24–30. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G. et al. Radioimmunotherapy: current state of the problem. *Voprosi oncologii.* 2016; 62 (1): 24–30 (in Russ.)].
- Yang D.J., Kim C.G., Schechter N.R., Azhdarinia A., Yu D.F., Oh C.S., Bryant J.L., Won J.J., Kim E.E., Podoloff D.A. 2-Amino-2-deoxy-glucose conjugated cobalt ferrite magnetic nanoparticle (2DG-MNP) as a targeting agent for breast cancer cells. *Radiology.* 2003; 226 (2): 465–473. DOI: 10.1148/radiol.2262011811.
- Chen Y., Huang Z.W., He L., Zheng S.L., Li J.L., Qin D.L. Synthesis and evaluation of a technetium-99m-labeled diethylenetriaminepentaacetate-deoxyglucose complex ^{99m}Tc-DTPA-DG as a potential imaging modality for tumors. *Appl. Radiat. Isot.* 2006; 64 (3): 342–347. DOI: 10.1016/j.apradiso.2005.08.004.
- Chen X.J., Li L., Liu F., Liu B.L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m-labeled deoxyglucose derivatives as imaging agents for tumor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; 16 (21): 5503–5505. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.08.050.
- Chernov V.I., Sinilkin I.G., Choyznzonov E.C., Chijevskaya S.Y., Titskaya A.A., Zelchan R.V., Bragina O.D., Lyapunov A.Y., Skuridin V.S. Comparative evaluation of ^{99m}Tc-Al₂O₃ and ^{99m}Tc-fitat nanocolloids for sentinel lymph nodes visualization in patients with cancer of larynx and hypopharynx. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 2015; 42: 704.
- Skuridin V., Golovkov V., Garapatskiy A., Semenov A., Makarova E., Varlamova N., Minin S., Chernov V., Lishmanov Y. Development on complex radiopharmaceuticals by ¹²³I for radionuclide diagnosis of metabolic disorders and dysfunction of the myocardial autonomic nervous system. European journal of nuclear medicine and molecular imaging. Annual Congress of the European-Association-of-Nuclear-Medicine (EANM). Gothenburg, Sweden: Oct. 18–22, 2014, 41: 430.
- Gambini J.P., Cabral P., Alonso O., Savio D., Figueroa S.D., Zhang X., Ma L., Deutscher L., Quinnd T.P. Evaluation of ^{99m}Tc-glucarate as a breast cancer imaging agent in a xenograft animal model. *Nucl. Med. Biol.* 2011; 38 (2): 255–260. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2010.08.002.
- Nadeem Q., Khan I.U., Javed M., Mahmood Z., Dar U.K., Ali M., Hyder S.W., Murad S. Synthesis, characterization and bioevaluation of technetium-99m labeled N-(2-Hydroxybenzyl)-2-amino-2-deoxy-D-glucose as a tumor imaging agent. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2013; 26 (2): 353–357.
- Schechter N.R., Erwin W.D., Yang D.J., Kim E.E., Munden R.F., Forster K.; Taing L.C., Cox J.D., Macapinlac H.A., Podoloff D.A. Radiation dosimetry and biodistribution of ^{99m}Tc-ethylene dicysteine-deoxyglucose in patients with non-small-cell lung cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 2009; 36 (10): 1583–1591. DOI: 10.1007/s00259-009-1135-8.
- Yang D., Yukihiro M., Yu D.F., Ito M., Oh C.S., Kohanim S., Azhdarinia A., Kim C.G., Bryant J., Kim E.E., Podoloff D. Assessment of Therapeutic Tumor Response Using ^{99m}Tc-Ethylenedicysteine-Glucosamine. *Cancer Biother. Radio.* 2004; 19 (4): 443–456. DOI: 10.1089/cbr.2004.19.443.
- Семенов А.С., Скуридин В.С. Получение меченных радионуклидами производных глюкозы для диагностики в онкологии. Известия высших учебных заведений. Физика. 2013; 56 (4/2): 264–267. [Semenov A.S., Skuridin V.S. Obtaining radionuclide labeled glucose derivatives for diagnosis in oncology. *Bulletin of the Tomsk Polytechnic University. Physics.* 2013; 56 (4/2): 264–267 (in Russ.)].
- McAlindon T.E., LaValley M.P., Gulin J.P., Felson D.T. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis – A systematic quality assessment and

- meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*. 2000; 283 (11): 1469–1475. DOI: 10.1001/jama.283.11.1469.
18. Adam M.J., Fisher C.L., Orvig C., Ewart C., Patrick B.O. Cyclopentadienyltricarbonyl rhenium(I) and technetium(I) complexes containing pendant glucose derivatives. *J. Labelled Compd. Rad.* 2005; 48: 236.
 19. Ardestani M.S., Arabzadeh A.J., Heidari Z., Hosseinzadeh A., Ebrahimi H., Hashemi E., Mosayebnia M., Shafiee-Alavidjeh M., Alavi A., Babaei M.H., Rahmim A., Ebrahimi S.E.S., Amanlou M. Novel and facile methods for the synthesis of DTPA-mono-amide: a new completely revised strategy in radiopharmaceutical chemistry. *J. Radioanal. Nucl. Ch.* 2010; 283 (2): 447–455. DOI: 10.1007/s10967-009-0414-y.
 20. Liu L.Q., Zhao M.C., Wang Z., Qin Y.Y., Wang X.B. Synthesis and biological evaluation of novel technetium-99m-labeled HYNIC-D-glucose as a potential tumor imaging agent. *J. Radioanal. Nucl. Ch.* 2014; 301 (3): 731–737. DOI: 10.1007/s10967-014-3207-x.
 21. Wang Y., Zhu J.J., Song X.Q., Wang X.B., Yang J.G., Zhang J.B. Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc -2-[(3-carboxy-1-oxopropyl)amino]-2-deoxy-D-glucose as a potential tumor imaging agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014; 24 (16): 3882–3885. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.06.051.
 22. Lin X., Chao X.Y., Zhang J.B., Jin Z.H., Zhang Y.Y. Preparation and biodistribution of a ^{99m}Tc tricarbonyl complex with deoxyglucose dithiocarbamate as a tumor imaging agent for SPECT. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014; 24 (16): 3964–3967. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.06.037.
 23. Юсубов М.С., Жданкин В.В., Ларькина М.С., Дрыгунова Л.А. Способ получения ω -иодалифатических карбоновых кислот и их эфиров. Патент № 2494087. 2013; Опубл. 27.09.2013. Бюл. № 27. [Yusubov M.S., Zdan-kin V.V., Larkina M.S. et al. Method of producing omega-iodo-aliphatic carboxylic acids and esters thereof. Patent № 2494087. 2013; 27.09.2013 (in Russ.)].
 24. Кодина Г.Е., Богородская М.А. Химическая технология радиофармацевтических препаратов: учебное пособие М.: ФГУ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2010: 392. [Codina G.E., Bogorodskaya G.E. Chemical engineering radiopharmaceuticals: a manual. M.: FGU center named after them. A.I. Burnazyan of FMBA of Russia, 2010, 392 (in Russ.)].
 25. Скуридин В.С. Методы и технологии получения радиофармпрепаратов: учебное пособие. Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2007: 47. [Skuridin V.S. Methods and technologies for obtaining radiopharmaceuticals: textbook. Tomsk: Publishing house of Tomsk Polytechnic University. 2007, 47 (in Russ.)].

Поступила в редакцию 21.04.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Ларькина Мария Сергеевна, канд. физ. наук, доцент, кафедра фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

Семенов Алексей Сергеевич, инженер-химик, лаб. ПРВ ФТИ, НИ ТПУ, г. Томск.

Зельчан Роман Владимирович, канд. мед. наук, врач-радиолог, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Подрезова Екатерина Владимировна, аспирант, инженер, кафедры ТОВПМ, НИ ТПУ, г. Томск.

Брагина Ольга Дмитриевна, канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Юсубов Мехман Сулейман-оглы, д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой ТОВПМ, НИ ТПУ, г. Томск.

Скуридин Виктор Сергеевич, д-р техн. наук, профессор, зав. лабораторией № 31 ЯР ФТИ, НИ ТПУ.

Чернов Владимир Иванович, д-р мед. наук, профессор, зав. отделением радионуклидной диагностики, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Белоусов Михаил Валерьевич, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

Тимофеев Максим Сергеевич, канд. мед. наук, врач, отдел клинической лабораторной диагностики, НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, г. Томск.

(✉) Ларькина Мария Сергеевна, e-mail: marialarkina@mail.ru.

УДК 577.112.3:547.388.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-102-111

For citation: Larkina M.S., Semenov A.S., Zelchan R.V., Podrezova E.V., Bragina O.D., Yusubov M.S., Skuridin V.S., Chernov V.I., Belousov M.V., Timofeev M.S. Preparation of 123-iodine labeled glucosamine derivative and investigation of its biological properties. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 102–111.

Preparation of 123-iodine labeled glucosamine derivative and investigation of its biological properties

Larkina M.S.¹, Semenov A.S.², Zelchan R.V.^{2,3}, Podrezova E.V.², Bragina O.D.^{2,3}, Yusubov M.S.^{1,2}, Skuridin V.S.², Chernov V.I.^{2,3}, Belousov M.V.¹, Timofeev M.S.⁴

¹ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moskow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)
30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) of the Russian Academy of Science (RAS)
5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

⁴ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPRM), Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) of the Russian Academy of Sciences (RAS)
3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russian Federation

ABSTRACT

Search and synthesis of glucose derivatives for nuclear medicine is of great current interest. Being a promising analogue of glucose, D-glucosamine iodine labeled glucose derivatives can be applied in rheumatoid arthritis radionuclide diagnostics and therapy as a radiopharmaceutical.

The purpose of the study. Synthesis of a new iodine labeled D-glucosamine derivative; development of the iodine-123 labeling method and the obtained glucose derivative biostudy.

Materials and methods. Synthesis of 2-N-(6-iodohexanoyl)-D-glucosamine was carried out through established techniques in organic chemistry. Infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy were used to establish the test compound structure. Isotope change between iodine-127 and iodine-123 of glucosamine derivative was conducted using the heating of mix of the compound and Na¹²³I in acetone. The radio-TLC method was applied to estimate the radiochemical purity of 2-N- (6-iod-123-hexanoyl) -D-glucosamine. The safe application and test of drug pharmacokinetic parameters study was performed on intact Wistar male rats.

Results. An original 2-N-(6-iodohexanoyl)-D-glucosamine synthesis method was proposed. According to the method, an intermediate synthesis succinimide-1-yl 6-iodohexanoate was obtained by the cyclohexanone oxidative cleavage reaction. The radiochemical purity of 2-N-(6-iodo-123-hexanoyl)-D-glucosamine was more than 97%.

Conclusion. 2-N-(6-iodohexanoyl)-D-glucosamine was synthesized and iodine-123 labeled. When investigating the proposed radiopharmaceutical safety and pharmacokinetics, it was shown the drug lacks acute toxicity through intravenous injection and is excreted renally by glomerular filtration.

Key words: D-glucosamine, 2-N-(6-iodohexanoyl)-D-glucosamine, cyclohexanone, iodine-123, RFP.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the Cancer Research Institute TNRMC RAS.

Received 21.04.2017

Accepted 06.02.2018

Larkina Maria S., PhD, Associate Professor, Pharmaceutical Analysis Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Semenov Alexey S., Engineer, Laboratory, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Zelchan Roman V., PhD, Radiologist, Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Podrezova Ekaterina V., Postgraduate Student, Engineer, Technology of Organic Substances and Polymer Materials Department, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Bragina Olga D., PhD, Junior Researcher, Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Yusubov Mekhman S., DChSc, Professor, Head of the Technology of Organic Substances and Polymer Materials Department, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Skuridin Victor S., DTSc, Professor, Head of the Laboratory № 31, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Chernov Vladimir I., DM, Professor, Head of the Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Belousov Mikhail V., DPhSc, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Timofeev Maxim S., PhD, Doctor, Department of clinical laboratory diagnostics, GRIPRM, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Larkina Maria S.**, e-mail: marialarkina@mail.ru.

УДК 577.2: 544.773.432:547.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-112–120

Для цитирования: Лебедева С.Н., Очиров О.С., Стельмах С.А., Григорьева М.Н., Жамсаранова С.Д., Могнонов Д.М. Репаративное действие гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 112–120.

Репаративное действие гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида

Лебедева С.Н.¹, Очиров О.С.², Стельмах С.А.²,
Григорьева М.Н.², Жамсаранова С.Д.¹, Могнонов Д.М.²

¹ Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления
Россия, 670013 г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40В

² Байкальский институт природопользования
Сибирского отделения (СО) Российской академии наук (РАН)
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

РЕЗЮМЕ

Полигуанидины характеризуются выраженной антимикробной активностью и находят широкое применение в качестве основного действующего вещества в составе дезинфицирующих средств. Полимеры этого класса обладают свойством гелеобразования, что в совокупности с биологической активностью открывает перспективу получения эффективного однокомпонентного средства или основы препарата наружного применения для терапии повреждений кожных покровов. Ранее нами был разработан способ получения гидрогеля на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, заключающийся в сшивании концевых аминогрупп разветвленного полимера формальдегидом.

Целью работы явилось изучение влияния гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида на течение раневого процесса.

Материалы и методы. Эксперимент по оценке ранозаживляющего действия гидрогеля проводился в условиях моделирования линейной кожно-мышечной раны и термического ожога. В качестве сравнения использовался фармакопейный препарат «Левомеколь».

Результаты. Установлено, что гидрогель обладал выраженным ранозаживляющим действием на модели линейной раны, о чем свидетельствовали результаты ранотензометрии рубца и патоморфологии срезов, показавшие ускоренное созревание грануляционной ткани и формирование рубца. Методом вульнографии на модели термического ожога показано, что суточное уменьшение площади раны в наибольшей степени эксплицировано у опытной группы 1 (гидрогель), что также свидетельствовало о его выраженном репаративном действии. Определено, что при ожоге наблюдались резкое уменьшение суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови и нарастание количества лейкоцитов. В динамике на 10-, 17- и 24-е сут эксперимента уменьшение первого показателя составило 56, 34 и 21%, а увеличение второго показателя – соответственно на 32, 30 и 10% по отношению к интактным животным. Применение гидрогеля более эффективно, чем препарата сравнения, способствовало нормализации данных показателей.

Заключение. Таким образом, на моделях линейной кожно-мышечной раны и термического ожога установлено выраженное ранозаживляющее действие гидрогеля, о чем свидетельствовали результаты

✉ Очиров Олег Сергеевич, e-mail: olegoch@rambler.ru.

ранотензометрии, вульнографии патоморфологических исследований. Более высокий ранозаживляющий эффект гидрогеля, по-видимому, связан с увеличением суммарной антиоксидантной активности и более выраженным восстановлением количества лейкоцитов в крови.

Ключевые слова: полигуанидины, гель, линейная рана, термический ожог, тензометрия, вульнография.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие химии высокомолекулярных соединений привело к получению материалов широкого спектра применения, в том числе и медицинского назначения. Например, поливинилбутиловый эфир используется как эффективное ранозаживляющее средство с середины прошлого столетия [1]. Полигуанидины – класс полимеров, обладающих выраженной антимикробной активностью, основным представителем которых является полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГх) [2]. На данный момент этот полимер повсеместно применяется в качестве эффективного дезинфектанта в составе большинства дезинфицирующих средств, представленных на рынке России. ПГМГх представляет собой продукт равновесной поликонденсации гексаметилендиамина и гуанидин гидрохлорида. ПГМГх обладает специфической особенностью – при изменении мольного соотношения мономеров образуется гидрогель [3]. Таким образом, в зависимости от свойств полимера возможно его применение

в качестве основного действующего вещества, а также как матрицы для конструирования поливалентных лекарственных средств. Совокупность свойств гелеобразования и антимикробного действия открывает перспективы создания на основе ПГМГх средства для наружного применения в терапии повреждений кожных покровов.

Целью данной работы явилась оценка ранозаживляющего эффекта гелевой формы полигексаметиленгуанидин гидрохлорида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез. ПГМГх был получен путем поликонденсации (рис. 1) в расплаве гуанидин гидрохлорида (ГГХ) и гексаметилендиамина (ГМДА) при температуре 165 °С в течение 3 ч. ГГХ (производитель Across Organics) использовался без предварительной очистки (99%, температура плавления = 185–189 °С, $[H_2O] \leq 0,2\%$). ГМДА был очищен методом перегонки при температуре 205 °С, фракция собиралась при температуре 202–205 °С.

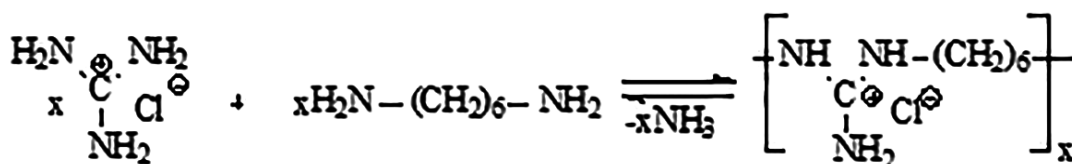


Рис. 1. Схема синтеза ПГМГх

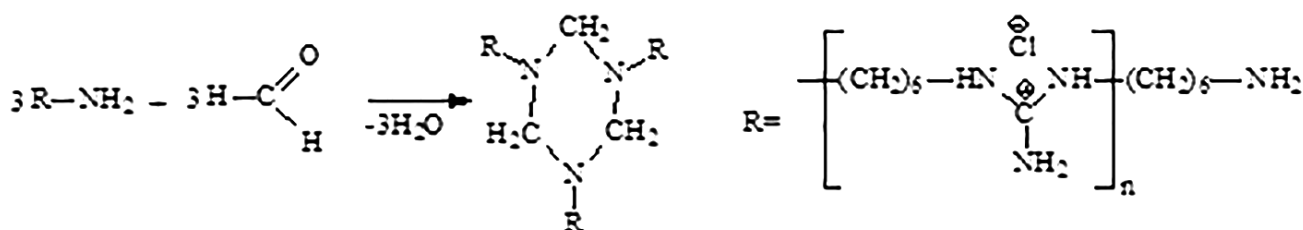


Рис. 2. Схема синтеза гидрогеля ПГМГх/ф

Гидрогель ПГМГх/ф (рис. 2) был получен путем добавления к раствору полимера (концентрация 30 г/дл) различного количества растворов 10%-го формальдегида (ГОСТ-1625-89), от эквивалентного до пятикратного избытка, относитель-

но количества концевых аминогрупп ПГМГх [4]. Реакция проходила при комнатной температуре в течение 1 ч. Очистка гидрогеля от золь-фракции проводилась путем многократного промывания дистиллированной водой на воронке Бюхнера.

Экспериментальные исследования. Для изучения репаративного действия гидрогеля использовали две модели, выполненные на крысах: 1) линейная кожно-мышечная рана; 2) термический ожог. В обеих моделях была использована единая схема эксперимента. Животные были разделены на три группы: опытная 1 (животным после моделирования линейной раны или ожога на область раны ежедневно наносили 100 мг гидрогеля на основе ПГМГх/ф – далее гидрогель); опытная 2 (группа сравнения), у которой для обработки раны животных использовалась мазь «Левомеколь» (производитель «Нижфарм», Россия) по аналогичной схеме; контрольная (с естественным заживлением ран).

Содержание животных соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных», (Страсбург, 1986). Эвтаназию животных осуществляли методом мгновенной декапитации под легким эфирным наркозом.

В первой модели исследования выполнены на 24 белых крысах линии Wistar обоих полов с исходной массой 200–220 г. Раневое повреждение кожи у крыс вызывали нанесением в области спины линейного разреза (до собственной фасции) размером 5 см. Затем на равном расстоянии от краев раневого дефекта был наложен один шов, в результате чего эпителий боковых краев раны не соприкасался, и заживление происходило вторичным натяжением [5]. Все хирургические процедуры (операционные вмешательства) на животных проводили под общим наркозом (тиопентал-натрий, внутривенно, 42 мг/кг) в асептических условиях. На 8-е сут животных выводили из эксперимента. О ранозаживляющем действии гидрогеля судили по данным тензометрических и патоморфологических исследований. Тензометрию раневого рубца проводили на приборе BE-5307 [6]. Для патоморфологических исследований вырезали участки раневой поверхности кожи с прилегающими неповрежденными тканями, включая подкожную клетчатку, и фиксировали в 10%-м водном растворе формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином [7].

Во второй модели исследования выполнены на 24 белых самках крыс линии Wistar с исходной

массой 180–200 г. Воспроизведение термического ожога проводили с использованием стеклянной пробирки с внутренним диаметром 22 мм, заполненной горячей водой (100 °С), по методу Б.А. Парамонова и В.Ю. Чеботарева [8].

Ранозаживление определялось методом вульвографии, для этого на образовавшуюся ожоговую рану накладывали прозрачный трафарет, переносили контуры ран и вычисляли их площадь. Среднюю площадь ран оценивали на 0-, 3-, 5-, 10- и 14-е сут эксперимента. Кроме того, о темпах заживления ожоговых повреждений судили по суточному уменьшению площади раны, которое вычисляли по формуле

$$S = \frac{(S_1 - S_n) \times 10}{S_1 \times t},$$

где S_1 – величина площади раны при первом измерении (0-е сут); S_n – величина количества суток между первым (0-е сут) и последующим измерением (соответственно 3-и, 5-е сут и т.д.).

Фиксировали также долю (%) животных с зарубцевавшимися ранами. На 10-, 17- и 24-е сут эксперимента у животных из хвостовой вены забирали кровь для определения суммарной антиоксидантной активности и подсчета общего содержания лейкоцитов. Суммарную антиоксидантную активность сыворотки крови животных определяли на жидкостном хроматографе «Цвет Яуза-01-АА» («Химаавтоматика», Россия) амперометрическим методом. Массовую концентрацию водорастворимых антиоксидантов измеряли, используя градуировочный график зависимости выхода сигнала от концентрации кверцетина [9]. Общее содержание лейкоцитов в крови определяли путем подсчета в камере Горяева при разведении крови 3%-й уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим [10].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета программ Biostat-2006. Полученные результаты исследования представлены в виде медианы Me , верхнего и нижнего квартилей $Q1$ – $Q3$, достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Результаты считали достоверными при достижении уровня значимости различий $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты исследований, проведенных на экспериментальной модели линейной раны. Данные тензометрических исследований свидетельствуют, что у животных опытной группы 1 прочность рубца была на 64%

выше соответствующего показателя у крыс контрольной группы. При этом препарат сравнения повышал данный показатель по отношению к контролю лишь на 48%.

Т а б л и ц а 1

Влияние гидрогеля и левомеколя на прочность рубцовой ткани белых крыс, $Me (Q_1-Q_3)$	
Группа животных	Прочность рубцовой ткани, кг
Опытная 1 (гидрогель), $n = 8$	0,41* (0,39–0,45)
Опытная 2 (левомеколь), $n = 8$	0,37* (0,35–0,39)
Контроль, $n = 8$	0,25 (0,21–0,28)

* отклонение статистически значимо по отношению к контролю, $p \leq 0,05$.

Данные патоморфологических исследований показали, что в контрольной группе на 8-е сут эксперимента у трех животных еще сохранялись раневая щель, а также выраженная воспалительная инфильтрация, преимущественно полиморфно-ядерными лейкоцитами, макрофагами и отек прилежащих к раневому дефекту тканей. Наблюдала кровоизлияния и явления пропитывания тканей экссудатом. Рост грануляционной ткани происходил с боков раны, которая имела рыхлую структуру и содержала большое количество вновь образованных капилляров. У четырех животных рана была покрыта струпом, под которым обнаруживали слой экссудата, содержащий эритроциты, полиморфно-ядерные лейкоциты, макрофаги и отдельные незрелые фибробласты. Грануляционная ткань, расположенная с боков и на дне раневого дефекта, была незрелой, в ней четко не прослеживались горизонтальные слои фибробластов, коллагеновые волокна не были сформированы, что свидетельствует о вялотекущем процессе регенерации. В краях раны сохранялись полиморфно-клеточная инфильтрация и геморрагическое пропитывание. На границе грануляционной и аморфной некротической ткани у краев раневого дефекта наблюдался рост недифференцированной эпителиальной ткани.

На фоне использования гидрогеля у всех животных опытной группы 1 наблюдались регенерация эпителия по краям раневого дефекта, а также хорошо развитая грануляционная ткань с большим количеством фибробластов, гистиоцитов и мононуклеарных лейкоцитов. В грануляционной ткани были видны ориентированные в горизонтальном направлении небольшие тяжи фибробластов и нити коллагена, сформирован-

ные в пучки, вертикальные капилляры, вокруг которых наблюдались скопления макрофагальных элементов, практически полностью замещающие полиморфно-ядерные лейкоциты. У трех животных опытной группы 1 отмечалось полное отторжение струпа, у оставшихся животных он находился в процессе десквамации (рис. 3). В отличие от контроля, отсутствовали некротические изменения, отек и воспалительная инфильтрация в прилежащих к раневому дефекту тканях, очевидно, связанная с особенностями действия полигуанидинов [11, 12].

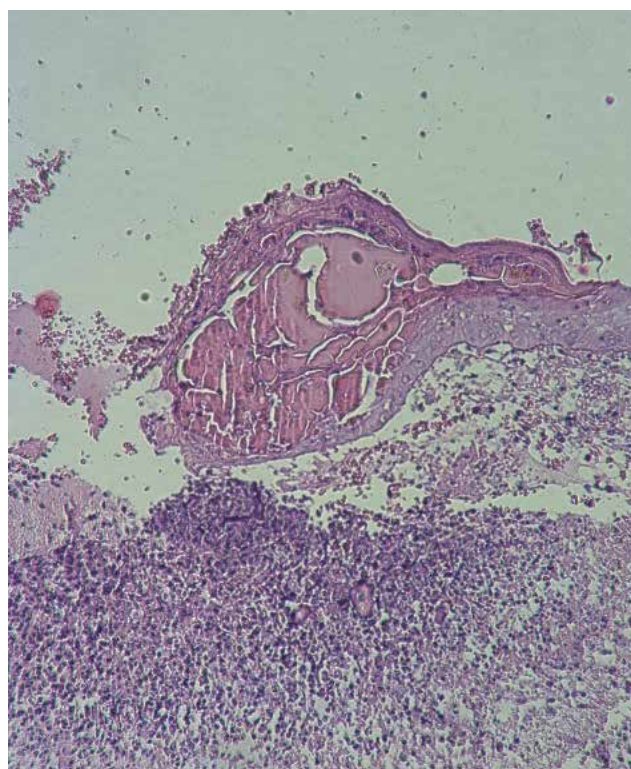


Рис. 3. Линейная рана кожи крысы опытной группы 1 (гидрогель) на 8-е сут эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

Fig. 3. Linear wound of the rat skin of the 1st experimental group (hydrogel) on the 8th day of the experiment. Staining with hematoxylin and eosin. Increase $\times 100$

У животных опытной группы 2 также наблюдали заживление раны. При этом у двух животных под струпом был отмечен экссудат, содержащий эритроциты, полиморфно-ядерные лейкоциты, макрофаги и единичные лимфоциты (рис. 4). Грануляционная ткань была менее зрелой, чем в опытной группе 1; в большем количестве преобладали клеточные элементы, чем волокнистая структура. В окружающей рану дерме, клетчатке и подлежащей мышечной ткани сохранялись отек и воспалительная инфильтрация.

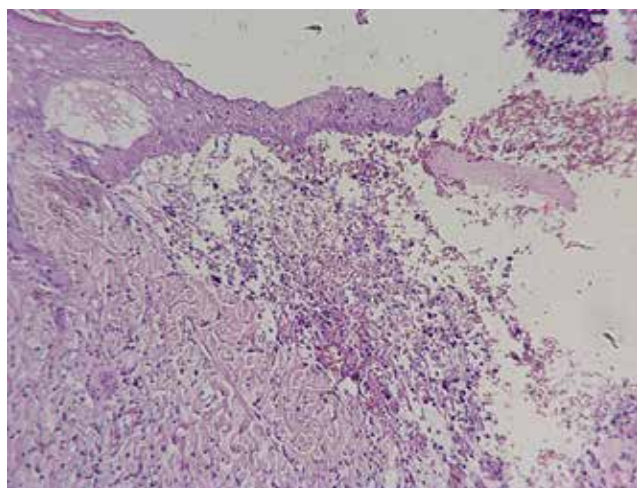


Рис. 4. Линейная рана кожи крысы опытной группы 2 (левомеколь) на 8-е сут эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$

Fig. 4. Linear wound of rat skin of the 2nd experimental group (levomecol) on the 8th day of the experiment. Staining with hematoxylin and eosin. Increase $\times 100$

Таким образом, на модели линейной раны ранозаживляющий эффект гидрогеля был выше, чем у препарата сравнения левомеколя.

Результаты исследования ранозаживляющего действия препаратов на модели ожоговой раны представлены в табл. 2–4. Из представленных в табл. 2 результатов следует, что площадь ран у животных и опытных групп 1 (гидрогель) и 2 (левомеколь), начиная с 10-х сут опыта, статистически значимо отличалась от результатов контрольной группы. При этом суточное уменьшение площади раны в наибольшей степени выражено у группы животных опытной группы 1. Это свидетельствует о выраженном репаративном действии гидрогеля. Причем окончательное и полное заживление ожоговых ран у крыс, пролеченных гидрогелем и левомеколем, наступало к 21–23-м, а у контрольной группы – к 23–27-м сут.

Следует отметить, что снижение антиоксидантной активности играет важную роль в патогенезе ожоговой болезни. При ожогах в мембранах эритроцитов и сыворотки крови значительно снижается антиоксидантная активность, что является косвенным подтверждением уменьшения уровня эндогенных антиоксидантов в организме [13].

Суммарная антиоксидантная активность (САА) сыворотки крови крыс при исследовании представлена в табл. 3.

Т а б л и ц а 2

Влияние гидрогеля и левомеколя на динамику заживления ран у крыс при термическом ожоге, $Me (Q_1-Q_3)$									
Срок, сут	Группа животных								
	Опытная 1 (гидрогель), $n = 8$			Опытная 2 (левомеколь), $n = 8$			Контроль, $n = 8$		
	$S, \text{ см}^2$	$S, \%$	% жив. с корост.	$S, \text{ см}^2$	$S, \%$	% жив. с корост.	$S, \text{ см}^2$	$S, \%$	% жив. с корост.
0	3,26 (3,08–3,43)	–	100	3,26 (3,08–3,43)	–	100	3,26 (3,08–3,43)	–	100
3	2,25 (2,14–2,35)	10,33	100	2,52 (2,38–2,65)	7,57	100	2,78 (2,54–3,01)	4,91	100
5	2,01 (1,9–2,13)	7,67	100	2,34 (2,23–2,47)	5,64	100	2,56 (2,40–2,8)	4,29	100
10	1,52* (1,45–1,58)	5,34	100	1,67* (1,60–1,72)	4,88	100	1,82 (1,71–1,92)	4,42	100
14	1,15 (1,04–1,26)	4,62	40	0,92* (0,86–0,99)	5,13	60	1,27 (1,12–1,4)	4,36	60
17	–	–	20	–	–	20	–	–	40

* отклонение статистически значимо по отношению к контролю, $p \leq 0,05$.

Т а б л и ц а 3

Влияние гидрогеля и левомеколя на суммарную антиоксидантную активность крови крыс при термическом ожоге, $Me (Q_1-Q_3)$			
Группа животных	Срок исследования, сут		
	10	17	24
Опытная 1 (гидрогель), $n = 8$	22,36* (21,86–22,86)	34,37* (33,42–35,33)	39,91* (38,7–41,13)

О к о н ч а н и е т а б л. 3

Группа животных	Срок исследования, сут		
	10	17	24
Опытная 2 (левомеколь), <i>n</i> = 8	21,26 (20,74–21,79)	31,67* (31,35–32,00)	37,62 (37,16–38,10)
Контроль, <i>n</i> = 8	20,20 (19,28–21,13)	30,66 (30,46–30,87)	36,62 (36,16–37,08)

П р и м е ч а н и е. Норма САА (у интактных животных) составила 46,32 (45,28–47,36).

* отклонение статистически значимо по отношению к контролю, $p \leq 0,05$.

Т а б л и ц а 4

Влияние гидрогеля и левомеколя на содержание лейкоцитов в крови крыс при термическом ожоге, $\times 10^9/\text{л}$, <i>Me</i> (Q_1 – Q_3)			
Группа животных	Срок исследования, сут		
	10	17	24
Опытная 1 (гидрогель), <i>n</i> = 8	9,17* (8,74–9,58)	8,42* (7,78–9,06)	8,25 (7,32–9,18)
Опытная 2 (левомеколь), <i>n</i> = 8	9,94 (9,12–10,76)	9,00* (8,22–9,65)	8,81 (8,28–9,36)
Контроль, <i>n</i> = 8	10,75 (10,03–11,47)	10,55 (9,81–11,23)	8,94 (8,14–9,94)

П р и м е ч а н и е. Норма содержания лейкоцитов (у интактных животных) составила 8,13 (7,56–8,70).

* отклонение статистически значимо по отношению к контролю, $p \leq 0,05$.

Как следует из представленных данных, при ожоге (контрольная группа) наблюдалось резкое уменьшение суммарной антиоксидантной активности. В динамике на 10-, 17- и 24-е сут эксперимента она составила 56, 34 и 21% по отношению к норме (интактным животным). Применение гидрогеля и левомеколя при лечении способствовало увеличению САА, причем процесс восстановления данного показателя был наиболее выражен в опытной группе 1.

Ожоговая травма характеризуется нарастанием количества лейкоцитов (лейкоцитозом). Причем в литературе описаны две волны лейкоцитоза. Общее количество лейкоцитов достигает максимума уже в течение 6–12 ч после травмы и сохраняется в течение 3 сут с последующим спадом. Вторая волна начинается на 5–10-е сут после ожога и длится 3–8 сут, при этом максимальное количество лейкоцитов при вторичной волне обычно ниже [14].

Как следует из полученных данных (табл. 4), увеличение количества лейкоцитов в контрольной группе на 10-, 17- и 24-е сут эксперимента составило 32, 30 и 10% по отношению к норме (интактным животным). Применение гидрогеля и левомеколя при лечении способствовало нормализации количества лейкоцитов в периферической крови крыс, причем процесс восста-

новления данного показателя был наиболее выражен в опытной группе 1 (гидрогель).

Из полученных данных следует, что репаративный эффект гидрогеля на экспериментальной модели термического ожога более выражен, чем у препарата сравнения (левомеколь).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на моделях линейной кожно-мышечной раны и термического ожога установлено выраженное ранозаживляющее действие гидрогеля. Результаты ранотензометрии, вульвографии и патоморфологических исследований свидетельствуют о высокой эффективности гидрогеля, сравнимой с фармакопейным препаратом «Левомеколь». Высокий ранозаживляющий эффект гидрогеля, по-видимому, связан с увеличением суммарной антиоксидантной активности и снижением лейкоцитоза. Следует отметить, что статистически значимых различий между изучаемыми показателями у гидрогеля и левомеколя не установлено. Левомеколь представляет собой комплексный препарат, включающий вспомогательные полимеры – полиэтиленоксиды 400 и 1 500, а также стимулятор регенерации тканей диоксометилтетрагидропиримидин и антибиотик хлорамфеникол, которые могут оказывать побоч-

ное действие. Изучаемый гидрогель ПГМГх/ф не содержал в себе активные антибиотические и антисептические соединения, но обладал ранозаживляющим действием. В дальнейшей работе планируется использование гидрогеля в качестве матрицы для конструирования поливалентных лекарственных средств. Для усиления репаративных свойств препарата планируется создание комплексов гидрогеля с лекарственными средствами, в том числе растительного происхождения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Лебедева С.Н. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания. Очиров О.С. – анализ и интерпретация данных. Стельмах С.А. – анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания. Григорьева М.Н. – анализ и интерпретация данных. Жамсаранова С.Д. – обоснование рукописи, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания. Могнонов Д.М. – обоснование рукописи, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено этическим комитетом Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (протокол № 6 от 05.06.2015 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сидельковская Ф.П. Бальзам, изобретенный Шостаковским. Химия и жизнь. 1985; 4: 10–12 [Sidel'kovskaya F.P. Balm, invented by Shostakovski. *Himiya i zhizn'*. 1985; 4: 10–12 (in Russ.)].
2. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М.: ЛКМ-пресс, 2009: 304. [Voinceva I.I., Gembickij P.A. Polyguanidines – disinfectants and polyfunctional additives in composite materials. M.: LKM-press Publ., 2009: 304 (in Russ.)].
3. Григорьева М.Н., Стельмах С.А., Базарон Л.У., Могнонов Д.М. pH-чувствительные гидрогели на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида. *ЖПХ*. 2011; 84 (4): 689–691. [Grigor'eva M.N., Stel'mah S.A., Bazaron L.U., Mognonov D.M. pH-sensitive hydrogels based on polyhexamethyleneguanidine hydrochloride. 2011; 84 (4): 689–691 (in Russ.)].
4. Очиров О.С., Стельмах С.А., Могнонов Д.М. Гидрогели на основе полиалкилгуанидинов и альдегидов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. Б*. 2016; 58 (3): 262–268 [Ochirov O.S., Stel'mah S.A., Mognonov D.M. Hydrogels based on polyalkylguanidines and aldehydes. *Vysokomol. soed. Seriya B*. 2016; 58 (3): 262–268 (in Russ.)].
5. Убашеев И.О. Природные лекарственные средства при повреждениях органов и тканей. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 1998: 224. [Ubasheev I.O. Natural remedies for injuries to organs and tissues. Ulan-Ude: Izd-vo BNC SO RAN Publ., 1998: 224 (in Russ.)].
6. Абаев Ю.К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция. Ростов н/Д: Феникс, 2006: 427. [Abaev Yu.K. Surgeon's Handbook. Wounds and wound infection. Rostov-na-Donu: Feniks Publ., 2006: 427 (in Russ.)].
7. Микроскопическая техника: руководство; под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М., 1996: 544. [Microscopic technique: manual; pod red. D.S. Sarkisova, Yu.L. Perova. M., 1996: 544 (in Russ.)].
8. Парамонов Б.А., Чеботарев В.Ю. Методы моделирования термических ожогов кожи при разработке препаратов для местного лечения. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002; 134 (11): 593–597. [Paramonov B.A., Chebotarev V.Yu. Methods for modeling thermal skin burns in the development of drugs for topical treatment. *Byull. ebksp. biol. i med.* 2002; 134 (11): 593–597 (in Russ.)].
9. Yashin Ya.I., Nemzer B.V., Ryzhnev V.Yu. et al. Creation of Databank for Content of Antioxidants in Food Products by an Amperometric Method. *Molecules*. 2010; 15: 7450–7466.
10. Методы клинических лабораторных исследований; под ред. В.С. Камышников. М.: ООО «МЕД-пресс-информ», 8-е изд., 2015: 736. [Methods of clinical laboratory research; pod red. V.S. Kamyshnikova. M.: ООО «MEDpress-inform» Publ., 8-e izd., 2015: 736 (in Russ.)].
11. Ефимов К.М., Гембицкий П.А., Снежко А.Г. Полигуанидины – класс малотоксичных дезсредств пролонгированного действия. Дезинфекционное дело. 2000; 4: 32. [Efimov K.M., Gembickij P.A., Snezhko A.G. Polyguanidines – a class of low-toxic disinfectants of prolonged action. *Dezinfekcionnoe delo*. 2000; 4: 32 (in Russ.)].
12. Shi L., Yang N., Zhang H., Chen L., Tao L., Wei Y., Liu H., Luo Y. A novel poly(glutamic acid)/silk-sericin-hydrogel for wound dressing: Synthesis, characterization and biological evaluation. *Materials Science and Engineering C*. 2009; 48 (1): 533–540.
13. Михальчик Е.В., Титкова С.М., Ануров М.В. и др. Антиоксидантные ферменты кожи при эксперименталь-

ных ожогах. Биомедицинская химия. 2006; 52 (6): 576–586. [Mihal'chik E.V., Titkova S.M., Anurov M.V. i dr. Antioxidant skin enzymes in experimental burns. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2006; 52 (6): 576–586 (in Russ.)].

14. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги: руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2000: 480 [Paramonov B.A., Porembskij Ya.O., Yablonskij V.G. Burns: A guide for doctors. SPb.: SpecLit Publ., 2000: 480 (in Russ.)].

Поступила в редакцию 30.05.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Лебедева Светлана Николаевна, д-р биол. наук, профессор, кафедра биотехнологии, Институт прикладной инженерии и биотехнологии, Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ.

Очиров Олег Сергеевич, инженер, лаборатория химии полимеров, Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ.

Стельмах Сергей Александрович, канд. хим. наук, зав. лабораторией химии полимеров, Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ.

Григорьева Мария Николаевна, инженер, лаборатория химии полимеров, Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ.

Жамсаранова Сэсэгма Дашиевна, д-р биол. наук, профессор, кафедра биотехнологии, Институт прикладной инженерии и биотехнологии, Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ.

Могнонов Дмитрий Маркович, д-р хим. наук, гл. науч. сотрудник, лаборатория химии полимеров, Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ.

(✉) Очиров Олег Сергеевич, e-mail: olegoch@rambler.ru.

УДК 577.2: 544.773.432:547.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-112–120

For citation: Lebedeva S.N., Ochirov O.S., Stelmakh S.A., Grigor'eva M.N., Zhamsaranova S.D., Mogonov D.M. Reparative action of hydrogel polyhexamethyleneguanidine hydrochloride. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 112–120.

Reparative action of hydrogel polyhexamethyleneguanidine hydrochloride

Lebedeva S.N.¹, Ochirov O.S.², Stelmakh S.A.²,
Grigor'eva M.N.², Zhamsaranova S.D.¹, Mogonov D.M.²

¹ East Siberian State University of Technology and Management
40V, Klyuchevskaya Str., Ulan-Ude, 670013, Russian Federation

² Baikal Institute for Nature Management, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (SB RAS)
6, Sakhyanovoy Str., Ulan-Ude, 670047, Russian Federation

ABSTRACT

Polyguanidines are characterized by pronounced antimicrobial activity and are widely used as the main active substance of disinfectants. Polymers of this class possess the property of gel formation, which, together with biological activity, opens the prospect of obtaining an effective single-component agent or basis for an external preparation for the therapy of skin lesions. Earlier, we developed a method for the production of a hydrogel based on polyhexamethyleneguanidine hydrochloride, which involves the cross-linking of the terminal amino groups of the branched polymer with formaldehyde.

The purpose of the study was to observe the effect of hydrogel polyhexamethyleneguanidine hydrochloride on the progression of wound healing.

Materials and methods. An experiment on the evaluation of the wound healing action of hydrogel was carried out under conditions simulating a linear cutaneous wound, a muscular wound, and a thermal burn. The comparative drug was the pharmacopoeian drug Levomecol.

Results. It has been established that hydrogel has a pronounced wound healing effect, as evidenced by the results of ruminant thoracic anatomy and pathomorphology of the sections, which shows accelerated ripening

of granulation tissue and scar formation. By the method of vulnografiya it was shown that the daily decrease in wound area is most pronounced in the hydrogel group, which also indicates a pronounced reparative effect. It was determined that the hydrogel activates the growth of antioxidatic activity and leukocytes in the blood of animals in dynamics on the 10th, 17th and 24th day of the experiment, amounting to 56, 34 and 21%, and of leukocytes – 32, 30, 10% in relation to the intact animals.

Conclusion. Thus, on the model of a linear cutaneous wound, a muscular wound, and a thermal burn, the healing effect of the hydrogel PGMGh/f is established, as evidenced by the results of the early exercise, vulnografiya and pathomorphological studies. It is noted that the hydrogel PGMG h/f has an effect on the content of antioxidants and leukocytes in the blood, contributing to the normalization of their quantity.

Key words: polyguanidines, gel, linear wound, thermal burn, tensometry, vulnografiya.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the Institute of General and Experimental Biology SB RAS (Protocol No. 6 of June 5, 2015).

Received 30.05.2017

Accepted 06.02.2018

Lebedeva Svetlana N., DBSc, Professor, Department of Biotechnology, Institute of Applied Engineering and Biotechnology, East Siberian State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russian Federation.

Ochirov Oleg S., Engineer, Laboratory of Polymer Chemistry, Baikal Institute of Nature Management, SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation.

Stelmakh Sergey A., PhD, Researcher, Laboratory of Polymer Chemistry, Baikal Institute of Nature Management, SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation.

Grigor'eva Maria N., Engineer, Laboratory of Polymer Chemistry, Baikal Institute of Nature Management, SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation.

Zhamsaranova Sesegma D., DBSc, Professor, Department of Biotechnology, Institute of Applied Engineering and Biotechnology, East Siberian State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russian Federation.

Mognonov Dmitry M., DChSc, Senior Researcher, Laboratory of Polymer Chemistry, Baikal Institute of Nature Management, SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation.

(✉) **Ochirov Oleg S.**, e-mail: olegoch@rambler.ru.

УДК 616.34-002-018.7-091.818

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-121-129

Для цитирования: Матвеева Н.Ю., Матвеев Ю.А., Калиниченко С.Г., Едранов С.С., Каминский Ю.В. Значение апоптоза энтероцитов при воспалительных заболеваниях кишечника. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 121–129.

Значение апоптоза энтероцитов при воспалительных заболеваниях кишечника

Матвеева Н.Ю., Матвеев Ю.А., Калиниченко С.Г., Едранов С.С., Каминский Ю.В.

Тихоокеанский государственный медицинский университет (ТГМУ)
Россия, 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

РЕЗЮМЕ

Цель — исследовать локализацию клеток, экспрессирующих villin, p53, Bcl-2 и PUMA, в слизистой оболочке кишечника при неинфекционных колитах.

Материалы и методы. На материале 20 аутопсий и 40 биопсий тонкого и толстого отделов кишечника исследованы морфология и локализация иммунореактивных маркеров апоптоза при язвенном колите (ЯК) и болезни Крона (БК).

Результаты. В фокусе специфического воспаления слизистой оболочки кишечника обнаруживаются клетки, в разной степени экспрессирующие анти- и проапоптотические молекулы. В контрольной группе антиапоптотические факторы (villin и Bcl-2) определяются преимущественно в энтероцитах, проапоптотические факторы (p53 и PUMA) — в клетках собственной пластинки слизистой оболочки. При ЯК и БК установлена обратная корреляция между числом клеток, экспрессирующих p53/PUMA, и количеством villin- и Bcl-2-иммунопозитивных клеток. При этом проапоптотические молекулы выявляются и в энтероцитах, и в клетках собственной пластинки слизистой оболочки кишечника.

Заключение. Полученные данные указывают на значительную роль апоптоза в патоморфогенезе хронического неинфекционного воспаления кишечника. Хронизация процесса и характер структурных повреждений в стенке кишечника при ЯК и БК связаны с нарушением баланса регуляторных анти- и проапоптотических факторов. Клетки, экспрессирующие эти факторы, показывают обратную численную зависимость.

Ключевые слова: язвенный колит, болезнь Крона, p53, Bcl-2, PUMA, villin, неинфекционное воспаление.

ВВЕДЕНИЕ

Группу неинфекционных воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) составляют болезнь Крона (БК), язвенный колит (ЯК) и недифференцируемый колит [1, 2]. У этих заболеваний много общего: хроническое рецидивирующее аутоиммунное воспаление кишечника неясного происхождения, идентичные клинико-морфологические проявления и аналогичные лечебные подходы [2].

Структурная целостность кишечника и эффективный интестинальный барьер обеспечиваются равновесием процессов пролиферации и программированной гибели клеток. Дисрегуляция апоптоза и некроптоза приводит к развитию ВЗК, а в сочетании с нарушением иммунного ответа создается порочный круг для постоянного поддержания кишечного воспаления [3].

Апоптоз клеток слизистой оболочки при ВЗК развивается как стадийный процесс. Его запуск и поддержание контролируют соответствующие анти- и проапоптотические факторы, среди которых p53, Bcl-2 и PUMA принадлежит основная

✉ Матвеева Наталья Юрьевна, e-mail: nymatveeva@mail.ru.

регулирующая роль [4, 5]. Для эпителия кишечника установлен специфический антиапоптотический пептид виллин, который препятствует выходу митохондриального цитохрома С в цитозоль [6]. Однако взаимосвязь экспрессии виллина с другими факторами апоптоза у больных ВЗК остается невыясненной.

Цель настоящей работы состояла в исследовании локализации клеток, экспрессирующих виллин, p53, Bcl-2 и PUMA, в слизистой оболочке кишечника при неинфекционных колитах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован материал стенки тонкой и толстой кишки, полученный при патологоанатомическом вскрытии 20 больных (15 женщин и 5 мужчин) в возрасте 25–75 лет (средний возраст составил $45,5 \pm 2,8$) с клиническим диагнозом БК (фрагменты подвздошной кишки) в 12 случаях и ЯК (фрагменты ободочной кишки) – в восьми. Параллельно изучались образцы тонкой и толстой кишки, взятые во время резекции по поводу ЯК – 35 случаев и БК – пять случаев. Возраст больных 28–80 лет (средний возраст $52,2 \pm 2,3$), мужчин – 16, женщин – 24. Продолжительность болезни с момента установления диагноза: 28 случаев (46,6%) – менее двух лет, 15 случаев (25%) – от двух до четырех лет, 11 случаев (18,3%) – от четырех до шести лет, шесть случаев (10%) – более шести лет. В качестве контроля изучали фрагменты тонкой и толстой кишки у 20 практически здоровых людей, погибших вследствие травм, сопоставимых по возрасту и полу.

Материал получали во Владивостокском патологоанатомическом бюро согласно Приказу МЗ России № 354н от 06.06.2013 г. «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий», Приказу МЗ РФ № 179н от 24.03.2016 г. «О правилах проведения патологоанатомических исследований» и Приказу Минздравсоцразвития РФ № 346н от 12.05.2010 г. «Порядок организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации».

Иммуногистохимическое исследование проведено на материале ранних вскрытий (2 ч после констатации биологической смерти). Материал фиксировали в 10%-м нейтральном формалине на фосфатном буфере в течение 24 ч, после чего промывали в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,2) с 6–7-кратной сменой раствора, заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 10 мкм монтировали на предмет-

ные стекла, депарафинировали и инкубировали с мышиными моноклональными первичными антителами против виллина, p53, Bcl-2, PUMA (Abcam, США), разведенными в отношении 1 : 200 в фосфатном буфере, содержащем Тритон X-100 и нормальную сыворотку козы, в течение ночи при комнатной температуре. После промывки срезы в течение 1 ч инкубировали в растворе биотинилированных вторичных антител против иммуноглобулина (Ig) G кролика, выработанных у козы, при разведении 1 : 100 (Vector Laboratories, США), а затем в растворе авидин-пероксидазного комплекса (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, США). Срезы выдерживали в 0,03%-м растворе диаминобензидина и 0,01%-й перекиси водорода на фосфатном буфере в течение 10–20 мин, затем промывали, обезвоживали и заключали в бальзам по обычным правилам. В качестве контроля из среды исключали первичные антитела, окрашивание клеток отсутствовало. Часть срезов докрашивали гематоксилином и эозином.

Препараты просматривали в световом микроскопе AxioScore A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали с помощью цифровой камеры AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия). Количественный анализ данных проводили с помощью окуляр-морфометрической сетки при увеличении объектива $\times 40$. Значение каждого показателя вычисляли не менее чем в 20 полях зрения. Морфометрическую обработку полученных фотографий проводили с помощью пакета программ AxioVision 4.8.1. Относительную плотность клеток вычисляли в единице объема ткани (из расчета на $0,01 \text{ мм}^2$) с учетом поправки на толщину среза и диаметр ядра. Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ Statistica for Windows, версия 6.0. Данные количественного анализа представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего $M \pm m$. Для оценки значимости полученных результатов применяли t -критерий Стьюдента, значение доверительного интервала $p < 0,05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольной группе и непораженных отделах толстого и тонкого кишечника патологических изменений в структуре слизистой оболочки не наблюдалось. При исследовании локализации виллина и Bcl-2 иммунопозитивная реакция выявлялась преимущественно в энтероцитах крипт, в зоне пролиферации эпителия и немногочисленных клетках собственной пластинки. Топография

экспрессии p53 и PUMA имеет иной характер: экспрессия молекул наблюдается в клетках сое-

динительной ткани и небольшом количестве эпителия крипт (рис. 1).

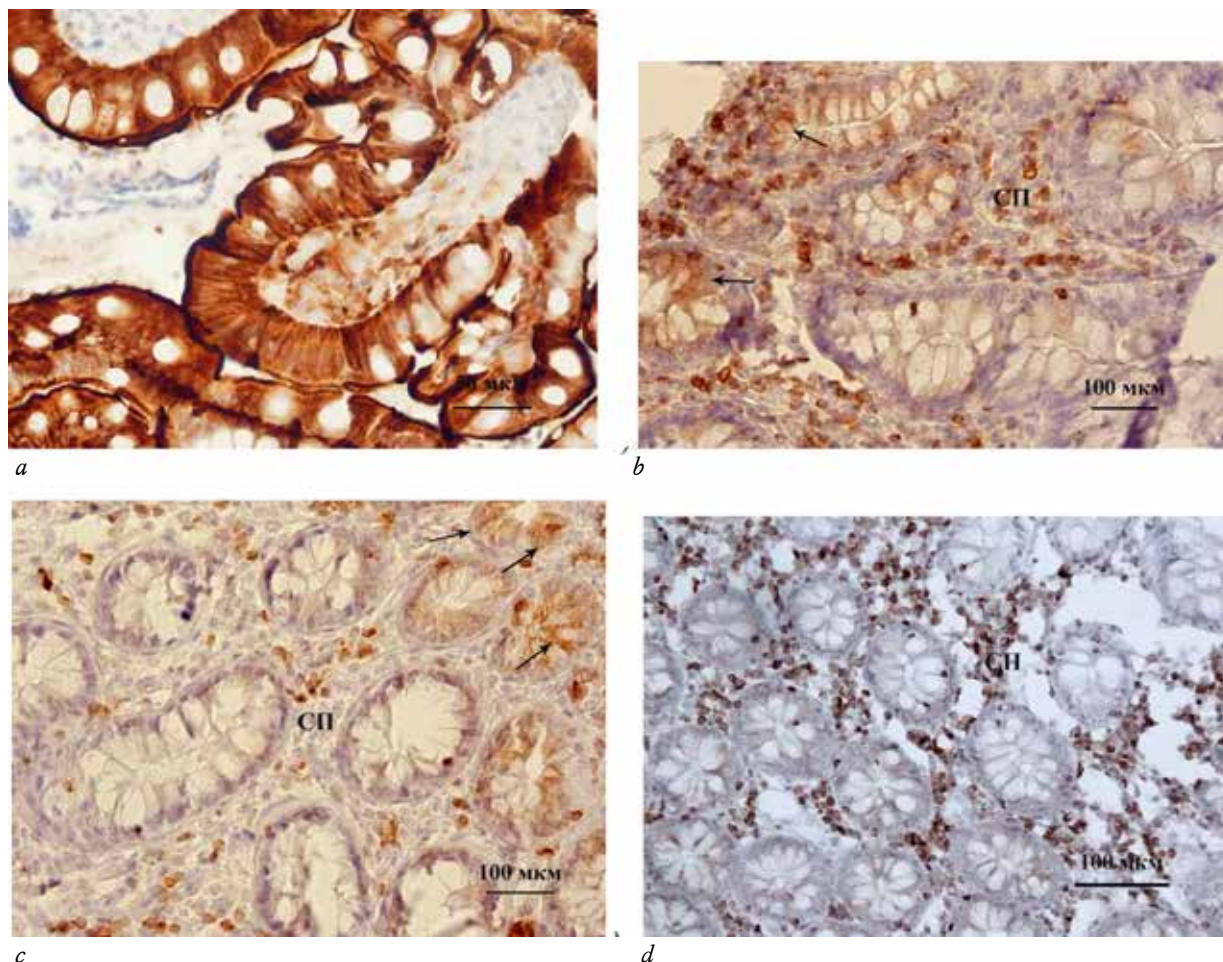


Рис. 1. Распределение villin-, Bcl-2-, p53-, PUMA-иммунореактивных клеток слизистой оболочки ободочной кишки человека: *a* – villin-позитивные энтероциты крипты; *b* – Bcl-2-иммунореактивные энтероциты в зоне пролиферации эпителия крипт (стрелки) и единичные клетки собственной пластинки (СП); *c* – экспрессия p53 в энтероцитах (стрелки) и клетках соединительной ткани СП; *d* – умеренное количество PUMA-иммунопозитивных клеток с преимущественной локализацией в СП. Препараты докрашены гематоксилином

Fig. 1. Distribution of villin-, Bcl-2-, p53-, PUMA-immunoreactive cells of the human colon mucosa: *a* – villin-positive cryptsite enterocytes; *b* – Bcl-2-immunoreactive enterocytes in the proliferation zone of the crypt epithelium (arrows) and single cells of the intrinsic plate; *c* – p53 expression in enterocytes (arrows) and cells of connective tissue of the self-lamina; *d* – moderate number of PUMA immunopositive cells with predominant localization in the intrinsic plate. Specimens are stained with hematoxylin

В 43 исследованных случаях (средний возраст $48,8 \pm 4,7$) обнаруживались специфические для ЯК признаки: диффузное воспаление слизистой оболочки с преобладанием в воспалительном инфильтрате лимфоцитов и плазмоцитов ($n = 38$), синус-гистиоцитоз в лимфоузлах брыжейки ($n = 17$), уплощение и истончение слизистой оболочки ($n = 35$), деформация крипт ($n = 21$), множество крипт-абсцессов ($n = 22$), исчезновение бокаловидных клеток и появление в ямках крипт оксифильных клеток Панета ($n = 29$) (рис. 2, *a, б*).

При исследовании параллельных срезов выявлялась слабая экспрессия villina и Bcl-2 с преимущественной локализацией в энтероцитах, а также в дискретной популяции клеток собственной пластинки слизистой оболочки. На участках толстой кишки, где отсутствует позитивная иммунореактивность к villину и Bcl-2, отмечалась высокая экспрессия p53 и PUMA (рис. 3).

Во всех 17 случаях БК (средний возраст составил $53,1 \pm 4,5$) наблюдались различной степени выраженности структурные изменения стенки

подвздошной кишки: фиброз ($n = 9$), фокальное воспаление слизистой оболочки и подслизистой основы ($n = 17$), изредка встречается и трансмуральное поражение стенки кишки ($n = 5$), выражена мукоидизация ($n = 11$), увеличение размеров инфильтратов с развитием большого количества лимфоидных фолликулов ($n = 13$) (рис. 2, *в, г*). Единичные эпителиоидноклеточные

гранулемы без некроза ($n = 6$) определяются в различных сегментах толстой кишки – как в зоне деструктивных поражений, так и в участках нормальной слизистой оболочки. На параллельных срезах отмечаются высокая иммунопозитивная реакция p53 и PUMA в эпителиоцитах и клетках собственной пластинки слизистой оболочки и слабая экспрессия виллина и Bcl-2 (рис. 4).

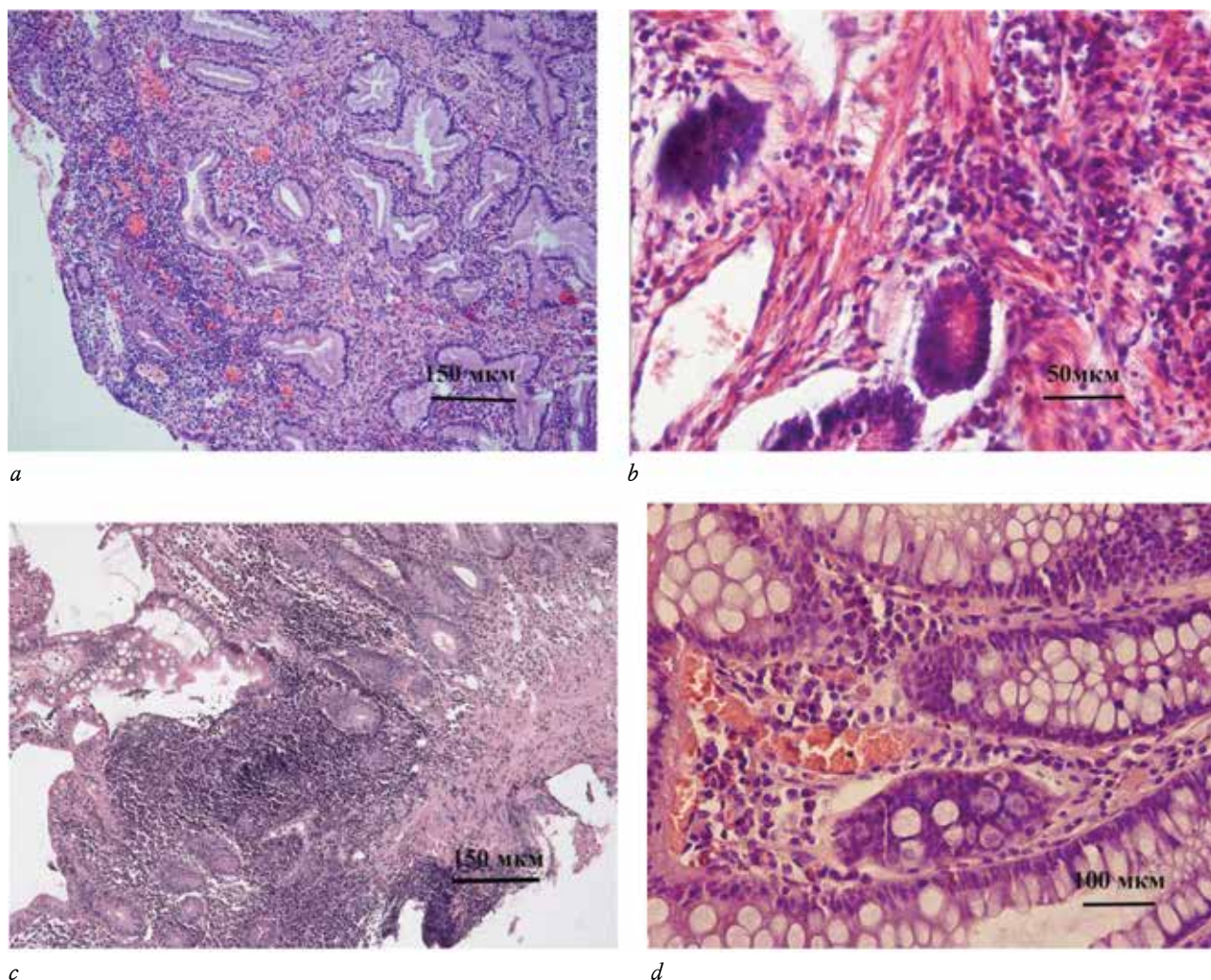


Рис. 2. Патоморфология слизистой оболочки кишечника при воспалительных заболеваниях кишечника: *а* – воспаление слизистой оболочки ободочной кишки, множественная деформация крипт при язвенном колите; *б* – крипт-абсцессы слизистой оболочки ободочной кишки при язвенном колите; *с* – трансмуральное воспаление стенки подвздошной кишки при болезни Крона; *д* – выраженная мукоидизация кишечного эпителия подвздошной кишки при болезни Крона. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 2. Pathomorphology of the intestinal mucosa in inflammatory bowel diseases: *a* – inflammation of the mucosa of the colon, multiple deformation of crypts with ulcerative colitis; *b* – crypt-abscesses of the mucous membrane of the colon with ulcerative colitis; *c* – transmural inflammation of the ileum wall in Crohn's disease; *d* – marked mucoidization of the intestinal epithelium of the ileum in Crohn's disease. Staining with hematoxylin and eosin

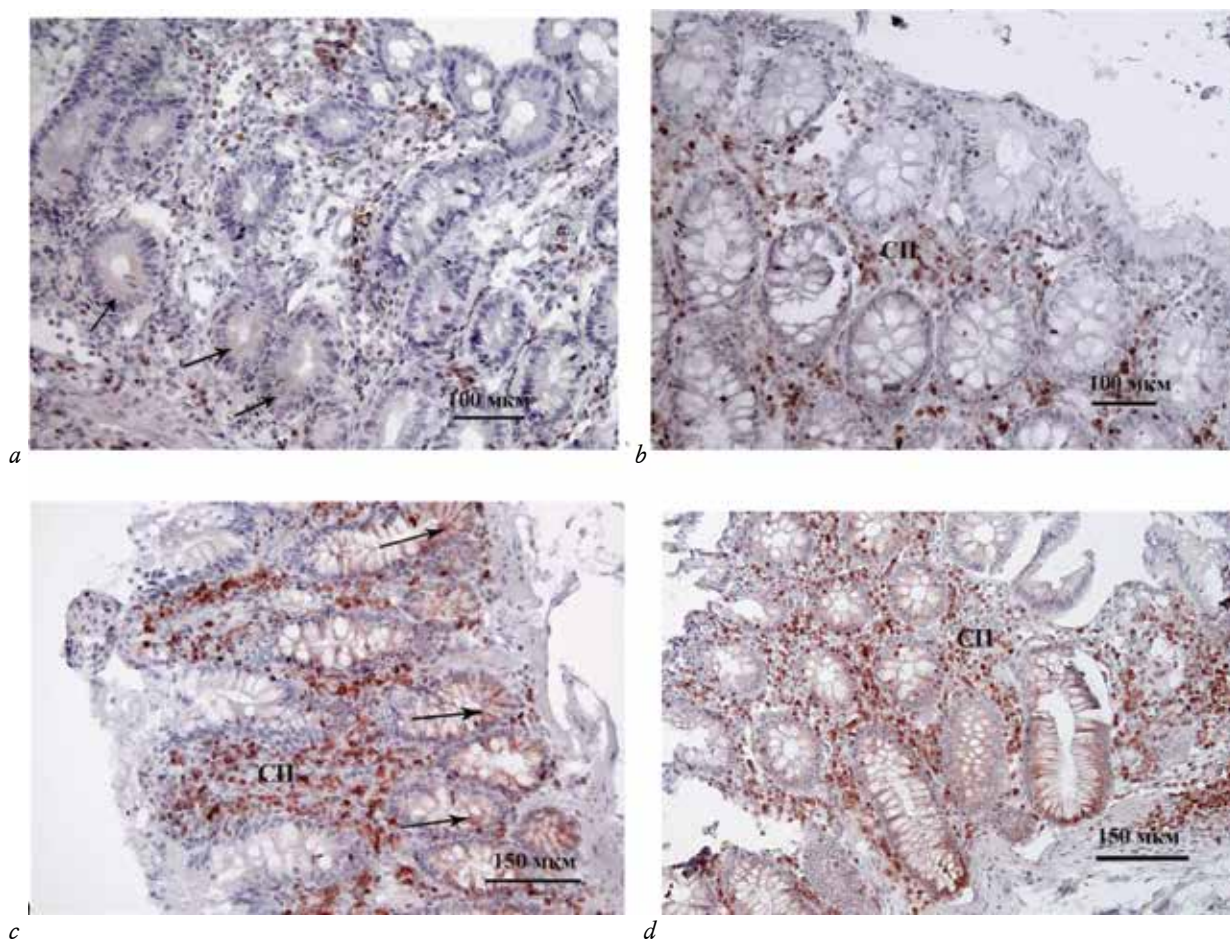


Рис. 3. Виллин-, Bcl-2-, p53-, PUMA-иммунореактивные клетки слизистой оболочки ободочной кишки при язвенном колите: *a* – слабая экспрессия виллина в энтероцитах (стрелки); *b* – маркируется небольшое количество Bcl-2-иммунопозитивных клеток СП; *c* – активная экспрессия p53 в энтероцитах (стрелки) и клетках собственной пластинки (СП); *d* – PUMA-позитивные клетки локализуются преимущественно в СП. Препараты докрашены гематоксилином

Fig. 3. Willin-, Bcl-2-, p53-, PUMA-immunoreactive cells of the mucosa of the colon with ulcerative colitis: *a* – weak expression of villin in enterocytes (arrows); *b* – a small number of Bcl-2 immunopositive cells of the intrinsic plate (SP) is labeled; *c* – active expression of p53 in enterocytes (arrows) and cells of self-lamina; *d* – PUMA-positive cells are localized mainly in their own plate. Specimens are stained with hematoxylin

Количественный анализ показал дифференцированный характер распределения маркированных клеток в разных отделах слизистой оболочки. При этом количество клеток, экспрессирующих p53/PUMA, значительно превалирует над численностью клеток, экспрессирующих виллин/Bcl-2 (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе установлены динамика экспрессии про- и антиапоптотических факторов и их взаимосвязь с комплексом морфологических изменений в стенке тонкой и толстой кишки при болезни Крона и язвенном колите. Морфологические и иммуногистохимические данные по ис-

следованию аутопсийного и биопсийного материала свидетельствуют об идентичности изменений в слизистой оболочке кишечника при ЯК и БК. Это позволяет предполагать общие механизмы патоморфогенеза ВЗК, по-видимому, аутоиммунного происхождения [7–9].

Хроническое неинфекционное воспаление кишечника характеризуется повышенным апоптозом энтероцитов. Количественная оценка исследованных маркеров в аутопсийном и биопсийном материале продемонстрировала примерно сходные результаты. Установленный факт, с одной стороны, указывает на минимальные посмертные изменения исследованных тканей, а с другой – на одинаковую вовлеченность регуляторных молекул в патогенез ВЗК.

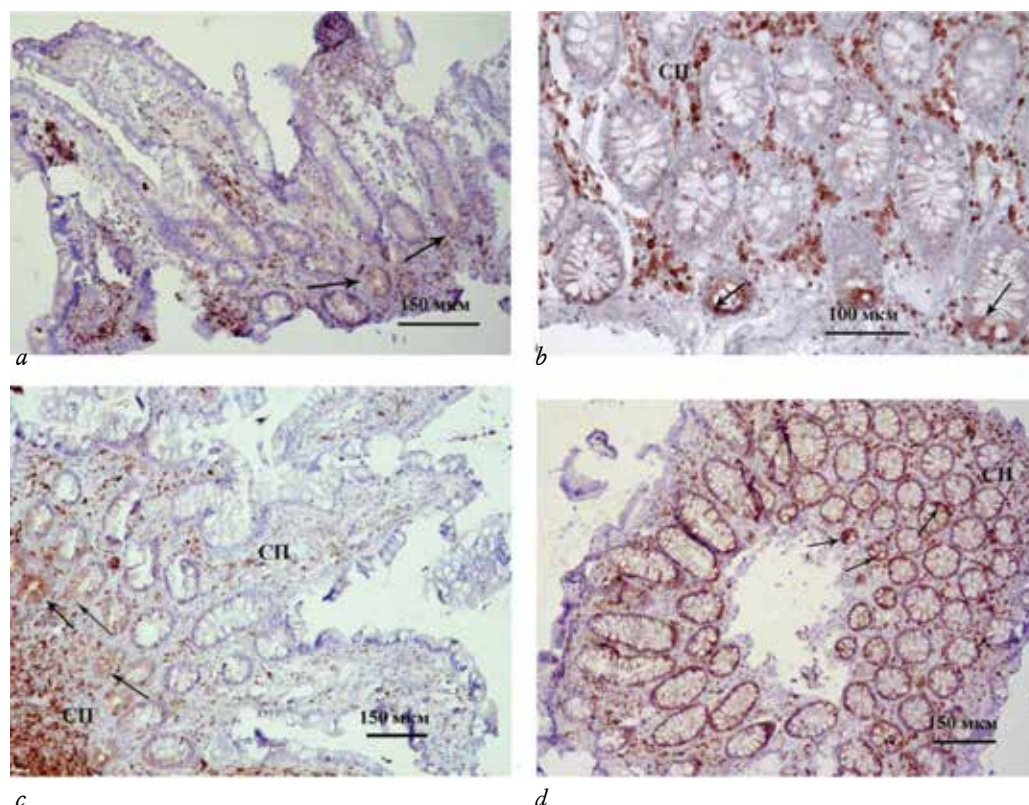


Рис. 4. Виллин-, Bcl-2-, p53-, PUMA-иммунореактивные клетки слизистой оболочки подвздошной и ободочной кишки при болезни Крона: *a* – слабая экспрессия виллина в энтероцитах крипт подвздошной кишки (стрелки); *b* – редкие Bcl-2-позитивные энтероциты (стрелки) и клетки СП подвздошной кишки; *c* – p53-иммунореактивные клетки эпителия (стрелки) и СП подвздошной кишки; *d* – PUMA-реактивные энтероциты (стрелки) и клетки СП ободочной кишки. Препараты докрашены гематоксилином

Fig. 4. Willin-, Bcl-2-, p53-, PUMA-immunoreactive cells of the ileum and colon of the Crohn's disease: *a* – weak expression of villin in enterocytes of ileum crypt (arrows); *b* – rare Bcl-2-positive enterocytes (arrows) and cells of the own plate (SP) of the ileum; *c* – p53-immunoreactive cells of the epithelium (arrows) and intrinsic plate of the ileum (SP); *d* – PUMA-reactive enterocytes (arrows) and cells of the own plate of the colon. Specimens are stained with hematoxylin

Т а б л и ц а

Плотность виллин-, Bcl-2-, p53-, PUMA-иммунореактивных эпителиальных клеток в 0,01 мм ² слизистой оболочки кишечника, $M \pm m$									
Маркер	Материал	Контроль $n = 20$				БК $n = 17$	ЯК $n = 43$		
		ПК $n = 8$	ВО $n = 4$	ПО $n = 5$	НО $n = 3$	ПК $n = 17$	ВО $n = 12$	ПО $n = 14$	НО $n = 17$
Виллин	аутопсия	$8,7 \pm 1,7$	$12,6 \pm 1,4$	$9,3 \pm 1,3$	$9,6 \pm 1,3$	$3,1 \pm 0,7^*$	$4,8 \pm 1,3^*$	$2,5 \pm 1,9^*$	$3,8 \pm 1,8^*$
	биопсия	–	–	–	–	$2,7 \pm 0,5\blacklozenge$	$2,7 \pm 0,4\blacksquare$	$1,9 \pm 0,4\blacksquare$	$2,3 \pm 0,2\blacksquare$
Bcl-2	аутопсия	$18,0 \pm 2,7$	$15,4 \pm 3,3$	$13,7 \pm 2,3$	$21,0 \pm 3,4$	$5,2 \pm 1,6^*$	$1,9 \pm 0,3^*$	$5,0 \pm 2,2^*$	$1,8 \pm 0,3^*$
	биопсия	–	–	–	–	$3,3 \pm 0,4\blacklozenge$	$1,7 \pm 0,2\blacksquare$	$2,7 \pm 0,5\blacksquare$	$1,3 \pm 0,2\blacksquare$
p53	аутопсия	$5,3 \pm 0,8$	$7,2 \pm 1,3$	$7,6 \pm 1,4$	$3,2 \pm 0,3$	$25,1 \pm 8,3^*$	$26,1 \pm 1,7^*$	$22,1 \pm 1,9^*$	$24,2 \pm 5,2^*$
	биопсия	–	–	–	–	$27,3 \pm 2,4\blacklozenge$	$36,1 \pm 4,7\blacksquare$	$31,2 \pm 3,4\blacksquare$	$23,2 \pm 3,8\blacksquare$
PUMA	аутопсия	$3,0 \pm 0,3$	$6,1 \pm 1,2$	$4,6 \pm 0,7$	$6,6 \pm 1,3$	$28,2 \pm 1,8^*$	$18,9 \pm 4,1^*$	$21,7 \pm 1,9^*$	$18,3 \pm 6,2^*$
	биопсия	–	–	–	–	$21,8 \pm 3,3\blacklozenge$	$26,5 \pm 4,6\blacksquare$	$19,3 \pm 2,7\blacksquare$	$28,3 \pm 4,6\blacksquare$

П р и м е ч а н и е. ПК – подвздошная кишка, ВО – восходящая ободочная кишка, ПО – поперечная ободочная кишка, НО – нисходящая ободочная кишка. * отличие от величины соответствующего показателя в группе «Контроль» статистически значимо при $p < 0,05$. $\blacklozenge$ отличие от величины соответствующего показателя в группе «БК» (аутопсия) статистически значимо при $p < 0,05$. $\blacksquare$ отличие от величины соответствующего показателя в группе «ЯК» (аутопсия) статистически значимо при $p < 0,05$.

Во всех исследованных случаях отмечается снижение численности villin-иммунопозитивных клеток и их способности нарабатывать Bcl-2. В энтероцитах villin ассоциирован с цитоскелетом микроворсинок и выступает основным регуляторным фактором поддержания целостности актиновых микрофиламентов [6, 10]. При апоптозе возникает реорганизация актина, который становится мишенью каспазы-3. В результате запуска процесса происходят распад актиновых филаментов и апоптотическая фрагментация мембран [11]. Уменьшение количества villina предрасполагает к апоптозу кишечного эпителия с последующим развитием хронического воспаления [6, 12].

Эпителиальные клетки слизистой оболочки кишечника постоянно обновляются. Этот процесс включает миграцию клеток из кишечных крипт к верхушке ворсинок. Наибольшая экспрессия villina наблюдается на апикальном домене эпителия, указывая на полярность. Морфологическая потеря полярности клетками кишечного эпителия в случаях отсутствия villina является одним из наиболее значительных индикаторов дисплазии и неоплазии [9, 13].

Таким образом, иммуноцитохимическую экспрессию villina можно рассматривать как показатель устойчивости энтероцитов к инициирующим апоптоз факторам. По нашим данным, во всех исследованных случаях ВЗК плотность p53- и PUMA-иммунореактивных клеток примерно одинакова, что может указывать на однотипное участие апоптоза в патоморфогенезе этих заболеваний. Обнаруженный в данном исследовании комплекс морфологических признаков воспаления слизистой оболочки кишечника с преобладанием в инфильтрате лимфоцитов, плазмочитов и тучных клеток указывает на наличие иммунного компонента. Разнообразную клеточную инфильтрацию дополняет, очевидно, экспрессия провоспалительных цитокинов, в частности TNF, что способствует хронизации процесса и усугублению структурных изменений стенки кишечника, приводящих к дисплазии и неоплазии [14–16].

Патоморфогенез рецидивирующего воспаления и его хронизация сопровождаются закономерными изменениями интенсивности и характера апоптоза [17, 18]. Известно, что при активной экспрессии Bcl-2 в клетках непораженных отделов толстого и тонкого кишечника отмечается низкая активность проапоптотической молекулы p53 [1, 14]. При воспалении слизистой оболочки, напротив, резко возрастает экспрессия p53 и достоверно снижается экспрессия Bcl-2, это неизменно вызывает высокую апоптотическую ак-

тивность клеток слизистой оболочки кишечника, что подтвердили наши исследования. Кроме того, активированный p53 способен репрессировать протоонкоген Bcl-2, а Bcl-2, в свою очередь, угнетает проапоптотическую функцию p53 [8, 19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патоморфогенез болезни Крона и язвенного колита связан с нарушением баланса пролиферации и запрограммированной гибели клеток. Хронизация рецидивирующего воспаления сопровождается увеличением экспрессии проапоптотических факторов p53 и PUMA и снижением антиапоптотических факторов Bcl-2 и villina в слизистой оболочке кишечника. Регуляция экспрессии этих факторов может представлять мишень для прецизионной фармакологической коррекции данных нарушений.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Матвеева Н.Ю. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации. Матвеев Ю.А. – обоснование рукописи, анализ и интерпретация данных. Калиниченко С.Г. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации. Едранов С.С. – обоснование рукописи, анализ и интерпретация данных. Каминский Ю.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследования одобрено междисциплинарным комитетом по этике ТГМУ (протокол № 8 от 27.04.2015 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Günther C., Neumann H., Neurath M., Becker C. Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*. 2013; 62 (7): 1062–1071. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301364.
- Falkhoury M., Negruli R., Mooranean A., Al-Salami H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments falami. *J. of Inflame. Research*. 2014; 7: 113–120. DOI: 10.2147/JIR.S65979.

3. Dagenais M., Douglas T., Saleh M. Role of programmed necrosis and cell death in intestinal inflammation. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2014; 30 (6): 566–575. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000117.
4. Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе. *Морфология.* 2007; 131 (2): 16–28. [Kalinichenko S.G., Matveeva N.Ju. Morphological characteristics of apoptosis and its significance in neurogenesis. *Morfologiya – Neuroscience and Behavior Physiology.* 2007; 131 (2): 16–28 (in Russ.)].
5. Матвеева Н.Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2003; 4: 12–16. [Matveeva N.Ju. Apoptosis: morphologic features and molecular mechanisms. *Tibookceanskij medicinskij zhurnal – Pacific Medical Journal.* 2003; 4: 12–16 (in Russ.)].
6. Wang Y., Kamalakkannan S., Siddigi M., Sudeep P., Tomar A., Khurana S. A novel role for villin in intestinal epithelial cell survival. *The J. of Biology Chemistry.* 2008; 283 (14): 9454–9464. DOI:10.1074/jbc.M707962200.
7. Fonsca-Gamarillo G., Yamamoto-Furusho J. Immunoregulatory pathways involved in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015; 21 (9): 2188–2193. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000477.
8. Billmeier U., Dieterich W., Neurath M.F., Atreya R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22 (42): 9300–9313.
9. Seidelin J. Regulation of antiapoptotic and cytoprotective pathways in colonic epithelial cells in ulcerative colitis. *Scand J. Gastroenterol.* 2016; 51: 1–29. DOI: 10.3109/00365521.2016.1101245.
10. Christophi G.P., Rong R., Holtzapple P.G., Massa P.T., Landas S.K. Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Diseases.* 2012; 18 (12): 2342–2356. DOI: 10.1002/ibd.22957.
11. Chen L., Park S.M., Turner J.R., Peter M.E. Cell death in the colonic epithelium during inflammatory bowel diseases: CD95/Fas and beyond. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010; 16 (6): 1071–1076. DOI: 10.1002/ibd.21191.
12. Nunes T., Bernardazzi C., de Souza H.S. Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 218493. DOI: 10.1155/2014/218493.
13. Каминский Ю.В., Матвеев Ю.А., Матвеева Н.Ю. Патоморфогенез идиопатических колитов. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2016; 3: 42–45. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2016.3.42–45. [Kaminskij Ju.V., Matveev Ju.A., Matveeva N.Ju. Pathomorphogenesis of idiopathic colitis. *Tibookceanskij medicinskij zhurnal – Pacific Medical Journal.* 2016; 3: 42–45 (in Russ.)].
14. Dirisina R., Katzman R., Goretsky T., Managlia E., Mittal N., Williams D., Qiu W., Yu J., Handel N., Zhang L., Barrett T. p53 and PUMA independently regulate apoptosis of intestinal epithelial cells in patients and mice with colitis. *Gastroenterol.* 2011; 141 (3): 1036–1045. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.05.032.
15. Qin W., Bin Wu, Wang X., Buchanan M., Regueiro M., Hartman D., Schoen R., Yu J., Zhang L. Puma-mediated intestinal epithelial apoptosis contributes to ulcerative colitis in human and mice. *The J. of Clinical Investigation.* 2011; 121 (5): 1722–1732. DOI: 10.1172/JCI42917.
16. Ślebioda T., Kmiec Z. Tumor necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators of Inflammation.* 2014; 2014: 325129. DOI: 10.1155/2014/325129.
17. Dubikov A.I., Kalinichenko S.G. Small molecules regulating apoptosis in the synovium in rheumatoid arthritis. *Scand J. Rheumatol.* 2010; 39 (5): 368–372. DOI: 10.3109/03009741003742771.
18. Popp C., Nichita L., Voiosu T., Bastian A., Cioplea M., Micu G., Pop G., Sticlaru L., Bengus A., Voiosu A., Mateescu R.B. Expression profile of p53 and p21 in large bowel mucosa as biomarkers of inflammatory-related carcinogenesis in ulcerative colitis. *Disease Markers.* 2016; 2016: 3625279. DOI: 10.1155/2016/3625279.
19. Horvath B., Liu G., Wu X., Lai K., Shen B., Liu X. Overexpression of p53 predicts colorectal neoplasia risk in patients with inflammatory bowel disease and mucosa changes indefinite for dysplasia. *Gastroenterol. Report.* 2015; 3 (4): 344–349. DOI: 10.1093/gastro/gov022.

Поступила в редакцию 06.06.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Матвеева Наталья Юрьевна, д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, ТГМУ, г. Владивосток.

Матвеев Юрий Андреевич, ассистент кафедры патологической анатомии и судебной медицины, ТГМУ, г. Владивосток.
Калиниченко Сергей Георгиевич, д-р мед. наук, профессор, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, ТГМУ, г. Владивосток.

Едранов Сергей Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, ТГМУ, г. Владивосток.

Каминский Юрий Валентинович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической анатомии и судебной медицины, ТГМУ, г. Владивосток.

(✉) Матвеева Наталья Юрьевна, e-mail: nymatveeva@mail.ru.

УДК 616.34-002-018.7-091.818

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-121-129

For citation: Matveeva N.Yu., Matveev Yu.A., Kalinichenko S.G., Edranov S.S., Kaminskiy Yu.V. The role of apoptosis of enterocytes in inflammatory bowel diseases. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 121–129.

The role of apoptosis of enterocytes in inflammatory bowel diseases

Matveeva N.Yu., Matveev Yu.A., Kalinichenko S.G., Edranov S.S., Kaminskiy Yu.V.

*Pacific State Medical University
2, Ostrakova Av., Vladivostok, 690002, Russian Federation*

ABSTRACT

Purpose. Study the topography of cells, expressing villin, p53, Bcl-2, and PUMA in the intestinal mucosa in the non-infectious colitis.

Materials and methods. We studied the morphology and localization of the immunoreactive markers of apoptosis in small intestine and bowel with ulcerative colitis and Crohn's disease, using the material of 20 autopsies and 40 biopsies.

Results. In the focus of the specific inflammation in the mucosa, we discovered numerous cells, in various degrees expressing anti- and proapoptotic molecules. In the control material, the antiapoptotic factors (villin and Bcl-2) localized mainly in the enterocytes, while the proapoptotic factors (p53 and PUMA) were expressed in the cells of the lamina propria of the mucosa. The reverse correlation between the number of cells expressing p53/PUMA and the villin/Bcl-2 positive cells had been discovered. At the same time proapoptotic molecules were discovered in the enterocytes and in the cells of the lamina propria of intestinal mucosa.

Conclusion. The obtained data points to the important role of apoptosis in pathomorphogenesis of chronic non-infectious intestinal inflammation. The chronization of the process and the nature of the intestinal damage in the UC and CD are connected with balance of the regulative anti- and proapoptotic factors. The cells, expressing those factors, demonstrate the reverse number dependence.

Key words: ulcerative colitis, Crohn's disease, p53, Bcl-2, PUMA, villin, non-infectious inflammation.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the ethics committee under the Pacific State Medical University (Protocol No. 8 of April 27, 2015).

Received 06.06.2017

Accepted 06.02.2018

Matveeva Natalia Yu., DM, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Matveev Yuri A., Assistant, Department Pathology and Forensic Medicine, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Kalinichenko Sergey G., DM, Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Pacific State Medical University, Vladivostok Russian Federation.

Edranov Sergey S., DM, Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Kaminskiy Yuri V., DM, Head of the Department Pathology and Forensic Medicine, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

(✉) Matveeva Natalia Yu., e-mail: nymatveeva@mail.ru.

УДК 616.89-008.454-073.756.8:612.821

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-130–138

Для цитирования: Мельников М.Е., Безматерных Д.Д., Петровский Е.Д., Козлова Л.И., Штарк М.Б., Савелов А.А., Шубина О.С., Натарева К.А. Время реакции в ответ на эмоциональные стимулы (включая фотопортреты с различной мимикой) в ходе фМРТ-исследования лиц с легкой и умеренной депрессией, дистимией. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 130–138.

Время реакции в ответ на эмоциональные стимулы (включая фотопортреты с различной мимикой) в ходе фМРТ-исследования лиц с легкой и умеренной депрессией, дистимией

Мельников М.Е.^{1,2}, Безматерных Д.Д.^{1,2}, Петровский Е.Д.³, Козлова Л.И.^{1,2}, Штарк М.Б.^{1,2}, Савелов А.А.³, Шубина О.С.¹, Натарева К.А.⁴

¹ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики (НИИ МББ) Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12

² Национальный исследовательский Новосибирский государственный университет (НИ НГУ) Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

³ Международный томографический центр (МТЦ) Сибирского отделения (СО) Российской академии наук (РАН) Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а

⁴ Международный институт психологии и психотерапии (МИПП) Россия, 630007, г. Новосибирск, ул. Серебренниковская, 2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – оценить время и содержание реакций на эмоциональные стимулы в процессе фМРТ-исследования у лиц с легким или умеренным депрессивным эпизодом или дистимией.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие группа (21 человек) с диагностированным легким или умеренным депрессивным эпизодом или дистимией (Д) и контрольная группа (21 волонтер) (З), идентичных по полу и возрасту. В двух задачах испытуемые, находясь внутри магнитно-резонансного томографа, воспринимали изображения лиц с различной эмоциональной мимикой. В первой пробе от участников требовалось определить пол людей на портретах, во второй – переживаемые ими эмоции. В третьей задаче предъявлялись изображения, которые нужно было разделить на нравящиеся и не нравящиеся. Ответ давался нажатием одной из двух кнопок. Оценивались время реакции и содержание ответов.

Результаты. По большинству рассчитанных параметров лица с депрессивным эпизодом не отличались от условно здоровых людей. Тем не менее в первой задаче эти испытуемые характеризовались более медленной реакцией на лица с нейтральной мимикой ($3 = (1\,415 \pm 408)$ мс, $\Delta = (1\,878 \pm 850)$ мс; $t = 2,25$; $p < 0,05$) и выражением отвращения ($3 = (1\,183 \pm 310)$ мс, $\Delta = (1\,526 \pm 646)$ мс; $t = 2,20$; $p < 0,05$) и большим стандартным отклонением времени реакции на черты отвращения ($3 = (219 \pm 125)$ мс, $\Delta = (675 \pm 645)$ мс; $t = 3,18$; $p < 0,01$), радости ($3 = (445 \pm 310)$ мс, $\Delta = (836 \pm 579)$ мс; $t = 2,73$; $p < 0,05$), удивления ($3 = (580 \pm 438)$ мс, $\Delta = (1\,043 \pm 785)$ мс; $t = 2,36$; $p < 0,05$), а также на нейтральные портреты ($3 = (487 \pm 416)$ мс, $\Delta = (895 \pm 727)$ мс; $t = 2,23$; $p < 0,05$). Во второй задаче в группе лиц с депрессивным эпизодом большим было стандартное отклонение времени реакции для лиц с безгливой мимикой ($3 = (1\,506 \pm 1\,273)$ мс, $\Delta = (2\,168 \pm 1\,355)$ мс; $U = 131$; $p < 0,05$). Кроме того, эти участники несколько реже выбирали ответ «радость» для характеристики мимики лиц ($3 = (6,8 \pm 1,1)$ мс, $\Delta = (6,0 \pm 0,8)$ мс; $U = 131$; $p < 0,05$).

✉ Мельников Михаил Евгеньевич, e-mail: mikhail-melnikov@mail.ru.

Заключение. Показаны достоверное замедление реакций лиц с легким и умеренным депрессивным эпизодом в контексте «фоновой» обработки эмоциональной экспрессии и их тенденция реже определять мимику как радостную при целенаправленном распознавании чувств других людей. Однако изучение роли этих особенностей в развитии депрессивных расстройств и как диагностических маркеров требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: депрессивный эпизод, распознавание эмоциональной мимики, эмоциональная валентность стимулов, время реакции, эмоции.

ВВЕДЕНИЕ

Ведущие при депрессивных нарушениях клинические проявления тесно связаны с когнитивными особенностями депрессивных больных. Одной из популярных идей в этой области является наличие у пациентов с депрессивными эпизодами предвзятости по отношению к поступающей информации. Согласно этому представлению, лица с депрессивными эпизодами с большей готовностью реагируют на негативные стимулы и с меньшей – на позитивные. Испытуемые с большим депрессивным эпизодом при сниженной способности к распознаванию эмоциональной мимики в целом определяют с высокой точностью даже незначительный оттенок грусти в выражении лица [1], причем эта особая эмпатия к печали может сохраняться и после наступления клинической ремиссии [2].

Данная закономерность наблюдается уже на уровне простейших психических операций, что легло в основу модификации dot-probe test, сравнительно эффективно различающей страдающих аффективными нарушениями в форме депрессивных эпизодов легкой и средней степени, с дистимией и условно здоровых испытуемых. Пациенты непроизвольно более внимательны к грустным лицам, и поэтому быстрее реагируют на стимул, возникающий на их месте [3]. Аналогично в пробах Go-No go с эмоциональным содержанием лица, страдающие большим депрессивным эпизодом, показывают более быстрые реакции, если стимул связан с негативными эмоциями, причем у пациентов в стадии ремиссии эта особенность исчезает [4]. Результаты, свидетельствующие об особом пристрастии испытуемых страдающих депрессивными расстройствами к грустной мимике, получены и несколькими другими исследовательскими группами [5, 6].

При этом в некоторых работах существование этой предвзятости или отрицается полностью [7], или объясняется такими факторами, как проявления тревоги, часто встречающиеся в качестве коморбидных симптомов при депрессивных эпизодах [8]. Заметим, что большинство результатов

в этой области получено на выборках лиц с большим депрессивным эпизодом. Данные о легких и умеренных депрессивных эпизодах (значительно более востребованные в контексте дифференциальной диагностики депрессивных эпизодов, определения групп риска и отслеживания динамики их представителей) немногочисленны.

В ряде исследований время реакции на эмоционально окрашенные изображения, включая лица людей, оцениваются параллельно с проведением фМРТ-исследования [9–16]. Это позволяет получить в дополнение к нейробиологическим данным поведенческие, которые могут быть интерпретированы самостоятельно или использованы в качестве регрессоров при анализе карт активации головного мозга. Результаты части из этих работ показывают, что здоровые испытуемые в подобных заданиях отвечают быстрее [9, 13, 16] или точнее [14], чем лица с депрессией или с ее высоким риском, в других публикациях сообщается об отсутствии достоверных различий [10–12, 15]. В большинстве названных исследований не было получено данных в пользу эмоциональной предвзятости при депрессии [9–13, 16], что указывает на существенное влияние экспериментальной ситуации.

Цель данного исследования – рассмотреть время и точность реакции у лиц с легким депрессивным эпизодом в различных эмоциональных пробах применительно к стандартному набору базовых эмоций, проводимых внутри магнитно-резонансного (МР) томографа. Такая постановка задачи касается описанного выше фундаментального механизма предвзятости в восприятии эмоций, а в прикладном ракурсе может способствовать поиску дополнительных по отношению к данным фМРТ поведенческих маркеров депрессивных расстройств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование является частью проекта по изучению фМРТ-маркеров депрессивной симптоматики и направлено на выявление диагностически значимых поведенческих переменных,

которые могут быть зарегистрированы во время фМРТ-проб и дополнить их данные. В исследовании приняли участие две группы (в каждой – 21 человек). Первая – испытуемые с диагнозом депрессивного эпизода легкой или умеренной степени (F32.0, F32.1 по МКБ-10) или дистимии (F34.1 по МКБ-10), на момент начала исследования не принимавшие антидепрессантов в течение 2 мес и более. В некоторых случаях диагноз был установлен впервые, в других отказ от медикаментозного лечения был собственным желанием участников. Вторую группу составили условно здоровые люди. Для обеих групп критериями исключения были тяжелые соматические и неврологические расстройства, исключавшиеся в ходе предварительного осмотра невролога, стандартные противопоказания к магнитно-резонансной томографии, масса тела более 100 кг и существенно сниженное зрение. Группы были идентичны по половому составу (в обеих по 15 мужчин и 6 женщин), возрасту ($33,8 \pm 8,4$ в контрольной группе, $34,3 \pm 9$ в группе с депрессией, различие статистически недостоверно) и уровню интеллекта по тесту Равена «Прогрессивные матрицы» ($IQ = 106 \pm 16,5$ в контрольной группе, $IQ = 99 \pm 13,7$ в группе с депрессией, различие статистически недостоверно). Исследовательские процедуры проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией, все испытуемые подписали форму информированного согласия перед началом эксперимента.

Исследование проводилось внутри МР-томографа, и его дизайн и особенности предъявления стимулов были оптимизированы для регистрации вызванных фМРТ- и ЭЭГ-ответов, однако нейровизуализационные результаты находятся за пределами рассмотрения работы. Испытуемые видели монитор с помощью косого зеркала, закрепленного на головной катушке. На экран выводились по одному стимулы (фотографии лиц людей или другие изображения). Каждый из них предъявлялся до получения от испытуемых реакции (нажатия на одну из двух кнопок), время на ответ не ограничивалось. Между стимулами участникам демонстрировалось перекрестье для фиксации взгляда в течение 6 с и случайного интервала 0,1–2,5 с. Предъявление стимулов и оценка времени реакции были реализованы при помощи программного комплекса Millisecond Inquisit Lab.

Каждая задача представляла собой одинаковую для всех участников псевдослучайную последовательность из 48 изображений, что было обусловлено необходимостью сокращения времени исследования (суммарно испытуемые проводили

около 1 ч в 3Т МР томографе). В первом случае это были лица людей европеоидной расы из набора Face-Place (стимульный материал – собственность Michael J. Tarr, Center for the Neural Basis of Cognition and Department of Psychology, Carnegie Mellon University, <http://www.tarrlab.org/>). Выбор этих изображений обусловлен естественным, не утрированным выражением лиц. На каждой из фотографий был представлен один из восьми видов эмоциональной экспрессии: злость, смущение, отвращение, страх, счастье, грусть, удивление или нейтральное выражение. Таким образом, портреты каждого вида предъявлялись по шесть раз. Испытуемые отвечали на вопрос – кто, на их взгляд, изображен на фотографии: мужчина или женщина – нажатием кнопки в левой или правой руке. Эта инструкция служила маскировке цели исследования – отвлечению участников эксперимента от осознанного восприятия эмоциональной мимики. Под каждым изображением помещалась подсказка, напоминавшая, что именно означает каждая кнопка.

Во второй задаче требовалось установить, какие эмоции испытывает человек на фотографии, выбрав нажатием кнопки из двух вариантов, помещенных под изображением.

В третьей задаче на экране предъявлялись фотографии людей, животных, еды, прочих неодушевленных предметов из коллекции EmoMadrid (группа CEACO: Cerebro, Affecto et Cognition). Отобранные изображения включали в себя как провоцирующие выраженные позитивные или негативные эмоции, так и практически нейтральные. От испытуемых требовалось нажатием кнопки ответить, нравится им то, что изображено на фотографии, или нет. С целью контроля добросовестности и внимательности участников во время выполнения задания по завершении исследования им демонстрировали 24 изображения (12 из предъявленного набора и 12 новых) и просили указать, встречались ли они во время основного эксперимента.

Для каждого испытуемого были рассчитаны средние арифметические и стандартные отклонения времени реакции в трех тестах на изображения всех видов (исключались времена реакции менее 300 мс и излишне долгие, определявшиеся по индивидуальным гистограммам), для первых двух задач – число правильных и неправильных ответов каждого вида, для третьей – число ответов «нравится» и «не нравится».

Математико-статистическая обработка выполнена в программном пакете IBM SPSS Statistics. Проверка нормальности распределения выполнялась с помощью критерия Колмогорова –

Смирнова, для переменных с распределением, значительно отличающимся от нормального, применялся U-критерий Манна – Уитни, для нормально распределенных – t -критерий Стьюдента для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для обсуждения результатов принципиально важной является оценка уровня комплаенса (сотрудничества и выполнения инструкций) испытуемых во время выполнения проб. В первых двух задачах приемлемым доказательством является доля правильных реакций выше вероятности случайного угадывания (50%). В первой пробе здоровые лица дали 98,5% верных ответов, пациенты с депрессией – 97,5%; во второй – 72,7 и 72,5% соответственно. В третьей задаче, строго говоря, нет правильных и неправильных реакций, и за меру внимательности и сотрудничества при ее выполнении была принята способность ис-

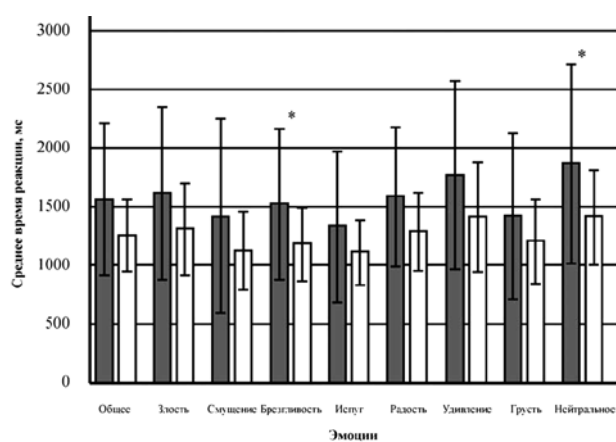


Рис. 1. Различия среднего времени реакции, мс, в первой задаче (распознавание пола): в целом и разделенные по эмоциональным выражениям лиц в группах условно здоровых людей (белые столбцы) и лиц с депрессией или дистимией (серые столбцы). Приведены средние значения и стандартные отклонения. * различия статистически достоверны при $p < 0,05$: для брезгливой ($t = 2,20$; $p < 0,05$) и нейтральной ($t = 2,25$; $p < 0,05$) мимики

Fig. 1. Differences in the average reaction time, ms, in the first task (sex recognition): a whole and divided by emotional expressions of persons in groups of conditionally healthy people (white columns) and persons with depression or dysthymia (gray bars). Average values and standard deviations are given. * the differences are statistically significant at $p < 0.05$: for fastidious ($t = 2.20$; $p < 0.05$) and neutral ($t = 2.25$; $p < 0.05$) facial expressions

пытующих по завершении эксперимента узнать предъявленные им ранее изображения с точностью выше 50%. В этом случае здоровые участники дали 93,1% верных ответов, лица с депрессией – 95,4%. Таким образом, представители обеих групп продемонстрировали вовлеченность в выполнение предложенных задач, что позволяет перейти к анализу данных о показателях времени и точности реакций на эмоциональные стимулы.

Ряд достоверных различий получен в первой задаче (определение пола людей на фотографиях). Участники основной группы значительно медленнее реагировали на брезгливые и нейтральные лица, при этом тренд к большему времени реакции наблюдался вне зависимости от эмоционального выражения на портретах (рис. 1). Также группы разнятся по стандартным отклонениям времени реакции: как и в случае средних значений показатели группы депрессии выше для всех видов эмоций, хотя и не всегда эти различия достоверны (рис. 2).

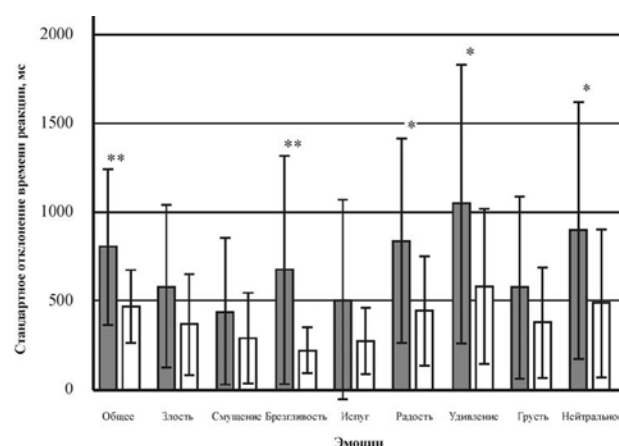


Рис. 2. Различия стандартного отклонения времени реакции, мс, в первой задаче (распознавание пола): в целом и разделенные по эмоциональным выражениям лиц в группах условно здоровых людей (белые столбцы) и лиц с депрессией или дистимией (серые столбцы). Приведены средние значения и стандартные отклонения. * различия статистически достоверны при $p < 0,05$; **при $p < 0,01$: по общему показателю ($t = 3,15$; $p < 0,01$), для брезгливой ($t = 3,18$; $p < 0,01$), радостной ($t = 2,73$; $p < 0,05$), удивленной ($t = 2,36$; $p < 0,05$) и нейтральной ($t = 2,23$; $p < 0,05$) мимики

Fig. 2. Differences in the standard deviation of the reaction time, ms, in the first task (gender recognition): a whole and divided by the emotional expressions of individuals in groups of conditionally healthy people (white columns) and those with depression or dysthymia (gray bars). Average values and standard deviations are given. *the differences are statistically significant at $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$: for the general index ($t = 3.15$; $p < 0.01$), for fastidious ($t = 3.18$; $p < 0.01$), joyful ($t = 2.73$; $p < 0.05$), surprised ($t = 2.36$; $p < 0.05$) and neutral ($t = 2.23$; $p < 0.05$) facial expressions

Во втором тесте, в котором требовалось определять вид эмоции на фотографии, депрессивные испытуемые достоверно отличались только большей вариативностью времени реакции на предъявление портретов с мимикой отвращения ($(1\,506 \pm 1\,273)$ мс у здоровых лиц, $(2\,168 \pm 1\,355)$ мс у лиц с депрессией; $U = 131$; $p < 0,05$). Также во втором тесте зафиксировано единственное межгрупповое различие, касающееся содержания ответов. Участники основной группы значимо реже выбирали ответ «радость» ($6,0 \pm 0,8$ против $6,8 \pm 1,1$ у здоровых людей; $U = 131$; $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В целом полученные данные о времени реакции участников эксперимента не согласуются с идеей эмоциональной предвзятости. Средние значения времени реакции на изображения лиц с различной эмоциональной мимикой у испытуемых с депрессией повышены достаточно равномерно, а наибольшие различия между группами относятся не к радостной и грустной мимике, а к нейтральной и брезгливой. То же касается и вариативности темпа выполнения задания. Эти результаты наталкивают на мысль о том, что изменения времени реакции неспецифичны относительно эмоциональной модальности лиц на портретах или других изображениях и относятся скорее на счет когнитивных, нежели эмоциональных процессов.

Полученные данные позволяют предполагать, что для испытуемых с депрессией в подобных пробах характерен медленный и изменчивый темп в целом, а конкретное эмоциональное содержание стимула только расставляет нюансы в этих различиях. Заметим, что маскировка цели исследования с помощью инструкции, обращающей внимание на пол лиц на фотографиях, позволила получить значительно более выраженные межгрупповые различия, чем это удалось в случае явного предъявления задачи на эмпатию (а тест с категоризацией изображений на приятные и неприятные не выявил никакой достоверной разницы между исследованными группами).

Результаты работы подтверждают положение дел, обозначенное в публикациях предшественников: реакции лиц с депрессией в целом замедлены, но соотносить это замедление с переработкой каких-то конкретных видов эмоциональных стимулов затруднительно [9–13, 16]. Это обстоятельство может интерпретироваться двояко: как аргумент против идеи эмоциональной предвзятости и как указание на неадекватность ситуации фМРТ-исследования для демонстрации этого фе-

номена. Тем не менее общее изменение времени реакции пациентов может рассматриваться как самостоятельный результат, согласующийся с современным пониманием симптоматики депрессии и не являющийся эпифеноменом процедуры исследования.

В пользу тотального, неспецифичного характера задержки ответа при депрессивных расстройствах говорят и данные физиологии. В частности, в тесте Go-No go с эмоциональной нагрузкой у лиц с биполярным аффективным расстройством классические компоненты вызванных потенциалов P80, N120, VPP отличаются увеличенной латентностью [17]. При определении эмоций в явном виде испытуемые с легким депрессивным эпизодом тратят больше времени на обработку эмоциональной информации (по данным фиксации диаметра зрачка) [18]. Аналогичным образом участники с депрессивным эпизодом дольше (отслеживалось направление взгляда) всматриваются в эмоциональные лица вне зависимости от характера экспрессии по сравнению со здоровыми людьми [19]. Таким образом, увеличение задержки от предъявления стимула до ответа при депрессии может происходить в связи с изменением ранних (вероятно, перцептивных зрительных) этапов когнитивной обработки сигнала.

Не будем забывать, что еще одной причиной диссонанса между представленными данными и идеей эмоциональной предвзятости может быть то, что эта особенность распространяется на специфическую группу пациентов. Например, Markela-Lerenc et al. (2011) утверждают, что дисбаланс в восприятии позитивных и негативных эмоций характерен не собственно для депрессивного эпизода, а для ассоциированных с ним тревожных проявления [8]. А в недавно реализованной программе из пяти экспериментов испытуемые как с большим депрессивным эпизодом, так и с легкой депрессивной симптоматикой не демонстрировали феномена предвзятости в тестах, выполнявшихся на стыке когнитивных и эмоциональных процессов [7]. Таким образом, исследование может указывать на то, что эмоциональная предвзятость не универсальна для всех форм аффективных расстройств.

Тем не менее часть данных согласуется с представлением о специфичной обработке некоторых видов эмоций у представителей группы пациентов. Речь идет о существенной разнице во времени ответа для нейтральной мимики и в частоте ответов «радость» при определении вида экспрессии на портрете. Нейтральные лица могут представлять для пациентов с депрессией осо-

бую проблему. Leppanen et al. (2004), в работе которых участники с депрессивным эпизодом медленнее и менее точно определяли нейтральную мимику, предположили, что представители этой группы чаще усматривают в ней оттенок грусти [20], проявляя чрезмерную эмпатию. Эта идея подтверждена крупно выборочным исследованием лиц с депрессивным темпераментом [21], а также на материале пациентов с большим депрессивным эпизодом [22] и в систематическом обзоре литературы [23].

Gollan et al. (2008) также отмечают склонность здоровых людей ошибочно интерпретировать выражение лиц с не до конца ясной экспрессией как счастливое [22], а Surguladze et al. (2004) – тенденцию, согласно которой испытуемые с депрессивным эпизодом не идентифицируют как счастливые лица с небольшой интенсивностью этой эмоции [24], что в представленном исследовании выражено в большем количестве ответов «радость», данных здоровыми испытуемыми по сравнению с пациентами.

Наконец, стоит сказать о том, что обнаруженные паттерны различия в частоте ответов «радость» и времени реакции в ответ на конкретные варианты эмоциональной мимики оказались достоверными только при $p < 0,05$, и вряд ли являются достаточно надежными для использования в диагностических целях. Кроме того, выполнение задач внутри МР-томографа может быть фактором, неодинаково действующим на исследуемые группы, и таким образом искажающим межгрупповые различия. Это обстоятельство требует осторожности в интерпретации данных в контексте эмоциональной предвзятости в целом. Тем не менее важными видятся дальнейшее исследование этих потенциальных маркеров и сравнение их по предсказательной силе с уже существующими, а также уточнение нейрофизиологической природы выявленных различий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование позволило сделать следующие выводы:

Из проведенных проб наиболее выраженные различия показателей времени реакции между группами условно здоровых людей и лиц с депрессивными расстройствами обнаружены в тесте с предъявлением эмоциональных фотопортретов при условии маскировки цели эксперимента (за счет инструкции).

В этом тесте пациенты демонстрируют достоверно большее среднее время реакции при вос-

приятии нейтральной и безразличной мимики и большую изменчивость времени реакции в ситуации наблюдения безразличной, радостной, удивленной и нейтральной эмоциональной экспрессии. Полученные данные свидетельствуют об общем снижении темпа (и увеличении его вариативности) выполнения задачи у лиц с депрессией и, вероятно, относятся не к эмоциональной, а к когнитивной плоскости обработки информации.

В ситуации целенаправленного определения характера эмоциональной мимики участники с депрессивными расстройствами реже идентифицировали предъявляемые фотопортреты как радостные.

При классификации изображений на приятные и неприятные пациенты демонстрируют поведенческие показатели, достоверно не отличающиеся от продемонстрированных здоровыми людьми.

Заметим, что роль выявленных особенностей как маркеров депрессивных расстройств и их соотношение с нейрофизиологическими переменными требует дополнительного изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда, проект № 16–15–00183.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено этическим комитетом Института молекулярной биологии и биофизики (протокол № 2/2012).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gollan J.K., McCloskey M., Hoxha D., Coccato E.F. How do depressed and healthy adults interpret nuanced facial expressions? *Journal of Abnormal Psychology*. 2010; 119 (4): 804–810. DOI: 10.1037/a0020234.
2. Biyik U., Keskin D., Oguz K. et al. Facial emotion recognition in remitted depressed women. *Asian Journal of Psychiatry*. 2015; 17: 111–113. DOI: 10.1016/j.ajp.2015.08.001.
3. Peckham A.D., McHugh R.K., Otto M.W. A meta-analysis of the magnitude of biased attention in depression. *Depression and Anxiety*. 2010; 27 (12): 1135–1142. DOI: 10.1002/da.20755.
4. Maalouf F.T., Clark L., Tavitiyan L. et al. Bias to negative emotions: A depression state-dependent marker in adolescent major depressive disorder. *Psychiatry Research*. 2012; 198 (1): 28–33. DOI: 10.1016/j.psychres.2012.01.030.

5. Fritzsche A., Dahme B., Gotlib I.H. et al. Specificity of cognitive biases in patients with current depression and remitted depression and in patients with asthma. *Psychological Medicine*. 2009; 40 (5): 815. DOI: 10.1017/S0033291709990948.
6. Milders Bell S., Platt J. et al. Stable expression recognition abnormalities in unipolar depression. *Psychiatry Research*. 2010; 179 (1): 38–42. DOI: 10.1016/j.psychres.2009.05.015.
7. Cheng P., Preston S.D., Jonides J. et al. Evidence against mood-congruent attentional bias in Major Depressive Disorder. *Psychiatry Research*. 2015; 230 (2): 496–505. DOI: 10.1016/j.psychres.2015.09.043.
8. Markela-Lerenc J., Kaiser S., Götz T. et al. Attentional Bias in Depressive Patients and the Moderating Effect of Concurrent Anxiety. *Psychopathology*. 2011; 44 (3): 193–200. DOI: 10.1159/000319370.
9. Arnone D., McKie S., Elliott R. et al. Increased amygdala responses to sad but not fearful faces in major depression: relation to mood state and pharmacological treatment. *American Journal of Psychiatry*. 2012; 169 (8): 841–850. DOI: 10.1176/appi.ajp.2012.11121774.
10. Bermpohl F., Walter M., Sajon B. et al. Attentional modulation of emotional stimulus processing in patients with major depression – alterations in prefrontal cortical regions. *Neuroscience Letters*. 2009; 463 (2): 108–113. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.07.061.
11. Demenescu L.R., Renken R., Korteckaas R. et al. Neural correlates of perception of emotional facial expressions in out-patients with mild-to-moderate depression and anxiety. A multicenter fMRI study. *Psychological Medicine*. 2011; 41 (11): 2253–2264. DOI: 10.1017/S0033291711000596.
12. Greening S.G., Osuch E.A., Williamson P.C., Mitchell D.G. Emotion-related brain activity to conflicting socio-emotional cues in unmedicated depression. *Journal of Affective Disorders*. 2013; 150 (3): 1136–1141. DOI: 10.1016/j.jad.2013.05.053.
13. Grimm S., Boesiger P., Beck J. et al. Altered negative BOLD responses in the default-mode network during emotion processing in depressed subjects. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34 (4): 932–943. DOI: 10.1038/npp.2008.81.
14. Miskowiak K.W., Glerup L., Vestbo C. et al. Different neural and cognitive response to emotional faces in healthy monozygotic twins at risk of depression. *Psychological Medicine*. 2015; 45 (7): 1447–1458. DOI: 10.1017/S0033291714002542.
15. Smith R., Allen J.J., Thayer J.F., Lane R.D. Altered functional connectivity between medial prefrontal cortex and the inferior brainstem in major depression during appraisal of subjective emotional responses: A preliminary study. *Biological Psychology*. 2015; 108: 13–24. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2015.03.007.
16. Surguladze S., Brammer M.J., Keedwell P. et al. A differential pattern of neural response toward sad versus happy facial expressions in major depressive disorder. *Biological Psychiatry*. 2005; 57 (3): 201–209. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.10.028.
17. Degabriele R., Lagopoulos J. Delayed early face processing in bipolar disorder. *NeuroReport*. 2012; 23 (3): 152–156. DOI: 10.1097/wnr.0b013e32834f218c.
18. Siegle G.J., Granholm E., Ingram R.E., Matt G.E. Pupillary and reaction time measures of sustained processing of negative information in depression. *Biological Psychiatry*. 2001; 49 (7): 624–636. DOI: 10.1016/S0006-3223(00)01024-6.
19. Isaac L., Vrijns J.N., Rinck M. et al. Shorter gaze duration for happy faces in current but not remitted depression: Evidence from eye movements. *Psychiatry Research*. 2014; 218 (1–2): 79–86. DOI: 10.1016/j.psychres.2014.04.002.
20. Leppänen J.M., Milders M., Bell J.S. et al. Depression biases the recognition of emotionally neutral faces. *Psychiatry Research*. 2004; 128 (2): 123–133. DOI: 10.1016/j.psychres.2004.05.020.
21. Maniglio R., Gusciglio F., Lofrese V. et al. Biased processing of neutral facial expressions is associated with depressive symptoms and suicide ideation in individuals at risk for major depression due to affective temperaments. *Comprehensive Psychiatry*. 2014; 55 (3): 518–525. DOI: 10.1016/j.comppsy.2013.10.008.
22. Gollan J.K., Pane H.T., McCloskey M.S., Coccaro E.F. Identifying differences in biased affective information processing in major depression. *Psychiatry Research*. 2008; 159 (1–2): 18–24. DOI: 10.1016/j.psychres.2007.06.011.
23. Bourke C., Douglas K., Porter R. Processing of facial emotion expression in major depression: a review. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. 2010; 44 (8): 681–696. DOI: 10.3109/00048674.2010.496359.
24. Surguladze S.A., Young A.W., Senior C. et al. Recognition Accuracy and Response Bias to Happy and Sad Facial Expressions in Patients With Major Depression. *Neuropsychology*. 2004; 18 (2): 212–218. DOI: 10.1037/0894-4105.18.2.212.

Поступила в редакцию 14.12.2016

Утверждена к печати 06.02.2018

Мельников Михаил Евгеньевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, НИИ МББ; ст. науч. сотрудник (НИ НГУ), г. Новосибирск.

Безматерных Дмитрий Дмитриевич, лаборант-исследователь, НИИ МББ; магистрант, НИ НГУ, г. Новосибирск.

Петровский Евгений Дмитриевич, лаборант-исследователь, МТЦ СО РАН, г. Новосибирск.

Козлова Людмила Игоревна, мл. науч. сотрудник, НИИ МББ, науч. сотрудник, НИ НГУ, г. Новосибирск.

Штарк Марк Борисович, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, руководитель отдела, НИИ МББ; зав. лабораторией, НИ НГУ, г. Новосибирск.

Савелов Александр Александрович, канд. физ.-мат. наук, лаборант-исследователь, МТЦ СО РАН, г. Новосибирск.

Шубина Ольга Сергеевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, НИИ МББ, г. Новосибирск.

Натарова Кира Александровна, канд. мед. наук, ст. психотерапевт, МИПП, г. Новосибирск.

(✉) Мельников Михаил Евгеньевич, e-mail: mikhail-melnikov@mail.ru.

УДК 616.89-008.454-073.756.8:612.821

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-121-129

For citation: Mel'nikov M.Ye., Bezmaternykh D.D., Petrovskiy E.D., Kozlova L.I., Shtark M.B., Savelov A.A., Shubina O.S., Natarova K.A. The response time to emotional stimuli (including facial expressions photos) during the fMRI scanning in affective disorders: mild and moderate depression and dysthymic disorder. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 121–129.

The response time to emotional stimuli (including facial expressions photos) during the fMRI scanning in affective disorders: mild and moderate depression and dysthymic disorder

Mel'nikov M.Ye.^{1,2}, Bezmaternykh D.D.^{1,2}, Petrovskiy E.D.³, Kozlova L.I.^{1,2}, Shtark M.B.^{1,2}, Savelov A.A.³, Shubina O.S.¹, Natarova K.A.⁴

¹ Research Institute of Molecular Biology and Biophysics (RIMBB)
2/12, Timakova Str., Novosibirsk, 630117, Russian Federation

² National Research Novosibirsk State University (NR NSU)
2, Pirogova Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

³ International Tomography Center (ITC), Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (SB RAS)
3a, Institutskaya Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

⁴ International Institute of Psychology and Psychotherapy (IIPP)
2, Serebrennikovskaya Str., Novosibirsk, 630007, Russian Federation

ABSTRACT

Objective. Estimation of the response time and accuracy of emotional stimuli during the fMRI task fulfillment in participants suffering from mild to moderate depressive disorder or from dysthymic disorder.

Materials and methods. 21 subjects with mild to moderate depressive disorder or dysthymic disorder (D) participated, and 21 healthy volunteers (H) matched by age and sex ratio were included in the control group. In two fMRI paradigms subjects were observing photos of the faces with different emotional expressions. The first task was to guess the gender of the people on the screen, and the second one was to recognize the emotion experienced by the person in the photo. In the third paradigm participants were sorting different images into pleasant and unpleasant. The subjects responded by pressing one of two buttons. The response time and accuracy were the subjects of analysis.

Results. On the most of the computed parameters patients with depressive disorder did not differ from controls. However, in the first paradigm these subjects demonstrated slower reaction to neutral ($H = (1415 \pm 408)$ ms, $D = (1878 \pm 850)$ ms; $t = 2.25$; $p < 0.05$) and disgusted ($H = (1183 \pm 310)$ ms, $D = (1526 \pm 646)$ ms; $t = 2.20$; $p < 0.05$) expressions, and greater standard deviations of the response time to disgusted ($H = (219 \pm 125)$ ms, $D = (675 \pm 645)$ ms; $t = 3.18$; $p < 0.01$), happy ($H = (445 \pm 310)$ ms, $D = (836 \pm 579)$ ms; $t = 2.73$; $p < 0.05$), surprised ($H = (580 \pm 438)$ ms, $D = (1043 \pm 785)$ ms; $t = 2.36$; $p < 0.05$), and neutral ($H = (487 \pm 416)$ ms, $D = (895 \pm 727)$ ms; $t = 2.23$; $p < 0.05$) faces. On the second stage group of participants with depressive disorder had greater standard deviation of the response time to disgusted portraits

($H = (1\,506 \pm 1\,273)$ ms, $D = (2\,168 \pm 1\,355)$ ms; $U = 131$; $p < 0.05$). Moreover, subjects diagnosed with a depressive disorder less often chose the answer “happy” ($H = (6,8 \pm 1,1)$ ms, $D = (6,0 \pm 0,8)$ ms; $U = 131$; $p < 0.05$) while guessing the emotion in the photo.

Conclusion. Participants diagnosed with mild to moderate depressive disorder or dysthymic disorder perform significantly slower than healthy ones during the “background” processing of the facial expressions and also tend to identify mimic as happy less often than controls while aiming to recognize the feelings of others. However, the role of these features in the progress of depressive disorders and their perspectives as diagnostic markers are subjects for further research.

Key words: depressive disorder, detection of the facial expressions, emotional valence of the stimuli, reaction time, emotions.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The work was carried out through a grant from the Russian Science Foundation, project No. 16-15-00183.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the Research Institute of Molecular Biology and Biophysics (protocol No. 2/2012).

Received 14.12.0.2016

Accepted 06.02.2018

Mel'nikov Mikhail Ye., PhD, Senior Researcher, RIMBB; Senior Researcher, NR NSU, Novosibirsk, Russian Federation.

Bezmaternykh Dmitriy D., Assistant, RIMBB; Student, NR NSU, Novosibirsk, Russian Federation.

Petrovskiy Evgeniy D., Assistant, ITC SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlova L'udmila I., Junior Researcher, RIMBB; Researcher, NR NSU, Novosibirsk, Russian Federation.

Shtark Mark B., DM, Professor, Academician of RAS, Head of the Division, RIMBB; Head of the Laboratory, NR NSU, Novosibirsk, Russian Federation.

Savelov Alexandr A., PhD, Senior Researcher ITC SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Shubina Ol'ga S., PhD, Leading Researcher, RIMBB, Novosibirsk, Russian Federation.

Natarova Kira Alexandrovna, PhD, Senior Psychotherapist, IIPP, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) Mel'nikov Mikhail Ye., e-mail: mikhail-melnikov@mail.ru.

УДК 616-006-073.7:57.086.16:549.731.13-022.532

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-139-148

Для цитирования: Никитин А.А., Науменко В.А., Водопьянов С.С., Гаранина А.С., Федорова Н.Д., Калабай Е.Д., Савченко А.Г., Абакумов М.А., Мажуга А.Г. Изучение эффективности контрастирования различных видов опухолей с использованием кубических наночастиц магнетита. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 139–148.

Изучение эффективности контрастирования различных видов опухолей с использованием кубических наночастиц магнетита

Никитин А.А.^{1, 2}, Науменко В.А.¹, Водопьянов С.С.¹, Гаранина А.С.¹, Федорова Н.Д.¹, Калабай Е.Д.¹, Савченко А.Г.¹, Абакумов М.А.^{1, 3}, Мажуга А.Г.^{2, 4}

¹Национальный исследовательский технологический университет (НИТУ) «МИСиС»
Россия, г. Москва, 119991, Ленинский пр., 4

²Московский государственный университет (МГУ) имени М.В. Ломоносова
Россия, 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1/3

³Российский национальный исследовательский медицинский университет (РНИМУ) имени Н.И. Пирогова
Россия, г. Москва, 117997, ул. Островитянова, 1

⁴Российский химико-технологический университет (РХТУ) имени Д.И. Менделеева
Россия, г. Москва, 125047, Миусская пл., 9

РЕЗЮМЕ

На сегодняшний день магнитно-резонансная томография (МРТ) является одним из ключевых методов диагностики различных заболеваний. Использование различных контрастных агентов на основе магнитных наночастиц способно повысить эффективность диагностики и, как следствие, качество проводимого впоследствии лечения. Наиболее перспективными контрастными агентами являются наночастицы магнетита кубической формы в связи с их высокими показателями релаксивности, а также биосовместимостью и биоразлагаемостью.

Цель настоящей работы – оценить эффективность МРТ-визуализации опухолевых очагов при помощи кубических наночастиц магнетита (КНЧМ).

Материалы и методы. Осуществлен синтез 15 нм КНЧМ, модифицированных биосовместимым сополимером плуроником F127. Полученные КНЧМ и их водные коллоиды были охарактеризованы комплексом физико-химических методов анализа. Затем методом МРТ было проведено исследование эффективности контрастирования различных видов опухолей после внутривенного введения водных коллоидов КНЧМ. Для комплексной оценки полученных результатов в работе использовали три модели опухолей мыши: рак молочной железы 4Т1, рак толстого кишечника СТ-26 и меланома В16. МРТ-исследования проводили до введения частиц, а также через 30 мин, 6 и 24 ч после инъекции в Т2-взвешенном режиме в двух взаимноортогональных проекциях.

Результаты. Анализ полученных результатов показал, что наиболее эффективное накопление частиц выявлено в моделях 4Т1 (100%) и В16 (57%), а в модели СТ-26 эффективность накопления составила 50%, что связано с эффектом проницаемости кровеносных сосудов.

Ключевые слова: наночастицы, магнетит, магнитно-резонансная томография, контрастные агенты, рак молочной железы, рак толстого кишечника, меланома.

ВВЕДЕНИЕ

Магнитно-резонансная томография (МРТ) – метод, широко применяемый в клинике для диагностики различных заболеваний, в том числе онкологических [1, 2]. МРТ позволяет достичь высокого пространственного разрешения и не имеет ограничения по проникновению вглубь тканей. Расширение диагностических возможностей метода необходимо для повышения эффективности лечения онкологических заболеваний. Использование магнитных наночастиц позволяет повысить эффективность визуализации опухолей за счет использования T2- или T1-контрастирующих агентов. Наночастицы оксида железа обладают магнитной сердцевинкой, которая делает их эффективным T2-контрастным агентом. За счет того, что магнитная сердцевина влияет на релаксацию протонов в окружающих тканях, происходит изменение (уменьшение) времени релаксации, которое можно детектировать [3]. Результат этого взаимодействия в T2-взвешенном режиме выглядит как зона затемнения, что дает возможность неинвазивно наблюдать накопление магнитных наночастиц в тканях. Парамагнитные гадолиниевые комплексы уже широко используются в качестве контрастных агентов в МРТ-диагностике. Однако недавние результаты свидетельствуют о том, что происходит накопление гадолиния в головном мозге после проведения процедуры диагностики [4].

Действие гадолиния основано на изменении времени T1-релаксации, что проявляется на МРТ-изображениях в виде зоны просветления. В противоположность гадолинию железо представляет собой один из самых распространенных металлов в живом организме и является важным для различных биологических процессов, включая перенос кислорода с помощью гемоглобина и клеточное дыхание. Таким образом, в настоящее время ведется активная разработка T2- и T1-контрастных агентов для повышения эффективности диагностики опухолей методом МРТ. Чаще всего используются наночастицы магнетита с размером 10–100 нм, характеризующиеся высокой биосовместимостью, низкой токсичностью и выраженными контрастирующими свойствами [5]. Однако параметр T2-релаксации наночастиц зависит от их физико-химических характеристик, таких как размер, форма, химия поверхности и поверхностный заряд [6, 7].

Ранее в работах было показано, что ку-бические наночастицы магнетита превосхо-

дят наночастицы других форм по показателю T₂-релаксации и тем самым являются более предпочтительным контрастным агентом для применения в МРТ-визуализации опухолевых очагов [8, 9]. Чаще всего поверхность магнитных наночастиц модифицируют лигандами на основе полиэтиленгликоля и сополимеров полиэтиленгликоля с полипропиленгликолем для предотвращения слипания наночастиц и их последующей агрегации. В данной работе был использован сополимер плуроник F127, который является клинически одобренным веществом. Гидрофильная «корона», образующаяся вокруг частиц, препятствует их агломерации, адсорбции белков и распознаванию наночастиц ретикулоэндотелиальной системой [10]. Кроме того, контрастирование опухолей зависит не только от физико-химических свойств наночастиц, но и от эффективности их доставки, которая не в последнюю очередь определяется свойствами опухолей. Известно, что накопление частиц при пассивной доставке зависит прежде всего от enhanced permeability and retention (EPR) эффекта – повышенной проницаемости кровеносных сосудов и сниженного лимфатического дренажа [11]. Однако EPR-эффект существенно варьирует как в разных опухолях, так и для разных пациентов [12], что диктует необходимость комплексной оценки контрастирующих свойств кандидатных диагностикумов в различных опухолевых моделях *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Олеиновая кислота (≥99%), хлорид железа (III) (97%), 1-октадецен (≥95,0%), ацетат аммония (99,99%), натриевая соль 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-4',4''-дисульфоновой кислоты (97%), L-аскорбиновая кислота (≥99,0%), плуроник F127, гексан (≥98,0%), 2-пропанол (≥99,8%) и этанол (95%) были приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). Олеат натрия (95%) был приобретен в компании ABCR GmbH & Co. KG (США). Все реагенты использованы без какой-либо дополнительной очистки. Деионизированная вода получена при помощи системы Milli-Q. Линии клеток опухоли молочной железы мышей 4T1 (Cat. No.CRL-2539) и опухоли толстого кишечника мыши CT-26 (Cat. No.CRL-2638) приобретены в американском банке клеточных культур ATCC. Линия меланомы мыши B16-F10 получена из лаборатории иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный меди-

цинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского».

Характеризация наночастиц. Морфология и средний размер полученных наночастиц определены с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-1400 при ускоряющем напряжении 120 кВ. Не менее 1 000 наночастиц проанализированы для оценки их среднего размера. Рентгеноструктурные исследования порошков наночастиц проведены на рентгеновском дифрактометре Rigaku Ultima IV с использованием $\text{CoK}\alpha$ -излучения и графитового монохроматора. Качественный фазовый анализ проведен путем сравнения полученных спектров с базой данных PHAN. Количественный анализ проведен с использованием программ PHAN% и SPECTRUM, разработанных на кафедре физического материаловедения НИТУ «МИСиС» (модификация метода Ритвельда). Измерение магнитных свойств (от -30 до 30 кЭ) проводили на вибромагнитометре измерительного комплекса PPMS-9 фирмы Quantum Design (США). Мёссбауэровский спектр ядер ^{57}Fe зарегистрирован при комнатной температуре с использованием спектрометра MS-1104Em (разработка НИИ физики, г. Ростов-на-Дону) с $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$ -источником излучения. МРТ-исследования проводили с использованием 7T МР-томографа (ClinScan, Bruker, Германия), входящего в состав ЦКП «Медицинские и биотехнологические нанотехнологии». Для получения T2-взвешенных изображений в коронарной плоскости использовалось частотное подавление жира со следующими параметрами последовательности Turbo Spin Echo (TSE): TR/TE = 4000/43 мс, толщина среза 0,5 мм, матрица 288 x 320, FOV = 40 мм. Для T2-ВИ в трансверсальной плоскости: TR/TE = 5110/57 мс, толщина среза 0,5 мм, матрица 288 x 320, FOV = 40 мм. Измерение гидродинамического размера и ξ -потенциала наночастиц было проведено на приборе Malven Zetasizer Nano ZS (угол 173°) с применением He-Ne лазера. Концентрация железа в образцах определялась при помощи стандартного протокола с использованием феррозинового теста [13].

Подготовка культур опухолевых клеток. За 5–7 сут до имплантации аликвоту клеток 4T1 или CT-26, хранящуюся в жидком азоте, размораживали и помещали в культуральный матрас в ростовой среде (RPMI-1640 для 4T1 и CT26; DMEM для B16), содержащей 10% FBS, без добавления антибиотиков при 37°C во влажной атмосфере с 5%-м CO_2 . При достижении плотности монослоя 80–90% культуру пассировали

с коэффициентом рассева 1 : 5–10, используя для диссоциации клеток раствор 0,25%-го трипсина-EDTA (Invitrogen). За 24–48 ч до введения клетки пассировали для обеспечения активной фазы роста клеток в день имплантации.

Моделирование опухолей *in vivo*. В соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства высшего и среднего образования СССР от 13.11.1984 г. № 742) эксперименты проводились на половозрелых самках мышей породы BALB/c, массы от 18 г (возраст 8–10 нед). За день до имплантации клеток будущую зону инъекции выбривали при помощи электробритвы.

В день имплантации монослой опухолевых клеток (4T1, CT-26, B16) диссоциировали при помощи 0,25%-го трипсина-EDTA, трипсин инактивировали ростовой средой, после чего производили подсчет с использованием автоматического счетчика клеток Eve. Клетки осаждали при 300 об/мин в течение 5 мин при 4°C , сливали супернатант и готовили суспензию клеток в фосфатно-солевом буфере с концентрацией клеток 20 млн/мл (для 4T1 и CT26), 60 млн/мл (B16). До момента введения (не более 30 мин) клетки держали при 4°C и тщательно ресуспендировали непосредственно перед имплантацией.

Для обеспечения доступности интратуморальной инъекции клетки опухоли имплантировали подкожно. Для этого 50 мкл суспензии клеток (4T1, CT-26, B16) вводили подкожно в задне-правую область спины (5 мм от линии позвоночника, 15 мм от основания хвоста) с помощью инсулинового шприца на 500 мкл с иглой 32g.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синтез водорастворимых кубических наночастиц магнетита (КНЧМ) (средний размер 15 нм) проводился в соответствии с ранее опубликованной статьей [14]. На рис. 1 представлены ПЭМ-изображение и гистограмма распределения наночастиц по размерам. Видно, что наночастицы имеют ярко выраженную кубическую форму. Кроме того, наночастицы обладают узким распределением по размерам, что подтверждается соответствующей гистограммой.

Для того чтобы однозначно доказать образование чистой фазы магнетита, был зарегистрирован мёссбауэровский спектр полученных наночастиц. Расчет полученного спектра представлен в табл. 1 и полностью подтверждает образование чистой фазы магнетита.

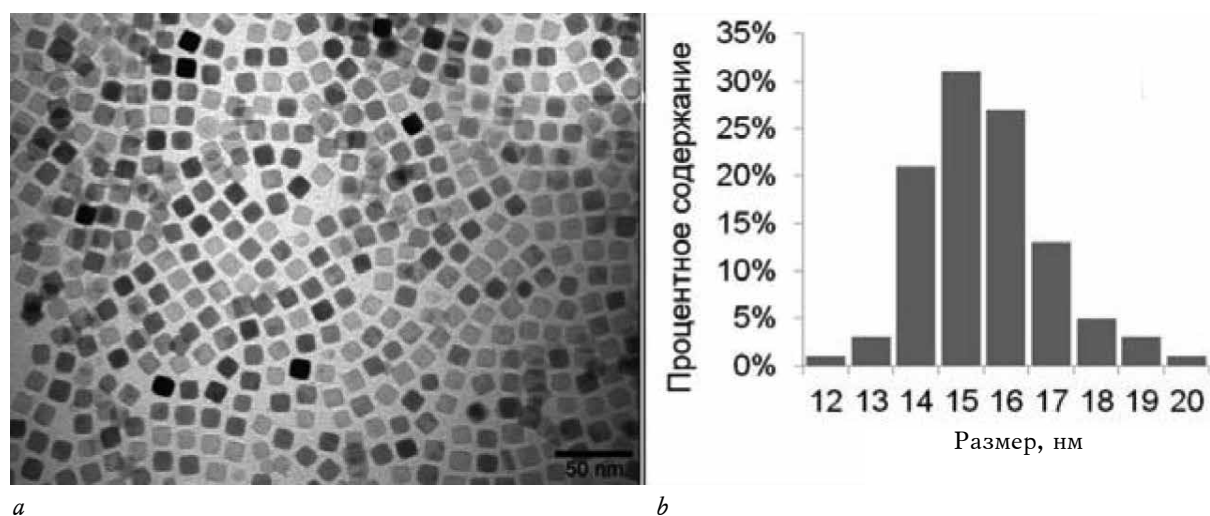


Рис. 1. ПЭМ-изображение (а) и гистограмма распределения по размерам (б) кубических наночастиц магнетита
Fig. 1. TEM image (a) and histogram of the size distribution (b) of cubic magnetite nanoparticles

Для доказательства фазового состава полученных наночастиц был проведен фазово-структурный анализ в совокупности с мёссбауэровской спектроскопией (рис. 2). Максимумы пиков на дифрактограмме при углах 21,28°; 35,10; 41,41; 43,35; 50,48; 62,97; 67,28 и 74,18° соот-

ветствуют плоскостям кристалла (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) и (440) соответственно. Таким образом, положения и относительные интенсивности пиков указывают на чистую фазу магнетита ($a = 8,396$ Å, JCPDS № 19-0629).

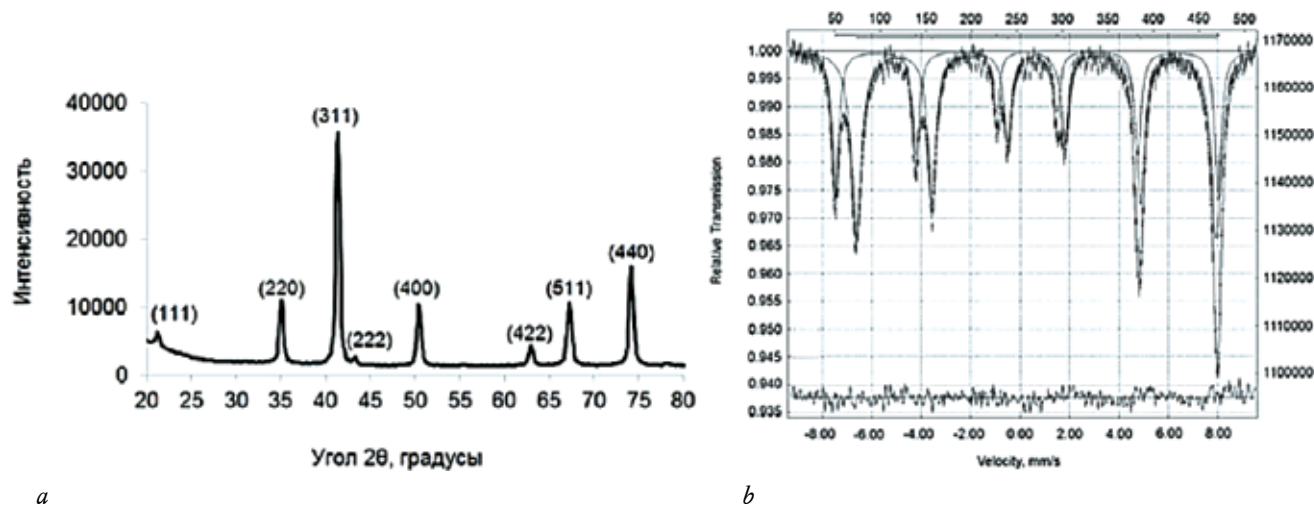


Рис. 2. Дифрактограмма (а) и мёссбауэровский спектр (б) кубических наночастиц магнетита при комнатной температуре

Fig. 2. Diffractogram (a) and Mössbauer spectrum (b) of cubic magnetite nanoparticles at room temperature

Т а б л и ц а 1

Мёссбауэровские параметры, полученные из экспериментального спектра				
Площадь мёссбауэровского спектра для ионов Fe^{3+} в тетраэдрической позиции (S_a)	Площадь мёссбауэровского спектра для ионов Fe^{2+} в октаэдрической позиции (S_b)	S_b/S_a (σ)	Вакантный параметр, k	Fe^{2+}/Fe , %
34,9	65,1	1,87	0,008	33

Магнитные измерения были проведены при комнатной температуре и нормализованы на содержание магнетита в образце. На рис. 3 приведена петля гистерезиса для КНЧМ. Значение коэрцитивной силы H_c составило 15,2 Э, что говорит о практически суперпарамагнитном характере наночастиц.

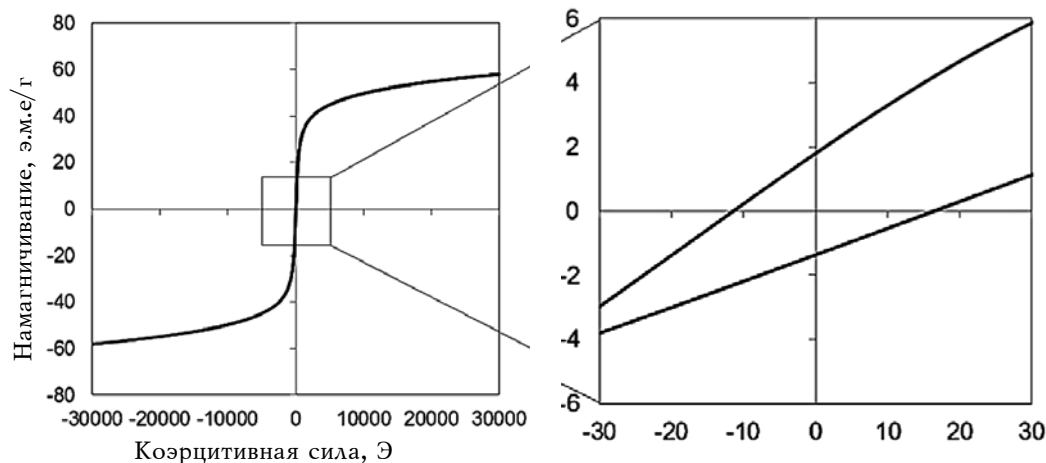


Рис. 3. Петля гистерезиса кубических наночастиц магнетита

Fig. 3. Cubic magnetite nanoparticles hysteresis loop

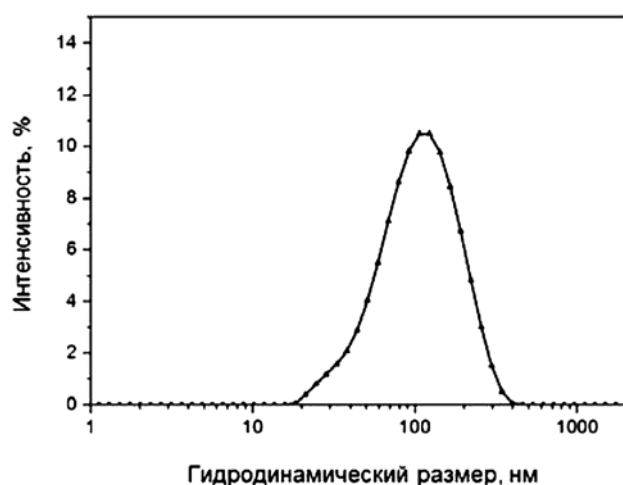


Рис. 4. Гидродинамический размер кубических наночастиц магнетита после покрытия сополимером плюроник F127

Fig. 4. Hydrodynamic size of the cubic magnetite nanoparticles after coating with Pluronic F127 copolymer

Для оценки широты применения КНЧМ в качестве МРТ-контрастных агентов в работе использовали три модели опухолей мыши: рак молочной железы 4Т1, рак толстого кишечника СТ-26 и меланома В16. Для этого животным вводили 1 млн клеток подкожно, а через 10 сут после имплантации вводили внутривенно раствор

Поверхность КНЧМ была покрыта сополимером плюроник F127 для придания им стабильности в физиологической среде. Средний гидродинамический размер наночастиц после конъюгации с полимером составил 100 нм, о чем свидетельствуют соответствующие измерения методом динамического светорассеяния (рис. 4).

наночастиц в PBS. МРТ-исследования проводили в T2-взвешенном режиме в двух взаимноортогональных проекциях до введения частиц, а также через 15 мин, 6 ч и 24 ч после инъекции.

В ходе проведения экспериментов было показано, что КНЧМ накапливались и увеличивали T2-контраст в 100% опухолей 4Т1, 70% СТ-26 и 57% В16. Максимальный контраст наблюдали через 6 ч после введения. В экспериментах на модели рака молочной железы 4Т1 накопление КНЧМ выявлено в 100% опухолей 4Т1 (5/5), выраженное накопление (рис. 5) – в 100% опухолей 4Т1 (5/5).

В экспериментах на модели рака толстого кишечника мыши СТ26 накопление КНЧМ выявлено в 70% опухолей СТ26 (7/10), выраженное накопление (рис. 6) – в 50% опухолей СТ26 (5/10).

В экспериментах на модели меланомы В16 накопление кубических наночастиц магнетита выявлено в 57% (4/7) опухолей В16, выраженное накопление (рис. 7) – в 57% (4/7) опухолей В16.

Для диагностики опухолевых очагов необходимо четкое контрастирование опухоли, поэтому для анализа были отдельно выделены опухоли с выраженным накоплением КНЧМ. Для КНЧМ доля таких опухолей составила 64% (табл. 2).

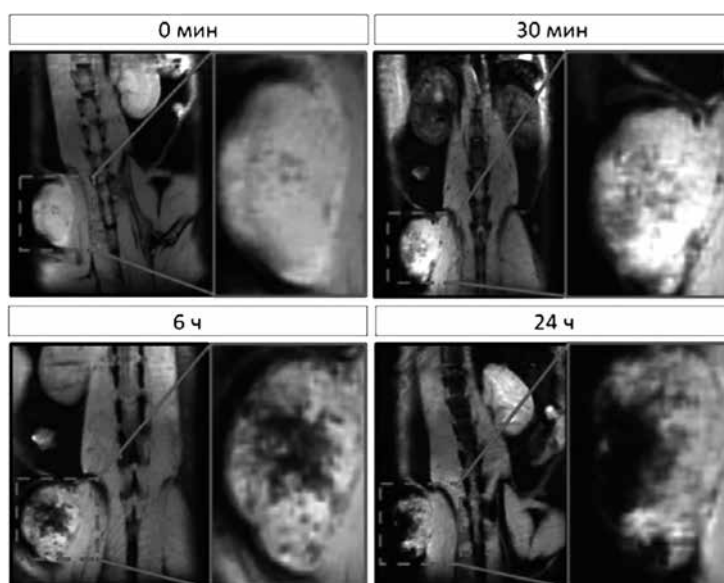


Рис. 5. Репрезентативное фото выраженного накопления кубических наночастиц магнетита в динамике (0 мин, 30 мин, 6 ч, 24 ч) после внутривенного введения 5 мг/кг (Fe) частиц (модель 4Т1). Для каждой временной точки левая панель – обзорный снимок, правая панель – опухоль

Fig. 5. Representative photo of the expressed accumulation of the cubic magnetite nanoparticles over time (0 min, 30 min, 6 h, 24 h) after intravenous administration of 5 mg/kg (Fe) of particles (model 4T1). For each time point, the left panel is an overview image, the right panel is a tumor

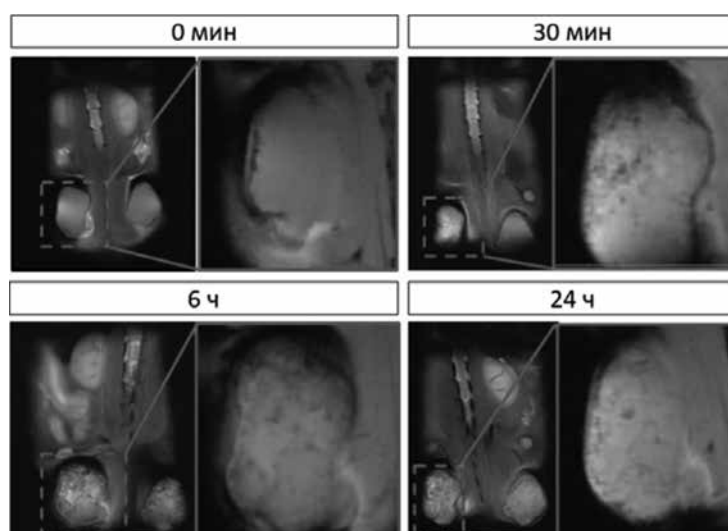


Рис. 6. Репрезентативное фото выраженного накопления кубических наночастиц магнетита в динамике (0 мин, 30 мин, 6 ч, 24 ч) после внутривенного введения 5 мг/кг (Fe) частиц (модель СТ26). Для каждой временной точки левая панель – обзорный снимок, правая панель – опухоль

Fig. 6. Representative photo of the expressed accumulation of of the cubic magnetite nanoparticles over time (0 min, 30 min, 6 h, 24 h) after intravenous administration of 5 mg/kg (Fe) particles (model CT26). For each time point, the left panel is an overview image, the right panel is a tumor

Т а б л и ц а 2

Накопление (+) и выраженное накопление (+++) КНЧМ в опухолях								
Параметр	4Т1		СТ26		В16		Все модели	
	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
КНЧМ	100% (5/5)	100% (5/5)	70% (7/10)	50% (5/10)	57% (4/7)	57% (4/7)	73% (16/22)	64% (14/22)

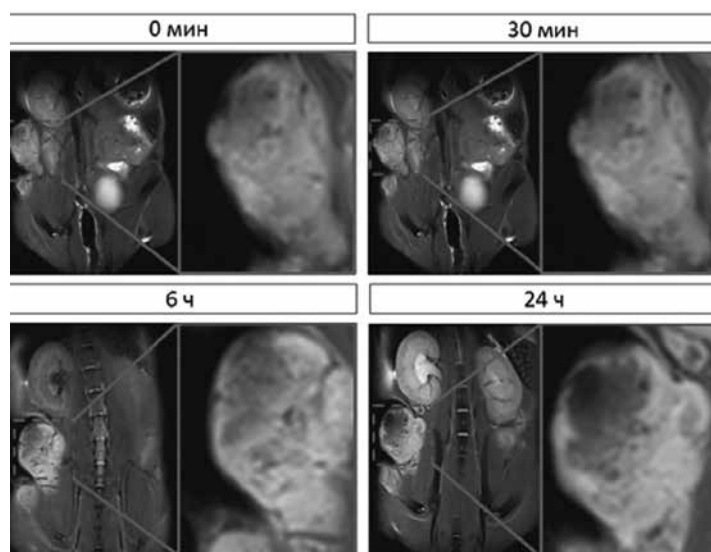


Рис. 7. Репрезентативное фото выраженного накопления кубических наночастиц магнетита в динамике (0 мин, 30 мин, 6 ч, 24 ч) после внутривенного введения 5 мг/кг (Fe) частиц (модель B16). Для каждой временной точки левая панель – обзорный снимок, правая панель – опухоль

Fig. 7. Representative photo of the expressed accumulation of the cubic magnetite nanoparticles over time (0 min, 30 min, 6 h, 24 h) after intravenous administration of 5 mg/kg (Fe) particles (model B16). For each time point, the left panel is an overview image, the right panel is a tumor

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее неоднократно было показано, что различная форма нанокристаллов магнетита обладает существенным влиянием на магнитные и релаксационные свойства материала. В представленной работе исследована система на основе наночастиц магнетита кубической формы. Проведенные физико-химические исследования показали, что полученные частицы обладают высокой монодисперсностью, упорядоченной кристаллической структурой и суперпарамагнитными свойствами, что позволяет их использовать в качестве МРТ-контрастного агента.

Значения намагниченности в области нулевых значений внешнего магнитного поля близки к нулю, что говорит о пренебрежимо малой остаточной намагниченности и позволяет утверждать о наличии суперпарамагнитных свойств у КНЧМ. Данное свойство важно в аспекте применения КНЧМ в экспериментах на живых системах, особенно при МРТ. Наличие суперпарамагнитных свойств обеспечивает отсутствие магнитных взаимодействий между наночастицами без воздействия внешнего магнитного поля, что приводит к уменьшению сил притяжения между наночастицами и препятствует агрегации в сосудах и тканях, способной привести к эмболизации микрососудов.

Поскольку наночастицы магнетита обладают низкой агрегативной устойчивостью в водных

средах, нами был предложен метод солюбилизации КНЧМ, позволяющий повысить их стабильность с использованием сополимера плуроника F127. Данный амфифильный полимер встраивается в оболочку КНЧМ из олеиновой кислоты центральным гидрофобным полипропиленовым фрагментом, тогда как гидрофильные боковые фрагменты сополимера обращаются в сторону водной фазы, формируя гидрофильную корону из полиэтиленгликоля, препятствующую агрегации, в том числе и во внешнем магнитном поле.

Значение скорости r_2 -релаксации для КНЧМ, покрытых плуроником F127, составило $300 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (рис. 8), что значительно превышает такие же значения для коммерческих контрастных агентов на основе наночастиц магнетита (Lumirem, Feridex, Resovist и др.).

Столь высокое значение можно объяснить наличием дополнительных неоднородностей магнитного поля, создаваемых каждой отдельной наночастицей, что в совокупности приводит к ускорению времени спин-спиновой релаксации протонов, попадающих в области с различной напряженностью магнитного поля. При этом стоит отметить, что наночастицы кубической формы обладают более выраженной анизотропией по сравнению со сферическими наночастицами, что и обеспечивает увеличение T2-релаксационности.

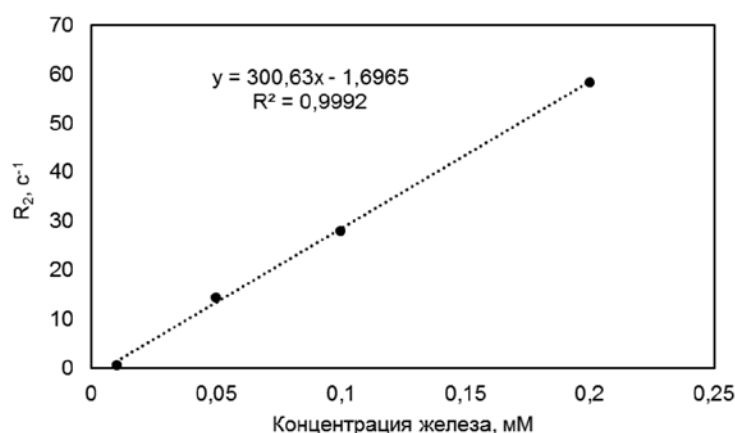


Рис. 8. Зависимость параметра R2 релаксации от концентрации железа в образце кубических наночастиц
Fig. 8. Dependence of R2 parameter of relaxation on the iron concentration in the cubic magnetite nanoparticles sample

С целью подтвердить перспективы использования КНЧМ в качестве контрастного средства для МРТ-опухолей был проведен анализ накопления КНЧМ в опухолях разного происхождения. Анализ накопления частиц в разных моделях выявил также биологические факторы, влияющие на эффективность доставки препаратов в опухоль. Две модели, характеризующиеся выраженным неоангиогенезом и метастазированием (4Т1 и В16), показали высокие показатели накопления КНЧМ – 100 и 57% соответственно (выраженное накопление 100 и 57% соответственно). Для модели СТ-26 доля опухолей, накопивших частицы, составила 70% (выраженное накопление – 50%). По всей видимости, повышенная проницаемость сосудов в метастазирующих моделях опухолей объясняет также более выраженный ЕРР-эффект, обуславливающий более выраженное накопление частиц. Известно также, что гетеротопические опухоли (в данном случае СТ26, имплантированная подкожно) накапливают частицы немного хуже, чем гетеротопические (в данном случае В16, растущая в естественном микроокружении) [11]. Тем не менее стоит отметить, что во всех трех культурах были обнаружены случаи достоверных изменений интенсивности сигнала после внутривенного введения КНЧМ. В целом полученные данные свидетельствуют о перспективе использования КНЧМ как МРТ-контрастных агентов, а также как возможных носителей для доставки лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод синтеза позволил получить стабильные водные суспензии КНЧМ, обладающие высокими значениями Т2-релаксивности. Проведенное МРТ-исследование экспери-

ментальных образцов выявило, что КНЧМ весьма эффективны для Т2-контрастирования злокачественных очагов в различных опухолевых моделях, позволяя визуализировать 73% опухолей. Среди изученных опухолевых моделей наиболее эффективное накопление частиц выявлено в ортотопических моделях с выраженным метастатическим потенциалом (4Т1 – 100%, В16 – 57%), что связано с более выраженным ЕРР-эффектом. Гетеротопическая опухоль СТ-26 характеризуется менее эффективным накоплением частиц (50%). Максимальный контраст для всех типов частиц наблюдали через 6 ч после введения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (14.607.21.0132, RFMEFI60715X0132).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Этические нормы соблюдены в полном объеме № 25/2017; № 26/2017.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lee N. et al. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy. *Chemical Reviews*. 2015; 115 (19): 10637–10689. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00112.
2. Yigit M.V., Moore A., Medarova Z. Magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. *Pharmaceutical Research*. 2012; 29 (5): 1180–1188. DOI:10.1007/s11095-012-0679-7.

3. Josephson L. et al. The effects of iron oxides on proton relaxivity. *Magn. Reson. Imaging*. 1988; 6 (6): 647–653.
4. Ramalho J. et al. Gadolinium-based contrast agent accumulation and toxicity: An update. *American Journal of Neuroradiology*. 2016; 37 (7): 1192–1198. DOI:10.3174/ajnr.A4615.
5. Kievit F.M., Zhang M. Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Acc. Chem. Res.* 2011; 44 (10): 853–862. DOI:10.1021/ar2000277.
6. Jun Y.W. et al. Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127 (16): 5732–5733. DOI: 10.1021/ja0422155.
7. Brooks R.A., Moyn F., Gillis P. On T2-shortening by strongly magnetized spheres: A partial refocusing model. *Magn. Reson. Med.* 2002; 47 (2): 257–263.
8. Zhen G. et al. Comparative Study of the Magnetic Behavior of Spherical and Cubic Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*. 2011; 115 (2): 327–334. DOI: 10.1021/jp104953z.
9. Lee N. et al. Water-dispersible ferrimagnetic iron oxide nanocubes with extremely high r_2 relaxivity for highly sensitive in vivo MRI of tumors. *Nano Lett.* 2012; 12 (6): 3127–3131. DOI:10.1021/nl3010308.
10. Batrakova E.V., Kabanov A.V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release*. 2008; 130 (2): 98–106. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.04.013.
11. Nakamura Y. et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjugate Chemistry*. 2016; 27 (10): 2225–2238. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00437.
12. Bertrand N. et al. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014; 66: 2–25. DOI: 10.1016/j.addr.2013.11.009.
13. Riemer J. et al. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal. Biochem.* 2004; 331 (2): 370–375. DOI: 10.1016/j.ab.2004.03.049.
14. Nikitin A. et al. Synthesis, characterization and MRI application of magnetite water-soluble cubic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2017; 441: 6–13. DOI:10.1016/j.jmmm.2017.05.039.

Поступила в редакцию 13.11.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Никитин Алексей Андреевич, аспирант, химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова; инженер, НИТУ МИСиС, г. Москва.

Науменко Виктор Алексеевич, канд. мед. наук, инженер, НИТУ МИСиС, г. Москва.

Водопьянов Степан Сергеевич, канд.биол. наук, инженер, НИТУ МИСиС, г. Москва.

Гаранина Анастасия Сергеевна, канд.биол. наук, инженер, НИТУ МИСиС, г. Москва.

Федорова Наталья Дмитриевна, магистрант, НИТУ МИСиС, г. Москва.

Калабай Енлик Даулеткызы, магистрант, НИТУ МИСиС, г. Москва.

Савченко Александр Григорьевич, канд. физ.-мат. наук, зав. кафедрой физического материаловедения, НИТУ МИСиС, г. Москва.

Абакумов Максим Артемович, канд. хим. наук, зав. лабораторией «Биомедицинские наноматериалы», НИТУ МИСиС, г. Москва.

Мажуга Александр Георгиевич, д-р хим. наук, профессор, МГУ имени М.В. Ломоносова; и.о. ректора РХТУ имени Д.И. Менделеева, г. Москва.

(✉) Никитин Алексей Андреевич, e-mail: nikitin.chemistry@mail.ru.

УДК 616-006-073.7:57.086.16:549.731.13-022.532

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-121-129

For citation: Nikitin A.A., Naumenko V.A., Vodopyanov S.S., Garanina A.S., Fedorova N.D., Kalabay E.D., Savchenko A.G., Abakumov M.A., Majouga A.G. Study of the contrasting effectiveness of various tumors types using cubic magnetite nanoparticles. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 121–129.

Study of the contrasting effectiveness of various tumors types using cubic magnetite nanoparticles

Nikitin A.A.^{1,2}, Naumenko V.A.¹, Vodopyanov S.S.¹, Garanina A.S.¹, Fedorova N.D.¹, Kalabay E.D.¹, Savchenko A.G.¹, Abakumov M.A.^{1,3}, Majouga A.G.^{2,4}

¹ National University of Science and Technology “MISIS”

4, Leninskiy Av., Moscow, 119991, Russian Federation

² *Lomonosov Moscow State University
1/3, Leninskiye Gory, GSP-1, Moscow, 119991, Russian Federation*

³ *Russian National Research Medical University
1, Ostrovityanova Str., Moscow, 117997, Russian Federation*

⁴ *Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia
9, Miusskaya Str., Moscow, 125047, Russian Federation*

ABSTRACT

Currently magnetic resonance imaging (MRI) is one of the key diagnostics methods of various diseases. Utilizing various contrast agents based on magnetic nanoparticles can improve the diagnostic efficiency and, consequently, the quality of the subsequent treatment. The most promising contrast agents are cubic magnetite nanoparticles, due to their high relaxation rates, as well as biocompatibility and biodegradability.

Thereby, the **purpose of this work** was to evaluate the effectiveness of MRI imaging of tumors by cubic magnetite nanoparticles (CMN).

Materials and methods. For this purpose, the synthesis of 15 nm CMN modified with biocompatible copolymer pluronic F127 was carried out. Synthesized CMN and their water colloids were characterized by a complex of physicochemical methods of analysis. Then, using MRI a study of the effectiveness of contrasting of various tumor types after intravenous administration of CMN aqueous colloids was made. Three models of mouse tumors were used for a comprehensive assessment of obtained results: breast cancer 4T1, colon cancer CT-26 and melanoma B16. MRI studies were performed prior to the administration of the particles, and also after 15 min, 6 hours and 24 hours after injection in T_2 -weighted regime in two mutually orthogonal projections.

Results. The analysis of the obtained results showed that the most effective accumulation of particles was found in the 4T1 (100%) and B16 (57%) models, and in the case of CT-26 model the accumulation efficiency was 50% due to the effect of the permeability of blood vessels.

Key words: nanoparticles, magnetite, magnetic resonance imaging, contrast agents, breast cancer, colon cancer, melanoma.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The work was supported by the Ministry of Education

and Science of the Russian Federation (14.607.21.0132, RFMEFI60715X0132).

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

Ethical standards are fully complied with No. 25/2017; № 26/2017.

Received 13.11.2017

Accepted 06.02.2018

Nikitin Aleksey A., PhD-student, Lomonosov Moscow State University; Engineer, Moscow, Russian Federation.
Naumenko Victor A., PhD, Engineer, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.
Vodopyanov Stepan S., PhD, Engineer, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.
Garanina Anastasia S., PhD, Engineer, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.
Fedorova Natalya D., Graduate Student, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.
Kalabay Enlik D., Graduate Student, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.
Savchenko Alexander G., PhD, Head of the Department of Physical Materials Science, NUST MISiS, Moscow, Russian Federation.
Abakumov Maxim A., PhD, Head of the Department of Biomedical Nanomaterials, NUST MISiS, Moscow, Russian Federation.

Majouga Alexander G., Professor, DChSc, Acting Rector of Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation.

(✉) Nikitin Aleksey A., e-mail: nikitin.chemistry@mail.ru.

УДК 618.12-002-085.281.036:615.859

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-149–158

Для цитирования: Ушкалова Е.А., Черникова Л.Ю., Евтушенко И.Д., Каракулова Е.В., Фокин В.А., Белоусов М.В. Фармакоэпидемиологические аспекты антибактериальной терапии сальпингоофорита в условиях стационара. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 149–158.

Фармакоэпидемиологические аспекты антибактериальной терапии сальпингоофорита в условиях стационара

Ушкалова Е.А.¹, Черникова Л.Ю.², Евтушенко И.Д.²,
Каракулова Е.В.², Фокин В.А.², Белоусов М.В.²

¹ Российский университет дружбы народов (РУДН)
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

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

РЕЗЮМЕ

Цель работы – проанализировать потребление антибактериальных препаратов при терапии сальпингоофорита (СО) в условиях стационара и оценить изменения реальной клинической практики антибиотикотерапии после внедрения «Порядка оказания медицинской помощи по профилю “акушерство и гинекология” (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» (далее «Порядок оказания медицинской помощи...»).

Материалы и методы. В ретроспективном исследовании проведена оценка назначений антибактериальных препаратов при терапии сальпингоофорита в специализированных лечебно-профилактических учреждениях г. Томска в период 2010–2014 гг. Проанализировано 160 историй болезни. Структура назначений оценивалась на основе применения анатомо-терапевтическо-химической классификации и международных непатентованных наименований (МНН), рассчитывался коэффициент структурных сдвигов К. Гатева. Для количественной оценки потребления лекарственных препаратов использовался расчет назначенной суточной дозы (prescribed daily dose (PDD)).

Результаты. Выполнен сравнительный анализ антибактериальной терапии СО в условиях стационара до и после введения «Порядка оказания медицинской помощи...». Выявлены лидирующие группы антибактериальных препаратов. Проведен сравнительный анализ частоты назначения МНН. Рассчитан коэффициент К. Гатева, который составил 0,281. Выполнен расчет средних назначенных суточных доз антибактериальных препаратов.

Заключение. Обзор потребления антибактериальных препаратов для терапии СО в условиях стационара до и после введения «Порядка оказания медицинской помощи...» показал, что ассортимент применяемых антибактериальных препаратов увеличился с 18 до 24 МНН, преимущественно за счет включения современных лекарственных препаратов. Тем не менее в структуре назначений в 2013–2014 гг. доля препаратов, не рекомендованных к использованию «Порядком оказания медицинской помощи», составила 37,5%. Обнаружено, что PDD кларитромицина, клиндамицина и цефотаксима не соответствовали рекомендуемым режимам дозирования, указанным в клинических рекомендациях по антибактериальной терапии. Обнаруженный разрыв между реальной клинической практикой и существующими клиническими рекомендациями определяет необходимость углубленной фармакоэпидемиологической оценки с целью выявления причин и разработки мер организационного и образовательного характера для оптимизации использования лекарственных препаратов.

✉ Черникова Лариса Юрьевна, e-mail: lachernik@rambler.ru.

Ключевые слова: антибактериальная терапия, сальпингофорит, исследование потребления лекарственных средств.

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) у женщин являются серьезной медицинской, социальной и экономической проблемой, так как представляют собой группу инфекционных заболеваний области верхних отделов репродуктивного тракта. Установлено, что среди женщин, перенесших эпизод ВЗОМТ, отмечается повышенный риск возникновения бесплодия, внематочной беременности, рецидива инфекции и синдрома хронической тазовой боли [1, 2]. В настоящее время большей части пациентов с ВЗОМТ медицинская помощь оказывается на амбулаторном этапе, однако 60–70% больных стационаров гинекологического профиля госпитализируются именно по причине ВЗОМТ [3]. В соответствии с современными представлениями о медицинской помощи женщинам с ВЗОМТ ключевым компонентом фармакотерапии является использование антибактериальных препаратов, что отражено в «Порядке оказания медицинской помощи...» [4]. Несмотря на существенный прогресс в оказании медицинской и лекарственной помощи при ВЗОМТ, задача оптимизации использования антибактериальных препаратов остается по-прежнему актуальной, поскольку по данным ряда авторов нерациональная терапия ВЗОМТ достигает 20–40%, не обеспечивая эрадикацию возбудителя в очаге воспаления и способствуя осложненному течению инфекции [5–7]. В связи с этим возникает необходимость в систематическом проведении фармакоэпидемиологических исследований потребления антибактериальных препаратов и соотнесения реальной клинической практики с современными рекомендациями.

Цель исследования – анализ потребления антибактериальных препаратов при терапии сальпингофорита (СО) в условиях стационара и оценка изменений реальной клинической практики антибиотикотерапии после внедрения «Порядка оказания медицинской помощи...».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проведено ретроспективное фармакоэпидемиологическое исследование, которое базировалось на оценке первичной медицинской документации специализированных гинекологических отделений г. Томска. Проанализировано 160 историй болезни пациентов, находившихся

на стационарном лечении с ВЗОМТ неспецифической этиологии острого и подострого течения заболевания за период 2010–2014 гг. с нозологической формой СО. Данные из историй болезни заносились в специально разработанную для данного исследования регистрационную форму, в которой указывались социально-демографическая характеристика больных и медицинский анамнез, а также проводимая фармакотерапия. Для кодирования препаратов использовалась анатомо-терапевтическо-химическая (АТХ) классификация.

Оценка изменений структуры назначений антибактериальных препаратов осуществлялась с использованием интегрального коэффициента К. Гатева [8] как обобщающего показателя структурных сдвигов, который рассчитывался по формуле

$$K_{\Gamma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^K (d_i - d_0)^2}{\sum_{i=1}^K d_i^2 + \sum_{i=1}^K d_0^2}}, \quad (1)$$

где K – число выделяемых элементов (групп) в совокупности; d_i , d_0 – удельные веса отдельных элементов совокупности в отчетном и базисном периодах.

Для количественной оценки потребления лекарственных средств при лечении сальпингофорита использовался расчет назначенной суточной дозы (prescribed daily dose (PDD)). PDD представляет собой среднюю назначенную суточную дозу, характеризующую показатель потребления лекарственного препарата в сутки пациентом в реальной клинической практике [9]. Показатель PDD рассчитывался на одного пациента путем ретроспективного оценивания медицинской документации. Расчет производился по формуле

$$PDD_i = \frac{\sum_{j=1}^{N_i} Q_{ij}}{N_i}, \quad (2)$$

где PDD_i – среднее ежедневное количество препарата i фактического назначения; Q_{ij} – суточная доза препарата i по фактическому назначению пациенту j ; N_i – число пациентов, получавших препарат i .

Частота назначений антибактериальных препаратов p представлена в процентах с расчетом 95%-го доверительного интервала (ДИ) по методу Уилсона (Wilson) [10], учитывающему несимметричность границ доверительного интервала в случае малых частот ($p < 5$). Различия в частоте назначений препаратов между двумя анализируемыми периодами наблюдений считались ста-

статистически значимыми на уровне $p < 0,05$, если границы доверительных интервалов для сравниваемых частот не перекрывались.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проведен анализ антибактериальной терапии, указанной в «Порядке оказания медицинской помощи...» для стационарного этапа лечения. Было установлено, что для оказания лекарственной помощи пациентам с СО рекомендуются следующие антибактериальные лекарственные препараты: метронидазол, доксициклин, цефалоспорины II и III поколения (цефтриаксон, цефоперазон + сульбактам), кар-

бапенемы, фторхинолоны, макролиды, аминогликозиды (амикацин), пенициллины в комбинации с ингибиторами бета-лактамаз (амоксциллин + клавулановая кислота).

Далее была проведена оценка фактического назначения антибактериальных препаратов в 2010–2012 и 2013–2014 гг. на стационарном этапе лечения СО, т. е. до и после введения «Порядка оказания медицинской помощи...». Анализ назначений отдельных групп антибактериальных препаратов показал, что для лечения СО применялись девять из 10 групп, включенных в АТХ-классификацию по J01-классу «Антибактериальные средства для системного применения» (рис.).

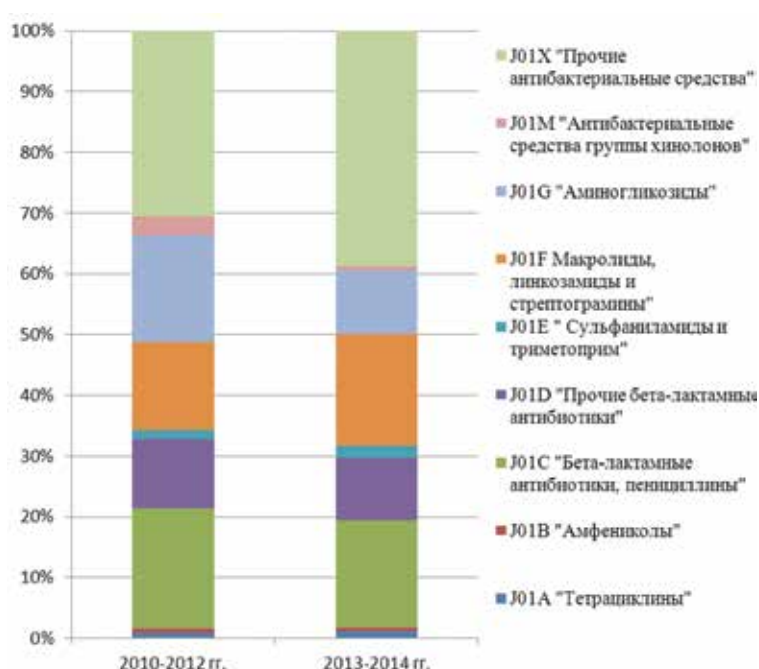


Рисунок. Изменения в структуре назначений антибактериальных препаратов различных групп при терапии сальпингоофорита в условиях стационара

Figure. Changes in the structure of prescriptions of antibacterial drugs of various groups when treating salpingo-oophoritis inpatient

Обнаружено, что как в 2010–2012 гг., так и в последующий анализируемый период доминировали в структуре назначений следующие группы: J01C «Бета-лактамы антибиотик, пенициллины», J01F «Макролиды, линкозамиды и стрептограминны», J01D «Прочие бета-лактамы антибиотик». Суммарно доля этих трех групп в общей структуре назначений составила 46% как в 2010–2012 гг., так и в 2013–2014 гг. Необходимо отметить, что, несмотря на введение в действие в 2013 г. «Порядка оказания медицинской помощи...», структура назначений

антибактериальных препаратов по АТХ-группам не претерпела принципиальных изменений. Как до, так и после введения данного документа назначались группы препаратов, не входящие в рекомендуемый перечень, в частности J01B «Амфениколы» и J01E «Сульфаниламиды и триметоприм».

Проведенный детальный анализ назначений антибактериальных препаратов показал, что для фармакотерапии СО назначались 18 МНН лекарственных препаратов в 2010–2012 гг. и 24 МНН в 2013–2014 гг. (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Частота назначений антибактериальных препаратов при лечении сальпингоофорита в условиях стационара			
АТХ-группа	Международное непатентованное наименование	<i>p</i> (%), 95%-й ДИ	
		2010–2012 гг.	2013–2014 гг.
J01A «Тетрациклины»	Доксициклин	0,0 (0,0–2,90)	0,6 (0,2–2,1)
	Тетрациклин	0,8 (0,1–4,2)	0,6 (0,2–2,1)
J01B «Амфениколы»	Хлорамфеникол	0,8 (0,1–4,2)	0,6 (0,2–2,1)
J01C «Бета-лактамы антибиотиков, пенициллины»	Бензилпенициллин	8,4 (4,8–14,4)	0,9* (0,3–2,6)
	Ампициллин	8,4 (4,8–14,4)	6,7 (4,5–9,9)
	Амоксициллин/клавулановая кислота	1,5 (0,4–5,4)	9,1* (6,5–12,6)
	Ампициллин + оксациллин	0,0 (0,0–2,9)	0,3 (0,1–1,6)
	Карбенициллин	1,5 (0,4–5,4)	0,6 (0,2–2,1)
J01D «Прочие бета-лактамы антибиотиков»	Цефазолин	5,3 (2,6–10,6)	2,9 (1,6–5,3)
	Цефотаксим	5,3 (2,6–10,6)	4,7 (2,9–7,5)
	Цефтриаксон	0,0 (0,0–2,9)	1,5 (0,6–3,4)
	Цефуроксим	0,8 (0,1–4,2)	0,9 (0,3–2,6)
	Цефепим	0,0 (0,0–2,9)	0,3 (0,1–1,6)
J01E «Сульфаниламиды и триметоприм»	Ко-тримоксазол	1,5 (0,4–5,4)	2,1 (1,0–4,2)
J01F «Макролиды, линкозамиды и стрептограммины»	Эритромицин	0,8 (0,1–4,2)	0,9 (0,3–2,6)
	Линкомицин	6,1 (3,1–11,6)	7,3 (5,0–10,6)
	Кларитромицин	0,0 (0,0–2,9)	2,6 (1,4–4,9)
	Клиндамицин	0,0 (0,0–2,9)	3,2 (1,8–5,7)
	Азитромицин	7,6 (4,2–13,5)	4,4 (2,7–7,1)
J01G «Аминогликозиды»	Гентамицин	10,7 (6,5–17,1)	6,7 (4,5–9,9)
	Канамицин	6,9 (3,7–12,5)	3,5 (2,0–6,0)
J01M «Антибактериальные средства группы хинолонов»	Ципрофлоксацин	2,3 (0,8–6,5)	0,6 (0,2–2,1)
	Норфлоксацин	0,8 (0,1–4,2)	0,3 (0,1–1,6)
J01X «Прочие антибактериальные средства»	Метронидазол	30,5 (23,3–38,9)	38,7 (33,7–43,9)

* статистически значимые ($p < 0,05$) различия в частоте назначений препаратов между двумя периодами наблюдений.

Для интегральной оценки изменений структуры назначений антибактериальных препаратов, использованных для лечения СО, был рассчитан коэффициент структурных сдвигов К. Гатева. Данный коэффициент может изменяться в пределах от 0 до 1, т. е. чем ближе коэффициент к 1, тем сильнее изменения структуры изучаемой совокупности. Рассчитанный нами коэффициент составил 0,281, что свидетельствует об отсутствии существенных сдвигов в структуре фармакотерапии СО после введения «Порядка оказания медицинской помощи...».

Однако анализ назначений антибактериальных препаратов по отдельным МНН показал, что произошло расширение ассортимента группы J01F «Макролиды, линкозамиды и стрептограммины» за счет включения таких наименований, как кларитромицин и клиндамицин, что соответствует современным европейским и российским рекомендациям, поскольку кларитромицин обладает иммуномодулирующей и умеренной противовоспалительной активностью, что важно при болевом синдроме у пациенток с СО, а клиндамицин является препаратом второго ряда в схемах лечения при тяжелом течении инфекционно-воспалительных заболеваний органов малого таза [11, 12]. Необходимо также отметить, что снизилась доля аминогликозидов (гентамицина и канамицина), что является оправданным ввиду высокой токсичности данных антибактериальных средств. В то же время включения единственного, рекомендуемого в «Порядке оказания медицинской помощи...» препарата данной группы амикацина в схемы терапии не произошло, хотя данный препарат характеризуется более высокой способностью преодолевать некоторые механизмы резистентности у микроорганизмов при лечении воспалительно-инфекционных заболеваний, что объясняет рост назначений амикацина в многопрофильных стационарах РФ [13].

Оба анализируемых периода характеризовались высокой долей метронидазола в структуре назначений, что вполне соответствует современным схемам комбинированной фармакотерапии

ВЗОМТ на госпитальном этапе, включающим метронидазол, поскольку он обладает активностью против анаэробных бактерий, которые играют важную роль в патогенезе СО [6].

Анализ назначений отдельных МНН в группе J01C «Бета-лактамы: антибиотики, пенициллины» показал, что наряду с существенным увеличением доли комбинации амоксициллин/клавулановая кислота (с 1,5 до 9,1%), продолжали назначаться такие МНН, как бензилпенициллин, ампициллин, ампициллин + оксациллин, отсутствующие в утвержденном Минздравом «Порядке оказания медицинской помощи...», что свидетельствует о существующем разрыве между современными рекомендациями по фармакотерапии СО и реальной клинической практикой. Применение в схемах антибактериальной терапии ВЗОМТ лекарственных препаратов, не входящих в клинические руководства, было обнаружено и другими авторами.

Так, фармакоэпидемиологический анализ противомикробной терапии сальпингоофоритов, проведенный в стационарах Саратовской области, показал, что 36% назначений приходилось на антибактериальные препараты, отсутствующие в современных клинических рекомендациях [14]. Можно предположить, что нерациональный выбор лекарственных препаратов может быть связан с рядом причин, характерных для системы лекарственного обеспечения: попыткой экономии средств, недостаточной информированностью врачей, отсутствием формулярного регулирования [15].

Необходимо отметить, что структура назначений антибактериальных препаратов характеризует выбор врачами определенных МНН при формировании схем фармакотерапии, но не отражает интенсивности потребления данных лекарственных средств.

Для количественной оценки назначения антибактериальных средств был использован PDD-анализ. Результаты расчета интенсивности суточного потребления антибактериальных препаратов в расчете на одного пациента при лечении СО представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

PDD-анализ потребления антибактериальных препаратов при терапии сальпингоофорита в условиях стационара			
АТХ-группа	Международное непатентованное наименование	PDD на одного пациента, г	
		2010–2012 гг.	2013–2014 гг.
J01A «Тетрациклины»	Доксициклин	-	0,30
	Тетрациклин	1,00	1,00

О к о н ч а н и е т а б л . 2

АТХ-группа	Международное непатентованное наименование	PDD на одного пациента, г	
		2010–2012 гг.	2013–2014 гг.
J01C «Бета-лактамы антибиотики, пенициллины»	Бензилпенициллин	1,69	1,70
	Ампициллин	1,91	1,96
	Амоксициллин/клавулановая кислота	2,40	3,60
	Ампициллин + оксациллин	–	2,00
	Карбенициллин	6,00	6,00
J01D «Прочие бета-лактамы антибиотики»	Цефазолин	2,86	2,31
	Цефуроксим	3,00	3,00
	Цефотаксим	2,00	3,00
	Цефтриаксон	–	1,00
	Цефепим	–	2,00
J01F «Макролиды, линкозамиды и стрептограммины»	Эритромицин	2,00	2,67
	Линкомицин	2,63	2,52
	Кларитромицин	–	1,50
	Клиндамицин	–	1,89
	Азитромицин	0,70	0,50
J01G «Аминогликозиды»	Гентамицин	0,14	0,14
	Канамицин	1,28	1,36
J01M «Антибактериальные средства группы хинолонов»	Ципрофлоксацин	1,00	1,00
	Норфлоксацин	–	0,80
J01X «Прочие антибактериальные средства»	Метронидазол	1,50	1,75

Установлено, что в период 2013–2014 гг. по сравнению с 2010–2012 гг. незначительно снизилась PDD цефазолина, линкомицина, азитромицина; в то же время несколько увеличилась PDD эритромицина: с 2,00 до 2,67 г. Средняя назначаемая доза для комбинации амоксициллин/клавулановая кислота, которая рекомендуется как препарат первой линии при острых СО неспецифической этиологии, увеличилась в 1,5 раза (с 2,40 до 3,60 г/сут). Анализ потребления группы J01D «Прочие бета-лактамы антибиотики», в частности подгруппы J01DD «Цефалоспорины», показал, что при стабильном потреблении цефалоспоринов II поколения, произошло увеличение PDD в группе цефалоспоринов III поколения. В период 2012–2014 гг. в структуре назначений присутствовал не включенный в «Порядок оказания медицинской помощи...» цефалоспорин IV поколения (цефепим), который назначался в средней суточной дозе 2,0 г. В группе J01G «Аминогликозиды» отмечено стабильное потребление гентамицина, однако необходимо отметить, что данный препарат не значится в «Порядке оказания медицинской помощи...» в связи с неблагоприятным профилем безопасности.

Сопоставление PDD антибактериальных препаратов и существующих клинических рекомендаций [3, 12, 16] показало, что имело место как

совпадение реальной клинической практики и клинических рекомендаций (цефтриаксон), так и большая (кларитромицин) или меньшая (клиндамицин, цефотаксим) интенсивность потребления антибактериальных препаратов, что требует дальнейшей углубленной оценки для выяснения причин отклонений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный фармакоэпидемиологический анализ антибактериальной терапии СО в условиях стационара до и после введения «Порядка оказания медицинской помощи...» показал, что ассортимент применяемых антибактериальных препаратов увеличился с 18 до 24 МНН, преимущественно за счет включения современных лекарственных средств.

В структуре назначений в 2013–2014 гг. доля препаратов, не рекомендованных к использованию «Порядком оказания медицинской помощи...», составила 37,5%.

Обнаружено, что PDD кларитромицина, клиндамицина и цефотаксима не соответствуют рекомендуемым режимам дозирования.

Обнаруженное несоответствие между реальной клинической практикой и существующими клиническими рекомендациями свидетельствует о необходимости проведения организационных

и образовательных мероприятий, таких как более активное использование мер формулярного регулирования и повышение квалификации врачей и провизоров по вопросам рационального использования лекарственных препаратов с последующим аудитом практики антибактериальной терапии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Ушкалова Е.А. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Черникова Л.Ю. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Евтушенко И.Д. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Каракулова Е.В. – обоснование рукописи, анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Фокин В.А. – анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Белоусов М.В. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Уткин Е.В. Заболевания органов малого таза у женщин: современные особенности клиники, диагностики и терапии. *Мать и дитя в Кузбассе*. 2009; 3 (38): 9–15. [Utkin E.V. Purulent pelvic inflammatory disease at women: modern features of clinic, diagnostics and therapy. *Mat i ditya v Kuzbasse – Mother and Child in Kuzbass*. 2009; 3 (38): 9–15 (in Russ.).]
2. Наумов И.А., Тищенко Е.М. Медико-социальная обусловленность репродуктивного поведения пациенток с воспалительными заболеваниями половых органов. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2012; 6: 10–13. [Naumov I.A., Tischenko Ye.M. The medical social stipulation of reproductive behavior of female patients with inflammatory diseases of genitals. *Problemy sotsialnoy gigieny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny – Problems of Social Hygiene, Health and History of Medicine*. 2012; 6: 10–13 (in Russ.).]
3. Уткин Е.В., Артымук Н.В., Черняева В.И., Зеленина Е.М., Ходарева И.В. Клинический протокол. Воспалительные заболевания органов малого таза у женщин. *StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак*. 2016; 3 (32): 144–150. [Utkin E.V., Artymuk N.V., Chernyaeva V.I., Zelenina E.M., Khodareva I.V. Clinical protocol. Inflammatory diseases of the pelvic organs in women. *StatusPraesens. Ginekologiya, akusherstvo, besplodnyy brak – StatusPraesens. Gynecology, Obstetrics, Barren Marriage*. 2016; 3 (32): 144–150 (in Russ.).]
4. Приказ Минздрава России от 01.11.2012 № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю “акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)”». URL: <http://base.consultant.ru>. [Order of the Ministry of Health of Russia from 01.11.2012 № 572n “On approval of the order of rendering medical assistance in the field of obstetrics and gynecology (except for the use of assisted reproductive technologies)”. URL: <http://base.consultant.ru> (in Russ.).]
5. Юрасов И.В., Юрасова Е.А. Антимикробная терапия при воспалительных заболеваниях органов репродуктивной системы у женщин. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2013; 2 (32): 105–108. [Yurasov I.V., Yurasova E.A. Antimicrobial therapy in inflammatory diseases of female reproductive organs. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal – Far Eastern Medical Journal*. 2013; 2 (32): 105–108 (in Russ.).]
6. Рафальский В.В., Довгань Е.В., Иванян А.Н., Саврацкий А.Н. Практика применения антимикробных препаратов у женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза в Российской Федерации. *Акушерство и гинекология*. 2011; 5: 88–93. [Rafalsky V.V., Dovgan Ye.V., Ivanyan A.N., Sawicky A.N. The practice of using antimicrobial agents in women with inflammatory diseases of the pelvic organs in the Russian Federation. *Akusherstvo i ginekologiya – Obstetrics and Gynecology*. 2011; 5: 88–93 (in Russ.).]
7. Пестрикова Т.Ю., Юрасов И.В., Юрасова Е.А. Последствия неадекватной тактики проведения терапии антибиотиками у пациенток с воспалительными заболеваниями органов малого таза. *Вестник общественного здоровья и здравоохранения Дальнего Востока России*. 2015; 1. URL: <http://www.fesmu.ru/voz/20151/2015105.aspx>. [Pestrikova T.Y., Yurasov I.V., Yurasova E.A. The consequences of inadequate tactics of antibiotic therapy in patients with inflammatory diseases of the pelvic organs. *Vestnik obshchestvennogo zdorovya i zdravookhraneniya Dalnego Vostoka Rossii – Bulletin of Public Health and Health of the Far East of Russia*. 2015; 1: URL: <http://www.fesmu.ru/voz/20151/2015105.aspx> (in Russ.).]
8. Перстенёва Н.П. Критерии классификации показателей структурных различий и сдвигов. *Фундаментальные исследования*. 2012; 3 (2): 478–782. [Persteneva N.P. Criteria of classification of indicators of structural

- distinctions and shifts. *Fundamentalnye issledovaniya – Fundamental Research*. 2012; 3 (2): 478–782 (in Russ.).
9. Introduction to drug utilization research / WHO international working group for drug statistics methodology, WHO collaborating centre for drug statistics methodology, WHO collaborating centre for drug utilization research and clinical pharmacological services. World health organization. 2003: 84.
10. Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей. *Экология человека*. 2008; 5: 57–60. [Grjibovski A.M. Confidence intervals for proportions. *Ekologiya cheloveka – Human Ecology*. 2008; 5: 57–60 (in Russ.).]
11. Duarte R. et al. A review of antibiotic therapy for pelvic inflammatory disease. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.004>.
12. Антибактериальная терапия воспалительных заболеваний органов малого таза без ошибок и экспериментов: методическое руководство для врачей; под. ред. В.Е. Радзинского, Р.С. Козлова, А.О. Духина. М.: StatusPraesens, 2013: 16. [Antibacterial therapy of pelvic inflammatory disease without errors and experiments: a methodical guide for doctors; pod. red. V.E. Radzinsky, R.S. Kozlova, A.O. Dukhina/ M: StatusPraesens Publ., 2013: 16 (in Russ.).]
13. Евстигнеев С.В., Александрова Э.Г., Абакумова Т.Р., Кораблева А.А., Титаренко А.Ф., Зиганшина Л.Е., Хазиахметова В.Н. Оценка потребления антибактериальных лекарственных средств в многопрофильном стационаре, проведенная по методологии АТС/DDD анализа. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2017; 7: 131–137. [Yevstigneev S.V., Alexandrova E.G., Abakumova T.R., Korableva A.A., Titarenko A.F., Khaziakhmetova V.N., Ziganshina L.E. Consumption of antimicrobials at a multidisciplinary hospital: ATC/DDD methodology. *Zdorove i obrazovanie v XXI veke – Health and Education Millennium*. 2017; 7: 131–137 (in Russ.).]
14. Кленина Н.М., Рыкалина Е.Б. Фармакоэпидемиологический анализ противомикробной терапии сальпингофоритов в стационарах Саратовской области. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2014; 5: 799. [Klenina N.M., Rykalina E.B. Pharmacoepidemiological analysis of antimicrobial therapy of salpingoophoritis in hospitals the Saratov region. *Byulleten meditsinskikh internet-konferentsiy – Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2014; 5: 799 (in Russ.).]
15. Ростова Н.Б. Международные рекомендации и национальные перспективы рационального использования лекарств для решения вопросов лекарственного обеспечения населения. *Российский медицинский журнал*. 2015; 2: 40–45. [Rostova N.B. The international recommendations and national perspectives of rational application of pharmaceuticals for resolving issues of medicinal support of population. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal – Rossiiskii Meditsinskii Zhurnal*. 2015; 2: 40–45 (in Russ.).]
16. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии; под. ред. Л.С. Страчунского; Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. Смоленск: МАКМАХ, 2007: 464. [Practical guidance on anti-infectious chemotherapy; pod. red. Strachunsky L.S.; Belousova Yu.B., Kozlova S.N. Smolensk: MAKMAN Publ., 2007: 464 (in Russ.).]

Поступила в редакцию 28.05.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Ушкалова Елена Андреевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра общей и клинической фармакологии, РУДН, г. Москва.

Черникова Лариса Юрьевна, ст. преподаватель, кафедра хирургии с курсом мобилизационной подготовки и медицины катастроф, СибГМУ, г. Томск.

Евтушенко Ирина Дмитриевна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, СибГМУ, г. Томск.

Каракулова Елена Владимировна, д-р фарм. наук, доцент, профессор базовой кафедры управления и экономики фармации, СибГМУ, г. Томск.

Фокин Василий Александрович, д-р техн. наук, профессор, кафедра медицинской биологической кибернетики с курсом медицинской информатики, СибГМУ, г. Томск.

Белоусов Михаил Валерьевич, д-р фарм. наук, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Черникова Лариса Юрьевна, e-mail: lachernik@rambler.ru.

УДК 618.12-002-085.281.036:615.859

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-149–158

For citation: Ushkalova E.A., Chernikova L.Yu., Evtushenko I.D., Karakulova E.V., Fokin V.A., Belousov M.V. Pharmacoepidemiological aspects of antibacterial therapy of salpingoophoritis in hospital settings. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 149–158.

Pharmacoepidemiological aspects of antibacterial therapy of salpingoophoritis in hospital settings

Ushkalova E.A.¹, Chernikova L.Yu.², Evtushenko I.D.²,
Karakulova E.V.², Fokin V.A.², Belousov M.V.²

¹ Peoples' Friendship University of Russia
6, Str. Miclukho-Maclai, Moscow, 117198, Russian Federation

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

ABSTRACT

The **purpose of the study** is an analysis of the consumption of antibacterial drugs in the therapy of salpingoophoritis in hospital settings and evaluation of changes in the real clinical practice of antibiotic therapy after the introduction of the “Order of medical care for the profile “obstetrics and gynecology...”.

Materials and methods. In a retrospective study, an assessment was made of the prescriptions of antibacterial drugs in the therapy of salpingoophoritis in specialized treatment and prophylactic institutions of the city of Tomsk in the period 2010–2014. The analysis included 160 case histories. The structure of prescriptions was evaluated on the basis of the application of anatomical-therapeutic-chemical classification and international non-proprietary names (INN), the structural improvement factor K. Gatev was calculated. To quantify the consumption of medications, the calculated daily dose (PDD) was used.

Results. Comparative analysis of antibacterial therapy of salpingoophoritis in hospital before and after the introduction of the “Order of medical care for the profile of «obstetrics and gynecology...”. Leading groups of antibacterial drugs were identified. A comparative analysis of the frequency of assignment of various INN was made. The K. Gatev's coefficient was 0.281. The calculation of the average prescribed daily doses of antibacterial drugs was performed.

Conclusion. The review of the consumption of antibacterial drugs for salpingoophoritis therapy in hospital settings before and after the introduction of the “Order of medical care for the profile “obstetrics and gynecology...”, showed that the range of antibacterial drugs used increased from 18 to 24 INN, mainly due to the inclusion of modern medicines. In the structure of appointments in 2013–2014, the proportion of drugs not recommended for use by the «Order of medical care for the profile of «obstetrics and gynecology» was 37.5%. It was found that PDD clarithromycin, clindamycin and cefotaxime did not meet the recommended dosing regimens specified in the clinical recommendations for antibiotic therapy. The gap between actual clinical practice and existing clinical recommendations determines the need for in-depth pharmacoepidemiological evaluation to identify the causes and develop measures of an organizational and educational nature to optimize the use of medications.

Key words: antibacterial therapy, salpingoophoritis, study of drug consumption.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

Received 28.05.2017

Accepted 06.02.2018

Ushkalova Elena A., DM, Professor, Department of General and Clinical Pharmacology, Peoples` Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation.

Chernikova Larisa Yu., Senior Lecturer, Department of Surgery with the Course of Mobilization Training and Medicine of Catastrophes, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Yevtushenko Irina D., DM, Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Karakulova Elena V., DFSc, Professor, Basic Chair of Management and Economics of Pharmacy, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Fokin Vasiliy A., DTSc, Professor, Department of Medical Biological Cybernetics with a Course in Medical Informatics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Belousov Mikhail V., DFSc, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis of the State Public Health Service, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Chernikova Larisa Yu.**, e-mail: lachernik@rambler.ru.

УДК 616-056.43-097.1-039.5:616.896]-053.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-159–166

Для цитирования: Черевко Н.А., Скирневская А.В., Розенштейн М.Ю., Новиков П.С., Муравейник О.А., Денисов А.А. Особенности специфической гиперчувствительности к пищевым антигенам молочного и злакового кластеров у детей с расстройством аутистического спектра. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 159–166.

Особенности специфической гиперчувствительности к пищевым антигенам молочного и злакового кластеров у детей с расстройством аутистического спектра

Черевко Н.А.¹, Скирневская А.В.³, Розенштейн М.Ю.²,
Новиков П.С.¹, Муравейник О.А.³, Денисов А.А.¹

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

² ImmunoHealth РУС
Россия, 117393, г. Москва, ул. Архитектора Власова, 18

³ Медицинское объединение «Центр семейной медицины» (МО ЦСМ)
Россия, г. Томск, ул. Трифонова, 22Б

РЕЗЮМЕ

Целью работы являлось исследование взаимосвязи между специфической гиперчувствительностью к пищевым антигенам (пАГ), параметрами воспаления и цитокинового профиля у детей с расстройствами аутистического спектра (РАС).

Материалы и методы. В исследовании использовались иммунологические методы определения концентрации специфических иммуноглобулинов к 111 пищевым антигенам в модифицированном методе иммуно-ферментного анализа с применением методологии компании «Иммунохелс», определялась концентрация интерлейкинов (ИЛ) и биохимических показателей в сыворотке крови. Для оценки изменения физического и психического состояния детей с РАС до и после соблюдения рекомендованной элиминационной диеты с исключением пАГ в установленные сроки 0–6 мес родители заполняли специализированную анкету Bernard Rimland and Stephen M. Edelson of the Autism Research Institute (АТЕС).

Результаты. Выявлено, что у детей с РАС статистически значимо чаще встречается гиперчувствительность к пАГ злаковых, молочных продуктов по сравнению с детьми из группы контроля. Степень гиперчувствительности к пАГ связана с результатами АТЕС, оцениваемыми в баллах. Обнаружены различия в показателях цитокинового профиля в исследуемых группах. У детей с РАС повышены значения интерферона (ИФН) γ в сыворотке крови, а также коэффициенты соотношений ИФН γ /ИЛ-10 и ИФН γ /ИЛ-4 по сравнению с этими показателями у детей контрольной группы. Выявленные изменения цитокинового профиля коррелируют с показателями гиперчувствительности к пАГ молочного и злакового кластеров и специализированного теста АТЕС.

Ключевые слова: гиперчувствительность, пищевые антигены, цитокиновый дисбаланс, интерлейкины, расстройства аутистического спектра.

ВВЕДЕНИЕ

По данным мировой статистики, с 2012 г. у каждого 68-го ребенка диагностируется аутизм [1]. В настоящее время развитие аутизма у детей связывают с эпигенетическими и иммунологическими теориями. Многие гены, ассоциированные с развитием расстройств аутистического спектра (РАС), участвуют в регуляции иммунной системы, клеточного и гуморального иммунитета. В ряде публикаций отмечено, что у пациентов с РАС выявляются дисбалансы в синтезе про- и противовоспалительных цитокинов, активности В- и Th2-типа лимфоцитов (лф) [2]. Показано, что обострение во время беременности аллергических и аутоиммунных заболеваний повышает риск развития аутизма у новорожденного [1, 3]. У 40–60% детей с РАС диагностируется IgE-опосредованная сенсibilизация к пыльцевым и пищевым антигенам [4, 5]. В 2016 г. опубликованы сообщения о роли пищевых антигенов (пАГ) в инициации патологических процессов мозга и кишечника, в частности у пациентов с шизофренией диагностирована IgG-опосредованная гиперчувствительность к глютену [6]. Имеются отдельные научные ссылки на аналогичную ситуацию у детей с РАС [4, 7].

Известно, что формирование толерантности к пАГ у человека начинается с момента рождения и поддерживается сложной иерархией иммунной системы кишечника в течение всей жизни. Иммунная система призвана обеспечивать постоянство антигенного состава «своего» с распознаванием, нейтрализацией и элиминацией антигенного «чужого». Антигенные свойства пищевых продуктов, подвергающихся перевариванию в кишечнике, изменяются и зависят, с одной стороны, от активности пищеварительных ферментов, пищеварительной, секреторной и регуляторной функций микробиома, с другой – от результатов рецепторного распознавания иммунокомпетентными клетками кишечника. Частично качественно и количественно преобразованные в тонком и толстом кишечнике пАГ проникают в подслизистый слой и кровь транскитозом с участием секреторного иммуноглобулина (Ig) А, специфических IgG, IgM и также через М-клетки кишечника. Часть из них подвергается распознаванию и презентации антигенных детерминант дендритными клетками в кишечнике, что сопровождается цитокиновой активацией одного из путей клеточного ответа Treg-, Tr1-, Th17-, Th2-, Th1-лф.

Эффективная толерантность к пАГ обеспечивается активацией Treg- и Tr1-лф и высвобождением супрессорных цитокинов TGF β , интерлейкина

(ИЛ) 10, ИЛ-35. Однако процессы нейтрализации и элиминации пАГ, зависящие от их свойств и дозы поступления, вероятно, могут провоцировать различные эффекторные реакции, обоснованные в ранее известных исследованиях [1, 4]. Так, активированные пАГ Th17-лф кишечника опосредуют синтез специфических IgG1, IgG3 к пАГ и образование фиксированных или циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Разрушение таких ЦИК с пАГ сопровождается реакциями фагоцитоза или цитотоксичности (антителозависимой, секреторной, несекреторной). В случае активации пАГ Th2-лф запускаются эффекторные реакции гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) с синтезом специфических IgE, IgG4, участием тучных клеток, эозинофилов. Активированные пАГ Th1-лф опосредуют эффекторные реакции по типу ГЗТ с участием макрофагов.

Цель данного исследования – оценить особенности специфической гиперчувствительности к пищевым антигенам молочного и злакового кластеров, цитокиновый профиль у детей с расстройством аутистического спектра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемым материалом являлась венозная кровь, собранная натошак из локтевой вены у 48 детей с диагнозом РАС и 20 детей контрольной группы, возраст детей (7 ± 2) лет. Все дети родились и проживали в г. Томске. Диагноз РАС детям выставлен в результате специальных обследований, проведенных в городском психоневрологическом диспансере. Критериями включения детей в контрольную группу являлось: отсутствие признаков РАС и иных психических заболеваний, нормальный индекс массы тела, соответствующий возрастной норме, отсутствие аллергических, аутоиммунных, наследственных или приобретенных заболеваний, заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Для оценки общего анализа крови использовался гематологический анализатор MINDRAY (США). Определение содержания С-реактивного белка (СРБ) и общего белка в сыворотке крови проводилось с помощью биохимического анализатора Accent 200 и диагностических наборов «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Оценка специфической IgG-опосредованной гиперчувствительности к 111 пАГ, распределенных по родственным кластерам (восемь видов), проводилась на основе многокомпонентного иммуно-ферментного анализа (ИФА) с использованием методологии компании «Иммунохелс» [8]. При этом сравни-

тельным маркером гиперчувствительности к ПАГ являлась концентрация специфического иммуноглобулина G (sIgG) к конкретному ПАГ. Для сравнительного количественного анализа распределения иммунных откликов по шкале измерений нами была введена величина $\Delta sIgG = sIgG_i - sIgG_{in}$, где $sIgG_i$ – амплитуда i-го иммунного отклика или значение концентрации (sIgG)_i к i-му ПАГ в сыворотке крови пациента, (sIgG)_{in} – величина персонифицированного критерия «норма – аномалия» для конкретного пациента.

Оценка концентрации цитокинов ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН γ в сыворотке крови определялась методом ИФА с использованием наборов «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Для оценки изменения физического и психического состояния детей с РАС родители заполняли специализированную анкету Bernard Rimland and Stephen M. Edelson of the Autism Research Institute (ATEC). В анкете проводилась оценка по четырем разделам: речь и коммуникативность, социализация, сенсорика и познавательные способности, здоровье и поведение. По каждому разделу набирались баллы, которые затем суммировались. При сумме баллов 30 диагностировались незначительные отклонения; 31–40 баллов – умеренная степень аутизма; 41–60 баллов – средняя степень аутизма; 61 и выше – наличие тяжелой степени аутизма [9].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета SPSS Statistics 17.0. При использовании критерия Шапиро – Уилка было выявлено, что распределение концентрации sIgG к ПАГ не подчиняется нормальному закону. Поэтому статистические различия между выборками показателей контрольной и исследуемой группы оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни (U). Сравнение средних величин отклонения от персонифицированного критерия «норма – аномалия» ($\Delta sIgG$) проводили с помощью критерия Стьюдента (t). Сравнение качественных данных, т. е. наличие или отсутствие гиперчувствительности, проводили с помощью точного критерия Фишера (F). Корреляционные взаимосвязи оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (R). Оценка вероятности развития симптомов аутизма (отношение шансов, Odds Ratio (OR)) проведена по формуле Д. Альтмана [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведена качественная и количественная оценка IgG гиперчувствительности к белковым ПАГ кластера злаковых продуктов (ржи, пшеницы,

овса, перловой крупы, гречи, риса, пшени, кукурузы) и глютена. Для каждого исследуемого образца сыворотки была определена индивидуальная референсная величина концентрации sIgG (критерий «норма – аномалия» ($\Delta sIgG$)) по методологии, разработанной компанией «Иммунохелс», позволяющей на основании теории статистических методов обработки результатов определить данный критерий по виду функции распределения – вероятность IgG-иммунных откликов относительно суммарной шкалы измерений [8].

Для качественной оценки факта отклонения от персонифицированного критерия «норма – аномалия» ($\Delta sIgG$)_i был введен критерий положительного отклонения A_p (1 балл) или его отсутствие (0 баллов). Максимально пациент мог набрать 9 баллов, если для всех перечисленных в группе злаковых ПАГ были зафиксированы амплитуды отклонения $\Delta sIgG_i \geq 20$.

В контрольной группе критерий положительного отклонения A_p составил в среднем 1,1 балла, в группе с РАС – 2,39. У 71% детей с РАС были зафиксированы положительные отклонения от персонифицированного критерия «норма – аномалия» A_p для двух и более злаковых продуктов. Максимальный качественный показатель отклонений A_p у детей с РАС 6 баллов. Наиболее часто гиперчувствительность к ПАГ у детей с РАС проявлялась к антигенам: пшеницы (58,1%), ржи (32,3%), глютена (48,4%) и овса (61,3%). Частота встречаемости гиперчувствительности к ПАГ глютена ($F = 0,0077$; $p < 0,05$) и овса ($F = 0,0001$; $p < 0,01$) статистически значимо выше в группе детей с РАС (рис. 1).

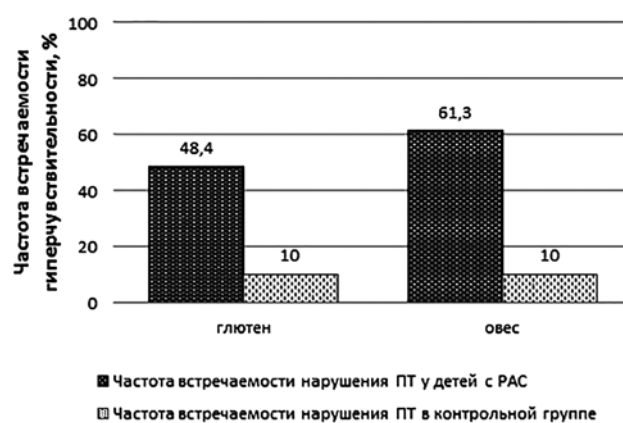


Рис. 1. Частота встречаемости специфической IgG гиперчувствительности к ПАГ глютена и ПАГ овса у детей с РАС и контрольной группе

Fig. 1. Frequency of occurrence of specific IgG hypersensitivity to gluten dietary antigen and oat dietary antigen in children with autism spectrum disorder, compared with the control group

Для оценки количественной выраженности гиперчувствительности использовалась сравнительная оценка значений $\Delta sIgG$ для каждого ПАГ из кластера злаковых продуктов. Количественные показатели $\Delta sIgG$ к ПАГ злаковых продуктов у детей с РАС выражались статистически более значимыми концентрациями $\Delta sIgG$, чем соответствующие величины у детей группы контроля. Наиболее высокие значения $\Delta sIgG$ зафиксированы к ПАГ глютена, ржи, овса, пшеница, перловой крупы. При этом установлено, что самые высокие статистически значимые отклонения $\Delta sIgG$ между изучаемыми группами относятся к ПАГ овса ($t = 2,87$; $p = 0,001$) и АГ глютена ($t = 2,49$; $p = 0,017$). Как известно, наибольшее количество глютена содержится в пшенице, затем – во ржи, ячмене и овсе. Важно также отметить, что 90% детей с РАС, участвующие в исследовании по данным медицинских анкет, заполненных родителями, более одного года употребляли злаки, включая пшеницу, рожь, овес, свободные от глютена. Но, как известно, у пшеницы, ржи, овса, исключая глютен, выделено еще до 20 антигенных детерминант. Также существует проблема скрытого глютена в продуктах, например колбасе, сыре, конфетах, чипсах, картофеле фри, пищевых красителях и т.д.

По итогам заполненных анкет АТЕС, позволяющих ввести оценки показателей физического и психического состояния в группе детей с РАС, установлено, что шанс более высоких баллов имели дети с диагностированными признаками гиперчувствительности к ПАГ овса. В присутствии диагностированных признаков гиперчувствительности $\Delta sIgG$ к ПАГ овса вероятность иметь более высокие баллы АТЕС увеличивалась в 14,3 раз ($OR = 14,3$; $1,6-127,2$; $p < 0,05$). Это связано, скорее всего, с тем, что родители из рациона детей с РАС исключали чаще пшеницу и рожь, чем овес.

При комплексном анализе показателей крови в группе детей с РАС выявлена положительная корреляция значений IgG гиперчувствительности к ПАГ пшеницы, скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и концентрации СРБ ($R = 0,315$ и $0,420$ соответственно, $p < 0,05$), а также концентрации ИЛ-6 и СРБ ($R = 0,455$; $p < 0,02$).

Показано, что абсолютное количество лимфоцитов в общем анализе крови и показатели IgG гиперчувствительности к ПАГ ржи и глютена у детей с РАС коррелируют ($R = 0,435$ и $0,405$ соответственно; $p < 0,05$). Установленные корреляционные связи у детей с РАС отражают вероятность потенциального острофазного ответа с участием СРБ, ИЛ-6, СОЭ, значений тестов АТЕС с появлением клинических жалоб ухудшения течения

основного заболевания в случае повышения частоты употребления ПАГ пшеницы, ржи и овса в рационе. Это отмечено в медицинской анкете родителями при возвращении к употреблению данных ПАГ после элиминационной диеты (от 1 до 3–6 мес). Выделенные нами показатели СРБ, ИЛ-6, количества лимфоцитов, СОЭ потенциально связаны с активацией белков комплемента, образованием иммунных комплексов, судьбой их элиминации, изменениями показателей реологии крови и в целом с признаками иммунного воспаления, инициированного пищевыми антигенами.

Получена отрицательная корреляционная зависимость между показателями $\Delta sIgG$ к ПАГ глютена ($R = -0,358$) и $\Delta sIgG$ к ПАГ гречихи ($R = -0,349$) с показателями гематокрита (НСТ) в общем анализе крови (ОАК). Полученные данные позволяют судить о том, что процессы, определяющие факт иммунного конфликта, связанного с повышенным синтезом специфических IgG к белкам АГ злаковых (гречихи, глютена), могут потенциально влиять на показатели процессов дыхания и синтеза в клетках красной крови, изменять экспрессию рецепторов эритроцитов Fc γ к IgG и функции в элиминации ЦИК в составе с ПАГ [11].

Полученные нами данные не только согласуются с мнением авторов, но и дополняют выводы о связи между диагностированными лабораторными показателями IgG гиперчувствительности к ПАГ злаковых и глютена с такими заболеваниями, как шизофрения, психические расстройства [4, 12, 13], а также аутоиммунный тиреоидит [14], синдром раздраженной кишки [15], а в данном случае – с РАС.

У детей с РАС была проведена также оценка IgG гиперчувствительности к ПАГ продуктов молочного кластера: коровьего молока, козьего молока, сливочного масла, молочной сыворотки, сыров швейцарских, чеддера, плавленого, творога, йогурта, АГ белков казеина (всего в группе 10 ПАГ).

В группе детей с РАС критерий An зарегистрированной гиперчувствительности составил в среднем 4,3 ед. В контрольной группе детей An = 2,2. У 32% детей с РАС An составил 8–10 ед. Наиболее частые проявления IgG-опосредованной гиперчувствительности наблюдались для ПАГ сливочного масла (54,8%), творога (51,6%), цельного коровьего молока (48,4%), казеина (38,7%). При количественной оценке выраженности IgG гиперчувствительности в группе детей с РАС средние значения $s\Delta IgG$ к ПАГ казеина превысили в шесть раз аналогичные значения у детей в контрольной группе.

По итогам заполнения пациентами анкет АТЕС выявлена положительная корреляционная связь между количеством набранных суммарных баллов теста, соответствующих более выраженным изменениям физического и психического состояния, со значениями $s\Delta IgG$ к пАГ белков казеина ($R = 0,456$), творога ($R = 0,424$), плавленого сыра ($R = 0,406$), швейцарского сыра ($R = 0,404$), йогурта ($R = 0,379$). Дети с РАС, набравшие по итогам теста АТЕС более 60 баллов (наиболее тяжелая степень аутистических расстройств), одновременно имели самые высокие значения показателей $s\Delta IgG$ к пАГ казеина и швейцарского сыра (рис. 2).

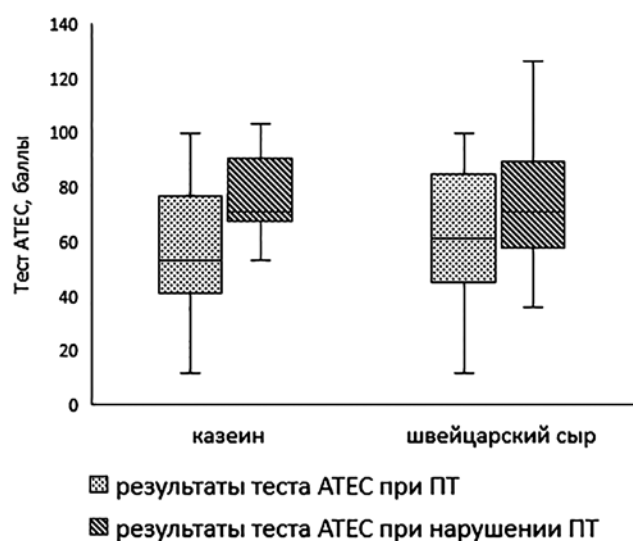


Рис. 2. Количество баллов, полученных детьми при прохождении теста АТЕС, в зависимости от наличия или отсутствия гиперчувствительности к пАГ швейцарского сыра и казеина

Fig. 2. The number of points received by children during the ATEC test, depending on the presence or absence of hypersensitivity to the Swiss cheese and casein dietary antigens

Данный факт свидетельствует о том, что у детей с РАС имеется выраженная специфическая IgG гиперчувствительность к пАГ казеина. В составе швейцарского сыра количество белка казеина считается незначительным по сравнению со всеми кисломолочными продуктами изучаемого кластера. В современных научных исследованиях имеются указания на роль антигенов казеина и влияние белка казеоморфина на скорость передачи нервных импульсов, обеспечивающих когнитивные функции мозга, а также на связь между лабораторными показателями диагностированной гиперчувствительности к пАГ коровьего молока и казеина с развитием сахарного диабета у

детей [16], аутоиммунного тиреоидита [14], мигрени у взрослых [17].

При исследовании концентрации цитокинов в исследуемых группах детей установлено, что у детей с РАС концентрация сывороточного ИФН γ выше, а ИЛ-4 ниже, чем в контрольной группе (рис. 3).

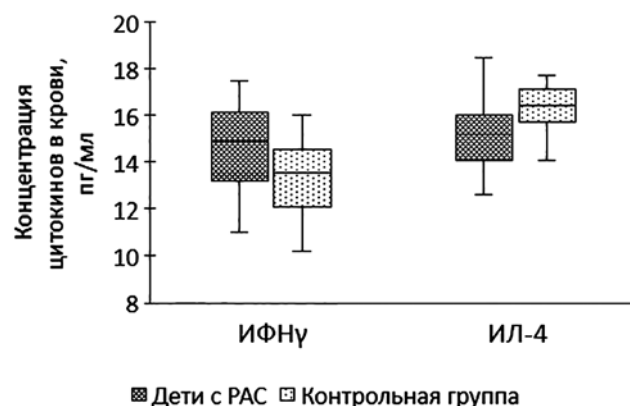


Рис. 3. Сравнение концентрации цитокинов у детей с РАС и контрольной группе

Fig. 3. Comparison of the concentration of cytokines in the group of children with autism spectrum disorder and in the control group

Как известно, ИЛ-4 является основным цитокином Th2-типа иммунного ответа, влияет на активацию В-лф и переключение плазматическими клетками синтеза иммуноглобулинов в пользу IgE, связанного с запуском эффекторных реакций ГНТ на АГ. У детей в группе с РАС клинических и лабораторных реакций ГНТ на пАГ молочных и злаковых продуктов не зафиксировано. Установлено, что концентрация ИЛ-4 в сыворотке крови детей с РАС находится в отрицательной корреляционной зависимости с общим количеством молочных продуктов, к которым выявлена IgG-гиперчувствительность ($R = 0,322$; $p = 0,029$). Полученные значения концентраций ИФН γ в сыворотке крови у детей с РАС находятся в положительной ($R = 0,369$; $p = 0,007$), а для ИЛ-4 в отрицательной корреляционной зависимости ($R = -0,308$; $p = 0,026$) с общим количеством продуктов (пАГ), к которым диагностирована специфическая IgG гиперчувствительность. Соотношение сывороточных показателей концентраций ИФН γ /ИЛ-4 у детей с РАС оказалось статистически выше по сравнению с аналогичными показателями у детей в группе контроля ($U = 135,5$; $p = 0,001$).

Принимая во внимание, что ИФН γ является прямым антагонистом синтеза ИЛ-4 и активности Th2-иммунного ответа, мы предполагаем, что

у детей с РАС ИФН γ играет роль основного провоспалительного цитокина, связанного с активацией Th1-типа иммунного ответа. Известно, что с активностью ИФН γ и ИЛ-6 связаны переключение синтеза иммуноглобулинов в пользу IgG1 и IgG3, активация макрофагов, развитие цитотоксических и аутоиммунных реакций.

Различий в концентрации ИЛ-10 в сыворотке крови у детей с РАС и контрольной группы не выявлено (17,9 (16,7–19,2) и 17,5 (16,3–19,7) пг/мл соответственно, $U = 293,0$; $p > 0,05$). ИЛ-10 является цитокином с противовоспалительными свойствами и регуляторно-супрессорным влиянием на активность как клеточного, так и гуморального иммунного ответов. Синтезируется Th2-лф регуляторными Tr1- и Treg-лф. ИЛ-10 играет важную роль в поддержании процессов пищевой толерантности в кишечнике [18].

В контрольной группе детей установлена положительная корреляционная зависимость показателей концентрации ИЛ-10 и значениями IgG к пАГ ржи и казеина. Этот примечательный факт, по нашему мнению, отражает компенсацию контроля пищевой толерантности к данным антигенам в условиях особенностей пищевого рациона у этих детей.

Соотношение показателей концентрации ИФН γ /ИЛ-10 у детей с РАС было статистически выше по сравнению с группой контроля ($U = 200,5$; $p = 0,025$) (рис. 4).

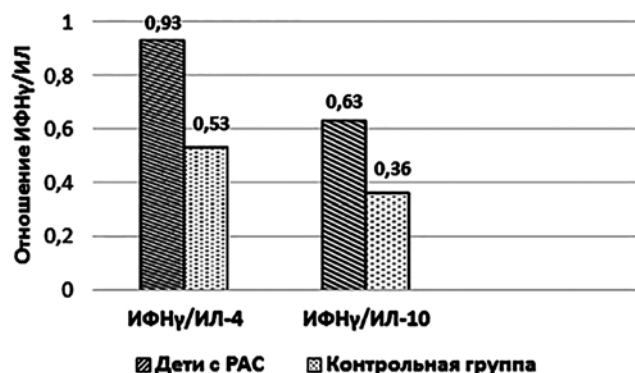


Рис. 4. Сравнение соотношений полученных концентраций ИФН γ /ИЛ-4 и ИФН γ /ИЛ-10 у детей с РАС и контрольной группе

Fig. 4. Comparison of the ratios of IFN γ /IL-4 and IFN γ /IL-10 concentrations obtained in the control group and in the group of children with autism spectrum disorder

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у детей с РАС триггерами хронического иммунного воспаления являются пищевые антигены молочного и злакового кластеров, оказывающие влияние на показатели физи-

ческого и психического состояния, оцениваемого в баллах теста АТЕС. Изменение специфической гиперчувствительности к этим пищевым антигенам сопровождается установленным дисбалансом провоспалительных цитокинов ИФН γ , соотношения ИФН γ /ИЛ-10 и ИФН γ /ИЛ-4.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Черевко Н.А. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, анализ и интерпретация данных. Скирневская А.В. – анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи к печати. Розенштейн М.Ю. – окончательное утверждение для публикации рукописи. Новиков П.С. – анализ и интерпретация данных. Муравейник О.А., Денисов А.А. – анализ данных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Медицинское объединение «Центр семейной медицины» (г. Томск), ImmunoHealth Int. (США).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Родители всех детей, принявших участие в исследовании, подписывали информированное согласие.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Deborah L. Christensen, PhD; Jon Baio, EdS; Kim Van Naarden Braun, PhD; Deborah Bilder, MD; Jane Charles, MD; John N. Constantino, MD; Julie Daniels, PhD; Margaret S. Durkin, PhD; Robert T. Fitzgerald, PhD; Margaret Kurzius-Spencer, PhD; Li-Ching Lee, PhD; Sydney Pettygrove, PhD; Cordelia Robinson, PhD; Eldon Schulz, MD; Chris Wells, PhD; Martha S. Wingate, DrPH; Walter Zahorodny, PhD; Marshalyn Yeargin-Allsopp, MD. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. DOI: 10.15585/mmwr.ss6503a1.
2. Paul Ashwood, Paula Krakowiak, Irva Hertz-Picciotto, Robin Hansen, Isaac N. Pessah, Judy Van de Water. Altered T-cell responses in children with autism. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011; 25: 840–849. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.09.002.
3. Ashwood P., van de Water J. Is autism an autoimmune disease? *Autoimmunity Reviews*. 2004; 3 (7–8): 557–562. DOI: 10.1016/j.autrev.2004.07.036.
4. Buie T. The relationship of autism and gluten. *Clinical Therapeutics*. 2013; May; 35 (5): 578–583. DOI: 10.1016/j.clinthera.2013.04.011.

5. Scott H. Sicherer, Anne Mucoz-Furlong, James H. Godbold, Hugh A. Sampson. US prevalence of self-reported peanut, tree nut and sesame allergy: 11-year follow-up. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125 (6): 1322–1326. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.03.029.
6. Emily G. Severance, Kristin L. Gressitt, Armin Alaedini, Cathrin Rohleder, Frank Enning, J. Malte Bumb, Juliane K. Myller, Emanuel Schwarz, Robert H. Yolken, F. Markus Leweke. IgG dynamics of dietary antigens point to cerebrospinal fluid barrier or flow dysfunction in first-episode schizophrenia. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015; Feb.; 44: 148–158. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.09.009.
7. Fran Lowry. Gluten Sensitivity Linked to Autism. *Medical News, Psychiatry*. 2013; July; 05.
8. Розенштейн А.З., Розенштейн М.Ю., Кондаков С.Э., Черевко Н.А. Диагностика пищевой гиперчувствительности, опосредованной иммунопатологическими реакциями III типа. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 150–152. [Rosenstein A.Z., Rosenstein M.Yu., Kondakov S.E., Cherevko N.A. Diagnosis of food hypersensitivity mediated through type III immunopathological reactions. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal – Russian Journal of Immunology*. 2015; 150–152 (in Russ.)].
9. Rimland B., Edelson M. Autism treatment evaluation checklist. San Diego: Autism Research Institute, 1999.
10. Altman D.G. Practical Statistics for Medical Research. London: Chapman and Hall, 1991: Statistics in Medicine. DOI: 10.1002/sim.4780101015.
11. Bryner M.A., Houwen B., Westengard J., Klein O. The spun micro-haematocrit and mean red cell volume are affected by changes in the oxygenation state of red blood cells. *Clinical and Laboratory Haematology*. 1997; Jun.; 19 (2): 99–103. DOI: 10.1046/j.1365-2257.1997.00223.x.
12. Genuis, Stephen J., Rebecca A. Lobo. Gluten sensitivity presenting as a neuropsychiatric disorder. *Gastroenterology Research and Practice*. 2014; 1–6. DOI: 10.1155/2014/293206.
13. Kalaydjian A.E., Eaton W., Cascella N., Fasano A. The gluten connection: the association between schizophrenia and celiac disease. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2006; Feb.; 113 (2): 82–90. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00687.x.
14. Sategna-Guidetti, Caria; Bruno, Mauro; Mazza, Enrico; Carlino, Alessandra; Predebon, Stefania; Tagliabue, Milena; Brossa, Claudio. Autoimmune thyroid diseases and coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 1998; Nov.; 10 (11): 927–932. DOI: 10.1097/00042737-199811000-00005.
15. Leibold B., Ludvigsson J.F., Green P.H. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ*. 2015; Oct.; 5; 351. DOI: 10.1136/bmj.h4347.
16. Monetini L., Cavallo M.G., Manfrini S., Stefanini L., Picarelli A., di Tola M., Petrone A., Bianchi M., la Presa M., di Giulio C., Baroni M.G., Thorpe R., Walker B.K., Pozzilli P.; IMDIAB Group. Antibodies to bovine beta-casein in diabetes and other autoimmune diseases. *Hormone and Metabolic Research*. 2002; Aug.; 34 (8): 455–459. DOI: 10.1055/s-2002-33595.
17. Enrica Pessione, Simona Cirrincione. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 876. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00876.
18. Brown E.M., Sadarangani M., Finlay B.B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology*. 2013; 14 (7): 660–667. DOI: 10.1038/ni.2611.

Поступила в редакцию 21.08.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Черевко Наталья Анатольевна, д-р мед. наук, доцент, кафедра иммунологии и аллергологии, СибГМУ, г. Томск, Россия.

Скирневская Александра Владимировна, врач, клинично-диагностическая лаборатория, МО ЦСМ, г. Томск, Россия.

Розенштейн Марина Юзэфовна, PhD, врач диетолог-эндокринолог, ImmunoHealth Int., г. Нью-Йорк, США.

Новиков Павел Сергеевич, ординатор, СибГМУ, г. Томск, Россия.

Денисов Андрей Александрович, д-р мед. наук, профессор, кафедра иммунологии и аллергологии, СибГМУ, г. Томск, Россия.

Муравейник Ольга Анатольевна, врач, клинично-диагностическая лаборатория, МО ЦСМ, г. Томск, Россия.

(✉) Черевко Наталья Анатольевна, e-mail: chna@0370.ru.

УДК 616-056.43-097.1-039.5:616.896]-053.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-159–166

For citation: Cherevko N.A., Skirnevskaya A.V., Rosenstein M.Yu., Novikov P.S., Muraveinik O.A., Denisov A.A. Features of specific food hypersensitivity to dairy and cereal products in children with autism spectrum disorder. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 159–166.

Features of specific food hypersensitivity to dairy and cereal products in children with autism spectrum disorder

Cherevko N.A.¹, Skirnevskaya A.V.³, Rosenstein M.Yu.²,
Novikov P.S.¹, Muraveinik O.A.³, Denisov A.A.¹

¹ *Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moskow Tract, Tomsk, 634055, Russian Federation*

² *ImmunoHealth RUS
18, Arkbitektora Vlasova Str., Moscow, 117393, Russian Federation*

³ *Family Medicine Center
22B, Trifonova, Tomsk, 634050, Russian Federation*

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the relationship between food hypersensitivity, inflammation markers and the cytokine profile in children with autism spectrum disorders (ASD).

Materials and methods. The concentration of specific IgG for 111 food antigens was measured via the modified immunological method designed by the ImmunoHealth company. In addition, we performed routine biochemistry tests and immunoassay of interleukins. All children with ASD followed the recommended eliminating diet during 6 months. In order to check their physical and mental condition, their parents completed the autism treatment evaluation checklist (ATEC), both before and after the diet (Bernard Rimland and Stephen M. Edelson of the Autism Research Institute).

In result, we detected the high frequency of hypersensitivity to cereal and dairy products in children with ASD. Moreover, the intensity of hypersensitivity correlated with ATEC score. We also determined that the cytokine profile in children with ASD was different from that in the control group. In particular, the concentration of IFN γ in serum, as well as the IFN γ /IL-10 and IFN γ /IL-4 ratio, were significantly higher in children with ASD. The revealed changes in the cytokine profile correlate with the specific hypersensitivity for cereal and dairy food antigens as well as with ATEC score.

Key words: hypersensitivity, food antigens, cytokine imbalance, interleukins, autism spectrum disorders.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

Medical Association "Family Medicine Center" (Tomsk), ImmunoHealth Int. (USA).

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

Parents of all children who participated in the study signed informed consent.

Received 21.08.2017

Accepted 06.02.2018

Cherevko Natalia A., DM, Associate Professor, Department of Immunology and Allergology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Skirnevskaya Aleksandra V., Medical Laboratory Scientist, Family Medicine Center, Tomsk, Russian Federation.

Rosenstein Marina Yu., PhD, Nutritionist-Endocrinologist, ImmunoHealth Int., New York, USA.

Novikov Pavel S., Medical Resident, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Muraveinik Olga A., Medical Laboratory Scientist, Family Medicine Center, Tomsk, Russian Federation.

Denisov Andrei A., DM, Professor, Department of Immunology and Allergology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Cherevko Natalia A., e-mail: chna@0370.ru.

УДК 576.5:576.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-167-176

Для цитирования: Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Эффекты мезенхимальных стромальных клеток на дифференцировку макрофагов первого типа и их переключение в макрофаги второго типа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 167–176.

Эффекты мезенхимальных стромальных клеток на дифференцировку макрофагов первого типа и их переключение в макрофаги второго типа

Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Известно, что мезенхимальные стромальные клетки (МСК) способны направлять и переключать дифференцировку непримированных макрофагов (Мф) или Мф I типа (М1) в направлении Мф II типа (М2).

Целью работы явилось исследование способности МСК индуцировать переключение М1 в М2 на основе сравнительного анализа эффектов МСК на поляризованные М1 и моноциты, стимулированные гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором к М1-дифференцировке.

Материалы и методы. В условиях, блокирующих прямые межклеточные контакты (Transwell-система), МСК сокультивировали с моноцитами в течение 7 сут или с М1 в течение 48 ч. Характеристика генерированных таким образом Мф включала оценку экспрессии CD206, аллостимуляторной активности в смешанной культуре лимфоцитов и способности секретировать про- и противовоспалительные медиаторы.

Результаты. Сокультивирование МСК и М1 приводило к появлению у них фенотипических (усиление экспрессии CD206) и функциональных (снижение аллостимуляторной активности) свойств М2. В то же время в результате сокультивирования МСК и моноцитов в М1-индуцирующей среде генерировались Мф с выраженной стимулирующей активностью в СКА, аналогичной таковой у М1 (3,45 и 3,4 расч. ед.; $p = 0,46$) и значительно превышающей аллостимуляторную активность М2 (3,45 vs 2,2 расч. ед.; $p = 0,03$). При этом МСК не влияли на уровень экспрессии CD206, а также на характер продукции про- (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12) и противовоспалительных (IL-1-га, IL-4, IL-10) цитокинов, иммунорегуляторных цитокинов (IFN- γ , IL-17) и хемокинов (IP-10, MCP-1, MIP-1b, Rantes, Eotaxin).

Выводы. Способность МСК индуцировать фенотип М2 зависит от стадии дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда. В культурах поляризованных М1 МСК способствуют переключению М1 в М2. В то же время при культивировании МСК с моноцитами в М1-индуцирующей среде формируется популяция М1-подобных Мф, отличающихся высокой аллостимуляторной активностью и характерным для М1 спектром продуцируемых цитокинов и хемокинов.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, моноциты, макрофаги, М1→М2 поляризация, цитокины, хемокины.

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтический потенциал МСК во многом связывают с их противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами. Особый интерес в этом аспекте представляют взаимодействия МСК и клеток моноцитарно-макрофагального ряда, которые по последним данным играют важную роль в опосредовании клинического эффекта МСК *in vivo*. Макрофаги (Мф) характеризуются высокой пластичностью и в зависимости от условий активации и (или) микроокружения могут приобретать функциональный фенотип М1 или М2 [1]. Макрофаги I типа (М1) обладают выраженными провоспалительными свойствами, активируют иммунный ответ по первому типу. Напротив, макрофаги II типа (М2) отличаются противовоспалительной и репаративной активностью и активируют иммунный ответ по II типу [2]. Исследования в моделях сепсиса [3], инфаркта миокарда [4], токсического повреждения легких [5], бронхиальной астмы [6], спинальной травмы [7], ишемии задних конечностей [8] показали, что восстановление функции поврежденного органа и выживаемость животных на фоне трансплантации МСК обусловлены активацией макрофагов фенотипа М2. Аналогичные данные о способности МСК индуцировать фенотип М2 получены также *in vitro* [9]. Поляризующий эффект МСК на Мф проявляется в усилении экспрессии М2-ассоциированных маркеров и фагоцитарной активности, снижении продукции провоспалительных цитокинов и увеличении противовоспалительных и супрессорных факторов (PGE₂, TSG-6, IL-6, IDO, TGF-1) [3, 10–12], а также появлении способности индуцировать регуляторные Т-клетки [13].

Изучение влияния МСК на моноциты/макрофаги представляет интерес не только в прикладном, но также и в патогенетическом аспекте, поскольку многие патологические состояния, связанные с избыточным или длительно персистирующим воспалением и нарушением репаративных процессов, обусловлены дисбалансом клеток М1 и М2 [14–16]. Важно отметить, что большая часть результатов по изучению влияния МСК на Мф получена на экспериментальных животных и клеточных линиях. Исследования у человека немногочисленны и в основном сводятся к анализу взаимодействий МСК с интактными или поляризованными макрофагами. Вместе с тем вопрос о влиянии МСК на моноциты, в частности дифференцировку моноцитов в М2 в условиях М1-индуцирующего микроокружения, остается открытым. Исходя из вышеизложенного, целью настоящего

исследования явилось исследование способности МСК конвертировать фенотип М1 (индуцировать М1→М2 переключение) на основе сравнительного анализа эффектов МСК на поляризованные макрофаги М1 и на моноциты периферической крови, стимулированные к М1-дифференцировке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генерация МСК. Предшественники МСК получали из аспирата костного мозга в результате адгезии моноклеарных клеток (МНК) на поверхности флаконов для культивирования (TPP, Швейцария). После удаления фракции неприлипающих клеток (через 3–5 сут) адгезивные предшественники МСК культивировали до получения монослоя в питательной среде αMEM (Sigma-Aldrich, Германия) с 10% фетальной сыворотки телят (FCS, HyClone) при полном обновлении среды 1 раз в неделю. Диссоциацию МСК при пассировании проводили 0,25%-м раствором трипсин-версена («Биолот», Новая Зеландия, Россия). Полученные таким образом МСК экспрессировали стромальные антигены (CD90, CD105), не экспрессировали линейные антигены (CD3, CD20, CD14) и маркеры гемопоэтических клеток (CD34) и проявляли выраженную супрессорную активность в отношении КонА-стимулированных Т-лимфоцитов (от 46 до 63% супрессии при соотношении МСК : МНК 1 : 2).

Генерация макрофагов. Мф генерировали из моноцитов (прилипающей фракции МНК, $3-5 \times 10^6$ /мл) периферической крови здоровых доноров в 6-луночных планшетах (TPP, Швейцария). Макрофаги I типа генерировали из моноцитов в М1-индукционной среде, состоящей из культуральной среды RPMI-1640, дополненной 0,05 мМ 2-меркапэтанолом, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% раствора незаменимых аминокислот (все реактивы Sigma-Aldrich, Германия), 100 мг/мл гентамицина, в присутствии рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (rhGM-CSF, 50 нг/мл, Sigma-Aldrich, Германия), 10% FCS в течение 7 сут при 37 °С и 5% CO₂. Макрофаги II типа получали по разработанному нами ранее протоколу [17], в соответствии с которым адгезивную фракцию МНК ($3-5 \times 10^6$ /мл) культивировали также в присутствии rhGM-CSF (50 нг/мл) в М2-индукционной среде (RPMI-1640 с вышеупомянутыми добавками, но в условиях депривации ростовых факторов сыворотки – 2% аутоплазмы). Относительное содержание CD206+

Мф в гейте CD14-позитивных клеток оценивали методом двухцветной проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur) с использованием PE-меченных анти-CD20₆ и FITC-меченных анти-CD14 моноклональных антител (BD, США).

Сокультивирование МСК и моноцитов. МСК, находящиеся во «вкладышах» (размер пор 0,4 мкм, Millipore, США), помещали в лунки 6-луночного планшета, где находились моноциты или М1 в М1-индукционной среде, и культивировали при 370 °С в CO₂-инкубаторе в течение 7 сут (для моноцитов) или 48 ч (для М1). Соотношение МСК : Мф составляло 1 : 1 или 1 : 2, что соответствовало дозе МСК с наиболее выраженной иммуносупрессивной активностью. В качестве контроля использовали культуры моноцитов/М1 без МСК, а также генерированные М2. Диссоциацию макрофагов по окончании культивирования проводили с помощью 0,25%-го трипсин-версена с последующим определением фенотипа (CD206) и аллостимуляторной активности.

Аллостимуляторная активность Мф. Способность Мф стимулировать пролиферацию Т-клеток оценивали по интенсивности пролиферативного ответа в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров (1×10^5 /лунку), стимуляторами служили аллогенные М1 или М2 в соотношении МНК : Мф = 10 : 1. Проллиферативный ответ в СКЛ оценивали на 5-е сут радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Индекс стимуляции Мф (ИСМф) в СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Секреторная активность Мф. Концентрацию 27 цитокинов оценивали в 7-суточных супернатантах культур макрофагов методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0. Данные представлены в виде средних значений (M) и стандартной ошибки ($S.E.$), а также в виде медианных значений (Me) и квартильного диапазона ($LQ-UQ$, 25–75% квартили). При сравнении вариационных рядов использовали непараметрические критерии для связанных (критерий Вилкоксона для связанных выборок) и несвязанных (критерий Манна-Уит-

ни) выборок. Различия считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами было показано, что одним из характерных признаков М2 макрофагов является их низкая аллостимуляторная активность в СКЛ [17, 18]. Поэтому для оценки М2-поляризующего эффекта костномозговых МСК на М1 макрофаги мы сравнили аллостимуляторную активность М1 клеток, прекультивированных в течение 48 ч в отсутствие и присутствии МСК (М1+МСК) в Transwell-системе. В качестве дополнительного контроля в нескольких экспериментах использовали М2, полученные по разработанному нами протоколу. Как видно из данных рис. 1, а, способность М1+МСК макрофагов стимулировать пролиферацию Т-клеток была существенно снижена по сравнению с М1 (ИС_{Мф} 1,9 против 3,6 расч. ед.; $p < 0,05$) и аналогична уровню аллостимуляторной активности М2 (2,2 расч. ед.).

Сравнительный анализ экспрессии М2-ассоциированной молекулы CD206 показал, что 48-часовая преинкубация М1 с МСК сопровождалась возрастанием как уровня экспрессии маннозного рецептора (рис. 1, б), так относительного содержания CD206-позитивных макрофагов (рис. 1, в). Полученные данные свидетельствуют о том, что поляризованные М1 в результате взаимодействия с МСК приобретали функциональные (низкая аллостимуляторная активность) и фенотипические (повышенная экспрессия CD206) свойства, характерные для М2.

Убедившись в способности МСК индуцировать переключение М1 в М2 (М1→М2), мы предположили, что аналогичным будет влияние МСК на предшественники макрофагов – моноциты, индуцированные к М1-дифференцировке. В этой экспериментальной серии МСК, находящиеся во «вкладышах», помещали в лунки, на дне которых находились моноциты периферической крови в М1-индукционной среде, и культивировали в течение 7 сут (ММСК). В качестве контроля использовали М1, генерированные без МСК, и в нескольких экспериментах – М2. Характеристика Мф (М1, М2, ММСК) включала оценку морфологии клеток, экспрессии CD206, способности стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и цитокин-секреторной активности Мф.

Из данных рис. 2, а видно, что в 7-суточных культурах М1 преобладали клетки округлой формы, тогда как в культурах М2 – фибробластопо-

добные клетки (рис. 2, а, с). В культурах ММСК присутствовали клетки обеих форм, однако

большинство клеток имело морфологические черты М1 (рис. 2, а, b).

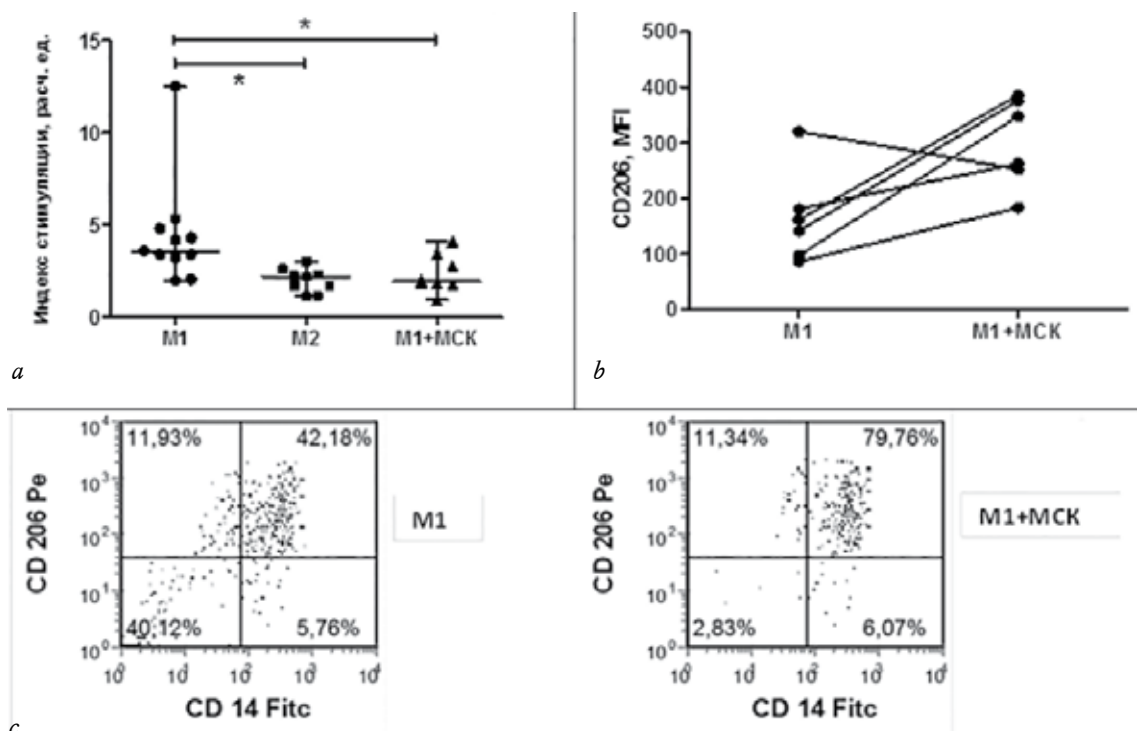


Рис. 1. Сравнительная характеристика макрофагов M1, M1+MCK и M2: *a* – аллостимуляторная активность M1, M1+MCK и M2 в СКЛ. Данные представлены в виде медианных значений и квартильного диапазона индексов стимуляции в СКЛ ($n = 11$). $*p < 0,05$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок; *b* – экспрессия CD206 на M1 и M1, сокультивированных с МСК в течение 48 ч (M1+MCK). Данные представлены в виде индивидуальных значений средней интенсивности флуоресценции (MFI); *c* – представлены индивидуальные DotPlot распределения M1 и M1+MCK макрофагов по флуоресценции FITC-меченных анти-CD14 антител и PE-меченных анти-CD206 антител. Относительное содержание CD206+ CD14+ макрофагов – правый верхний квадрант

Fig. 1. Comparative characteristics of M1, M1+MSC and M2 macrophages: *a* – allostimulatory activity of M1, M1 + MSC and M2 in MLC. Data are presented in the form of median values and the quartile range of stimulation indices in MLC ($n = 11$). $*p < 0.05$ by the Wilcoxon matched pairs test; *b* – expression of CD206 on M1 and M1-, co-cultured with MSC for 48 h (M1 + MSC). The data are presented as individual values of the mean fluorescence intensity (MFI); *c* – individual DotPlot of M1 and M1+MSC macrophages by the fluorescence of FITC-labeled anti-CD14 antibodies and PE-labeled anti-CD206 antibodies are presented. The relative content of CD206 + CD14 + macrophages shown in the right upper quadrant

Анализ экспрессии CD206 на макрофагах, генерированных из моноцитов в присутствии МСК, не выявил ожидаемого увеличения количества CD206-позитивных Мф. Так, видно (рис. 2, b), что интенсивность флуоресценции CD206 в культурах M1 и ММСК значимо не различалась между собой (Me 256 и 237 соответственно), но при этом была достоверно ниже, чем в популяции M2 (Me 399; $p < 0,05$).

В отношении макрофагов, генерированных из моноцитов в присутствии МСК, не было выявлено также характерного для M2 снижения стимуляторной активности в алло-СКЛ. Из данных рис. 2, с видно, что аллостимуляторная активность ММСК была сопоставима с таковой у M1 (ИСМФ

3,45 и 3,4 расч. ед. соответственно) и достоверно превышала значения M2 (ИС 3,45 против 2,2 расч. ед.; $p < 0,05$).

Полученные данные позволяют заключить, что МСК индуцируют M1→M2 в культурах M1, но не проявляют M2-поляризующей активности в отношении моноцитов, стимулированных к M1-дифференцировке.

Оценка способности макрофагов M1 и ММСК секретировать провоспалительные (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12), противовоспалительные (IL1-ra, IL-4, IL-10), иммунорегуляторные (IFN- γ , IL-17) цитокины и хемокины (IP-10, MCP-1, MIP-1b, Rantes, Eotaxin) дополнительно свидетельствует о том, что МСК не оказывают

М2-поляризующего эффекта на моноциты, индуцированные к М1-дифференцировке. Из данных рис. 3 видно, что ММСК значительно не отличались от М1 по уровню продукции исследуемых цитокинов в супернатантах 7-суточных культур. Таким образом, отсутствие снижения продук-

ции провоспалительных и повышения уровня противовоспалительных цитокинов, характеризующих реполяризацию М1→М2, подтверждает, что МСК не оказывают М2-поляризующего действия на моноциты, индуцированные к М1-дифференцировке.

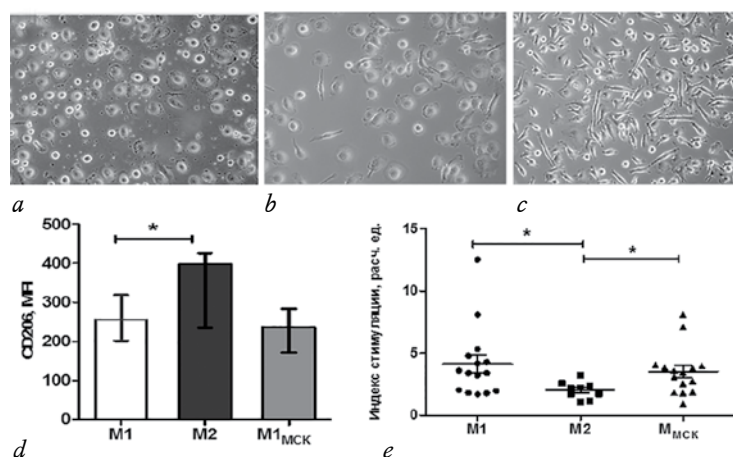


Рис. 2. Сравнительная характеристика макрофагов М1, ММСК и М2: 7-суточные культуры макрофагов М1 (а), ММСК (б) и М2 (с) (нативные препараты, увеличение $\times 250$); д – экспрессия CD206 макрофагами М1 и ММСК. Представлены медианные значения и квартильные диапазоны средней интенсивности флуоресценции (MFI; $n = 5$); е – аллостимуляторная активность макрофагов М1, ММСК и М2 в СКЛ. Индексы стимуляции в СКЛ представлены в виде медианных значений и квартильных диапазонов ($n = 15$). * $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона для связанных выборок)

Fig. 2. Comparative characteristics of M1, MMSC and M2 macrophages: a – 7-day cultures of M1 (a), MMSC (b) and M2 (c) macrophages (native the $\times 250$); b – expression of CD206 by M1 and MMSC macrophages. Median values and the quartile ranges of the mean fluorescence intensity (MFI; $n = 5$) are presented; c – allostimulatory activity of M1, MMSC and M2 macrophages in MLC. The indices of stimulation in MLC are presented toly median values and the quartile ranges ($n = 15$). * $p < 0.05$ (Wilcoxon matched Pairs Test for coupled samples)

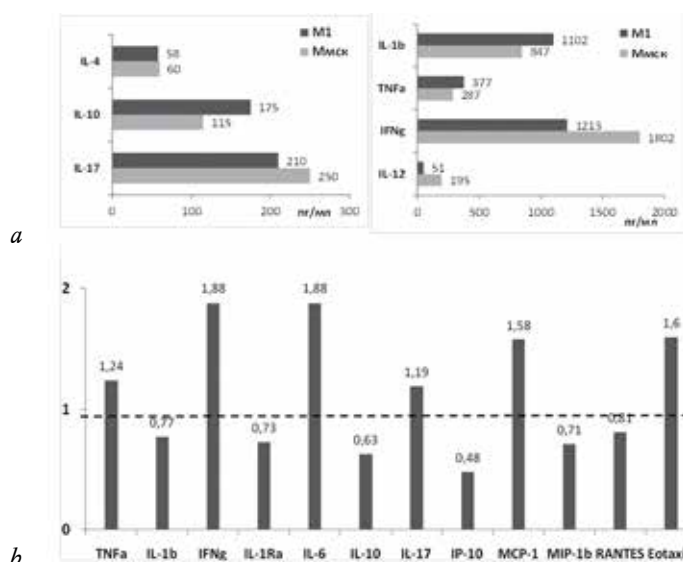


Рис. 3. Цитокин-секреторная активность макрофагов М1 и ММСК: а – уровень продукции противовоспалительных (IL-4, IL-10), IL-17 и провоспалительных (IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-12) цитокинов; б – индексы влияния МСК на продукцию цитокинов (значения >1 свидетельствует о стимуляции продукции, <1 – о снижении продукции).

Fig. 3. Cytokine-secretory activity of M1 and MMSC macrophages: a – the level of production of anti-inflammatory (IL-4, IL-10), IL-17 and pro-inflammatory (IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-12) cytokines; b – Indices of the influence of MSC on the production of cytokines (values > 1 indicates stimulation, < 1 – decrease in production)

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что результатом взаимодействия МСК и моноцитов/макрофагов является изменение свойств генерируемых макрофагов, причем направленность этих изменений зависит от стадии дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Действительно, даже ограниченное по времени (48 ч) воздействие МСК на уже поляризованные М1 приводит к появлению у последних свойств М2-подобных Мф, в частности сниженной аллостимуляторной активности и повышенной экспрессии CD206. В то же время при длительном (в течение 7 сут) воздействии МСК на моноциты, индуцированные к М1-дифференцировке, генерируется популяция М1-подобных макрофагов, отличающихся высокой аллостимуляторной активностью, характерным для М1 спектром продуцируемых цитокинов и отсутствием повышенной экспрессии CD206.

Полученные результаты частично не укладываются в общепринятую концепцию о способности МСК индуцировать фенотип М2. Во многом эти различия обусловлены разными методическими подходами. Так, в первом сообщении о способности МСК генерировать «новый» тип альтернативно активированных Мф [9] влияние МСК изучалось на популяции так называемых неполяризованных, макрофагах М0, образованных из сепарированных клеток CD14⁺ в течение 5–7 сут без каких-либо дополнительных стимулов (ростовых факторов). Затем последовали работы с использованием Мф мышей (LPS-стимулированные перитонеальные Мф; М-CSF-стимулированные костномозговые Мф), которые при культивировании в присутствии М1/М2-индуцирующих стимулов и костномозговых мышечных МСК приобретали черты М2 в виде снижения продукции провоспалительных цитокинов и повышения продукции IL-10 [19, 20].

В данном исследовании МСК индуцировали М1→М2 только при взаимодействии с М1, что проявлялось снижением их стимуляторной активности в алло-СКЛ и повышением экспрессии CD206, в то время как в отношении моноцитов, стимулированных к М1-дифференцировке, МСК не проявляли М2-поляризующей активности. Аналогичные результаты были получены А.В. Vasandan с соавт., изучавшими поляризующее влияние МСК на клетки линии моноцитов человека THP-1, которая является общепринятой моделью для изучения дифференцировки и поляризации Мф человека [21]. Авторы показали

зависимость эффекта МСК от стадии дифференцировки отвечающих клеток. Так, при взаимодействии с недифференцированными клетками линии THP-1 (т.е. с моноцитами) и РМА-активированными клетками THP-1 (т.е. с недифференцированными макрофагами М0) МСК проявляли М1-поляризующую активность, усиливая дифференцировку моноцитов и макрофагов М0 в М1. Сокультивирование уже поляризованных М1 с МСК сопровождалось ослаблением М1- и усилением М2-активности Мф, что согласуется с нашими данными о способности МСК изменять функциональный фенотип зрелых, дифференцированных Мф в М1→М2.

Однако эффекты МСК на моноциты периферической крови человека в этой работе не изучались. В тех единичных работах, где оценивалось влияние МСК на моноциты человека, использовались совершенно разные методические подходы (различные дифференцирующие стимулы и сроки культивирования). Так, S.M. Melief с соавт. показали, что добавление МСК к культурам моноцитов, стимулированных IL-4 и GM-CSF, направляет дифференцировку моноцитов в IL-10-продуцирующие Мф [11]. В работе M. Francois с соавт. сокультивирование МСК и моноцитов CD14⁺ в течение 4 сут приводило к формированию CD206⁺/IL-10-продуцирующих Мф. Однако в такой экспериментальной системе моноциты культивировались без какого-либо дифференцирующего стимула [12]. Взаимодействие МСК и моноцитов изучали L. Chiossone с соавт., однако в этой работе для дифференцировки моноцитов авторы использовали М-CSF, широко известный индуктор М2-дифференцировки и показали М2-поляризующее влияние МСК в таких условиях [22]. Важным результатом последнего исследования, на наш взгляд, можно считать данные о возможности реполяризации полученных М2 с образованием М1-провоспалительных Мф при стимуляции клеток через Toll-подобные рецепторы (TLRs). Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что если в отношении мезенхимально-макрофагальных взаимодействий можно с полной определенностью говорить о М2-поляризующем эффекте МСК, то в отношении моноцитов такой однозначности в настоящее время не существует. Имеющиеся немногочисленные данные достаточно противоречивы и свидетельствуют о способности МСК направлять дифференцировку моноцитов в макрофаги как фенотипа М1, так и М2.

В завершении следует отметить, что данные о М2-поляризующем влиянии МСК на Мф не могут быть автоматически перенесены и применены к

взаимодействиям МСК – моноциты как минимум по двум причинам. Во-первых, существуют процессы (например, фагоцитоз апоптотических клеток, или эффероцитоз), которые четко свидетельствуют о функциональных различиях моноцитов и Мф. Так, для моноцитов четко показано возрастание LPS-индуцированной продукции IL-10 при инкубации с апоптотическими клетками [23, 24]. В то же время эффект эффероцитоза в культурах неполяризованных макрофагов M0 и M1 не так однозначен: имеются данные об увеличении продукции IL-10 [25, 26], отсутствии изменений [27] и о снижении уровня IL-10 [23, 24, 28]. Во-вторых, вопреки давно устоявшемуся мнению о происхождении всех Мф из моноцитов в костном мозге, сегодня считается, что тканевые резидентные Мф происходят из желточного мешка и функционируют независимо от костного мозга, в то время как циркулирующие Мф дифференцируются и пополняются из пула моноцитов костного мозга [29, 30]. Однако каковы бы ни были взаимоотношения МСК с клетками моноцитарно-макрофагального ряда, можно с уверенностью говорить о способности МСК модулировать реакции врожденного иммунитета, в том числе посредством регуляции процессов дифференцировки моноцитов и переключения макрофагов M1 в M2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение способности МСК индуцировать фенотип M2 моноцитов (макрофагов) выявило зависимость эффекта МСК от стадии дифференцировки отвечающих клеток. При культивировании МСК с моноцитами в M1-индуцирующей среде формируется популяция макрофагов с морфологическими, фенотипическими и функциональными признаками M1. В то же время результатом взаимодействия МСК и поляризованных M1 является генерация M2 с повышенной экспрессией CD206 и сниженной аллостимуляторной активностью.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р. – разработка концепции и дизайна; Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Баторов Е.В., Тихонова М.А., Черных Е.Р. – анализ и интерпретация данных; Шевела Е.Я., Сахно Л.В. – подготовка текста статьи; Останин А.А., Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 953–964.
- Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 816460. DOI: 10.1155/2015/816460.
- Németh K., Leelahavanichkul A., Yuen P.S., Mayer B., Parmelee A., Doi K., Robey P.G., Leelahavanichkul K., Koller B.H., Brown J.M., Hu X., Jelinek I., Star R.A., Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine.* 2009; 15 (1): 42–49. DOI: 10.1038/nm.1905.
- Ben-Mordechai T., Holbova R., Landa-Rouben N., Har-el-Adar T., Feinberg M.S., Abd Elrahman I., Blum G., Epstein F.H., Silman Z., Cohen S., Leor J. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *Journal of the American College of Cardiology.* 2013; 62 (20): 1890–1901. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.07.057.
- Gupta N., Su X., Popov B., Lee J.W., Sericov V., Matthay M.A. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J. Immunol.* 2007; 179: 1855–1863.
- Braza F., Dirou S., Forest V., Sauzeau V., Hassoun D., Chesné J., Cheminant-Muller M.A., Sagan C., Magnan A., Lemarchand P. Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma. *Stem Cells.* 2016; 34 (7): 1836–1845 DOI: 10.1002/stem.2344.
- Cheng Z.J., He X.J. Anti-inflammatory effect of stem cells against spinal cord injury via regulating macrophage polarization. *J. Neurorestoratol.* 2017; 5: 31–38. DOI:10.2147/JN.S115696.
- He S., Gleason J., Fik E., DiFiglia A., Bharathan M., Morschauser A., Djuretic I., Xu Y., Krakovsky M., Janakovic V., Buensuceso C., Edinger J., Herzberg U., Hofgartner W., Hariri R. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal-like Cells (PDA-002) Enhance Angiogenesis via T Cell-Dependent Reprogramming of Macrophage Differentiation. *Stem Cells.* 2017; Feb. 24. DOI: 10.1002/stem.2598.
- Kim J., Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology.* 2009; 37 (12): 1445–1453. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.09.004.
- Choi H., Lee R.H., Bazhanov N., Oh J.Y., Prockop D.J. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident mac-

- rophages. *Blood*. 2011; 118 (2): 330–338. DOI: 10.1182/blood-2010-12-327353.
11. Melief S.M., Geutskens S.B., Fibbe W.E., Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica*. 2013; 98 (6): 888–895. DOI: 10.3324/haematol.2012.078055.
12. Francois M., Romieu-Mourez R., Li M., Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular Therapy*. 2012; 20 (1): 187–195. DOI: 10.1038/mt.2011.189
13. Melief S.M., Schrama E., Brugman M.H., Tiemessen M.M., Hoogduijn M.J., Fibbe W.E., Roelofs H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells*. 2013; 31 (9): 1980–1991. DOI: 10.1002/stem.1432.
14. Sica A., Erreni M., Allavena P., Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol. Life Sci*. 2015; 72 (21): 4111–1126. DOI: 10.1007/s00018-015-1995-y.
15. Fairweather D., Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J. Autoimmun*. 2009; 33 (3–4): 222–30. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.09.012.
16. Li Y., Lee P.Y., Reeves W.H. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2010; 58(5):355–64. DOI: 10.1007/s00005-010-0093-y.
17. Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Petrovsky Ya.L., Ostanin A.A. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? *Cellular Therapy and Transplantation*. 2010; 2 (6). DOI: 10.3205/ctt-2010-en-000080.01).
18. Sakhno L.V., Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions. *Scand J. Immunol*. 2016; 83 (2): 151–159. DOI: 10.1111/sji.12401.
19. Maggini J., Mirkin G., Bognanni I., Holmberg J., Piazyn I.M., Nepomnaschy I., Costa H., Cacones C., Raiden S., Vermeulen M., Geffner J.R. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. 2010; 5 (2): e9252. DOI: 10.1371/journal.pone.0009252.
20. Cho D.I., Kim M.R., Jeong H.Y., Jeong H.C., Jeong M.H., Yoon S.H., Kim Y.S., Ahn Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp. Mol. Med*. 2014; 46: e70. DOI: 10.1038/emmm.2013.135.
21. Vasandan A.B., Jahnavi S., Shashank C., Prasad P., Kumar A., Prasanna S.J. Human mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci. Rep*. 2016; 6: 38308. DOI: 10.1038/srep38308.
22. Chiossone L., Conte R., Spaggiari G.M., Serra M., Romei C., Bellora F., Becchetti F., Andaloro A., Moretta L., Bottino C. Mesenchymal stromal cells induce peculiar alternatively activated macrophages capable of dampening both innate and adaptive immune responses. *Stem Cells*. 2016; 34 (7): 1909–1921. DOI: 10.1002/stem.2369.
23. Byrne A., Reen D.J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol*. 2002; 168 (4): 1968–1977.
24. Fraser D.A., Laust A.K., Nelson E.L., Tenner A.J. C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol*. 2009; 183 (10): 6175–6185. DOI: 10.4049/jimmunol.0902232.
25. Chung E.Y., Liu J., Homma Y., Zhang Y., Brendolan A., Saggese M., Han J., Silverstein R., Sella L., Ma X. Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity*. 2007; 27 (6): 952–964.
26. Das A., Ganesh K., Khanna S., Sen C.K., Roy S. Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. *J. Immunol*. 2014; 192 (3): 1120–1129. DOI: 10.4049/jimmunol.1300613.
27. Kim S., Elkon K.B., Ma X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*. 2004; 21 (5): 643–53.
28. Xu W., Roos A., Schlagwein N., Woltman A.M., Daha M.R., van Kooten C. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood*. 2006; 107 (12): 4930–4937.
29. Perdiguero E.G., Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat. Immunol*. 2016; 17 (1): 2–8. DOI: 10.1038/ni.3341.
30. Schulz C., Gomez Perdiguero E., Chorro L., Szabo-Rogers H., Cagnard N., Kierdorf K., Prinz M., Wu B., Jacobsen S.E., Pollard J.W., Frampton J., Liu K.J., Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 2012; 336 (6077): 86–90. DOI: 10.1126/science.1219179.

Поступила в редакцию 28.04.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Шевела Екатерина Яковлевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Сахно Людмила Васильевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Тихонова Марина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Баторов Егор Васильевич, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Останин Александр Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

(✉) Шевела Екатерина Яковлевна, e-mail: shevelak@mail.ru.

УДК 576.5:576.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-159–166

For citation: Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Effects of mesenchymal stromal cells on monocyte differentiation to M1 phenotype and M1/M2 macrophage switching. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 15–166.

Effects of mesenchymal stromal cells on monocyte differentiation to M1 phenotype and M1/M2 macrophage switching

Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI) 14, Yadrintsevskaia Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

ABSTRACT

Objective. Mesenchymal stromal cells (MSCs) promote the differentiation of unprimed macrophages (Mp) or classically activated M1 cells towards alternatively activated, M2 macrophages. The aim of the work was to study the ability of MSC to induce M1→M2 switching by comparing the MSC effects on polarized M1 macrophages and monocytes stimulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to M1 differentiation.

Material and methods. MSC were co-cultured with monocytes for 7 days or M1 macrophages for 48 hours in Transwell system to prevent direct cell-to-cell contacts. To characterize generated Mp, classical M2 marker CD206, allostimulatory activity in a mixed lymphocyte culture (MLC), and the ability to secrete pro-/anti-inflammatory mediators were analyzed.

Results. Co-cultivation of MSCs and M1 macrophages led to the appearance of phenotypic (increased expression of CD206) and functional (decrease in allostimulatory activity) features of M2 phenotype. When MSCs were cultured with monocytes in the M1-inducing medium, generated Mp elicited a pronounced stimulating activity in MLC similar to that of M1 (stimulation index 3.45 and 3.4, $p = 0.46$) and significantly higher than allostimulatory activity of M2 cells (3.45 vs 2.2, $p = 0.03$). In addition, MSCs did not influence the expression of CD206, as well as the production of pro- (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12) and anti-inflammatory (IL-1ra, IL-4, IL-10) cytokines, immunoregulatory cytokines (IFN- γ , IL-17) and chemokines (IP-10, MCP-1, MIP-1b, Rantes, Eotaxin).

Conclusions: The ability of MSC to induce the M2 phenotype depends on the stage of differentiation of monocyte/macrophages. MSCs promote M1→M2 switching in cultures of polarized M1 macrophages. In contrast, when MSCs interacted with monocytes in M1-inducing medium, a population of M1-like macrophages is formed with high allostimulatory activity and typical for M1 spectrum of produced cytokines and chemokines.

Key words: Mesenchymal stromal cells, monocytes, macrophages, M1→M2 polarization, cytokines, chemokines.

Received 28.04.2017

Accepted 06.02.2018

Shevela Ekaterina Ya., DM, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Sakhno Ludmila V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Tikhonova Marina A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Batorov Egor V., PhD, Research fellow, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Ostanin Aleksandr A., DM, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Chernykh Elena R., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Shevela Ekaterina Ya.**, e-mail: shevelak@mail.ru.

УДК 614.2:004:005.334

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-177-190

Для цитирования: Липатов В.А., Зайцев И.Г., Северинов Д.А. О проблемах внедрения IT-систем в практическое здравоохранение. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 177–190.

О проблемах внедрения IT-систем в практическое здравоохранение

Липатов В.А., Зайцев И.Г., Северинов Д.А.

Курский государственный медицинский университет (КГМУ)
Россия, г. Курск, 305041, ул. Карла Маркса, 3

РЕЗЮМЕ

В статье рассматривается история развития процесса информатизации в системе здравоохранения Российской Федерации (РФ) с момента формирования предпосылок к внедрению информационных систем до настоящего времени. Обозначен ряд проблем, которые возникли в процессе реализации проектов, направленных на информатизацию и высокотехнологичную поддержку системы здравоохранения РФ, в том числе финансирование таких проектов.

Цель работы заключается в исследовании вопросов развития и внедрения информационных систем в структуру практического здравоохранения РФ по данным, размещенным в свободном доступе. Проанализированы нормативно-правовые акты, в том числе отчеты в сфере здравоохранения, публикации ведущих отечественных и зарубежных исследователей в сфере экономики и управления здравоохранением, аналитические обзоры консалтинговых компаний, таких как «РосБизнесКонсалтинг», Price Waterhouse Coopers (г. Лондон, Великобритания), C-News Analytics (г. Москва, Россия) и делового издания Vademecum (г. Москва, Россия).

Результаты. Процесс информатизации здравоохранения в России идет медленнее, чем это обозначено в правительственных планах. Среди наиболее распространенных и существенных проблем можно выделить следующие: недостаточность финансирования всего процесса информатизации в целом; нерациональное распределение средств бюджета внутри проектов и выбор изначально затратной стратегии информатизации; коррупционные схемы; конфликты заказчиков с исполнителями, из-за которых многие проекты так и остались невыполненными; проблемы менеджмента; несоответствие действующей законодательной базы современным технологиям и тенденциям; недостаточные усилия региональных властей по внедрению медицинских информационных систем.

Заключение. Для более успешной информатизации здравоохранения необходимо стимулирование коммерческого интереса частных IT-компаний для привлечения дополнительных инвестиций. Стоит ужесточить персональную ответственность должностных лиц, курирующих разработки в области информатизации, в случае срыва сроков и невыполнения проекта; усовершенствовать системы госзаказа для привлечения самых высококвалифицированных интеграторов; облегчить процесс взаимодействия менеджеров здравоохранения различных уровней с интеграторами путем снижения бюрократической бумажной нагрузки. На государственном уровне необходимо отдельно уделить внимание оперативному совершенствованию законодательства РФ, которое обеспечивало бы прогрессивное развитие и внедрение информационных технологий в систему здравоохранения.

Ключевые слова: информатизация, здравоохранение, Единая государственная информационная система в сфере здравоохранения (ЕГИСЗ), концепция информатизации, эффективность управления, перспективы развития.

В настоящее время развитие здравоохранения и совершенствование медицинской помощи населению не представляются возможными без использования информационных технологий (ИТ). Современные ИТ-технологии обладают достаточным набором инструментов для оптимизации рутинной работы врачей поликлинической службы, оказания специализированной высокотехнологичной помощи, медицинской реабилитации, а также управленческой деятельности руководителей из числа организаторов здравоохранения, отвечающих за принятие стратегических решений, направленных на развитие всей отрасли в целом [1].

Необходимость внедрения информационных систем в здравоохранение обусловлена рядом объективных причин, которые как прямо, так и косвенно влияют на качество и доступность оказания медицинской помощи населению. Одним из самых значительных обстоятельств такого рода является прогрессирующая динамика первичной заболеваемости [2]. Неизбежным следствием роста первичной заболеваемости населения в Российской Федерации (РФ) является повышение нагрузки на лечебно-профилактические учреждения (ЛПУ). Следует отметить, что у одного пациента благодаря ряду диагностических мероприятий может быть впервые выявлено несколько заболеваний. Тем не менее каждая подобная манипуляция должна найти отражение в медицинской документации (история болезни, карта профилактического осмотра и др.). Это, в свою очередь, приводит к прогрессивному росту общего документооборота: в случае обращения пациентов за помощью впервые и по поводу медицинских услуг, оказываемых в индивидуальном порядке каждому пациенту [3, 4].

Согласно данным отчетов, Министерство здравоохранения РФ в течение пяти последних лет планомерно сокращает коечный фонд стационаров медицинских учреждений [5]. Вследствие чего происходит перераспределение потока пациентов между поликлиниками, дневными стационарами и травматологическими пунктами. Возрастает запланированная лечебная нагрузка на указанные учреждения, что требует повышения доступности и качества оказания медицинской помощи в первичном звене и снижения средних и маржинальных издержек, связанных с высокой тратой времени на заполнение медицинской документации.

В условиях увеличивающейся нагрузки снижается эффективность работы не только одного отдельно взятого специалиста, но и ЛПУ и всей системы здравоохранения в целом. Возрастающая

интенсивность труда приводит к эмоциональному выгоранию специалистов, что отрицательно сказывается на качестве медицинской помощи и ведет к снижению количества положительных откликов среди пациентов. Подобная практика приводит к возникновению «порочного» круга: низкая эффективность порождает неоправданные финансовые траты, которые непременно сокращаются при их аудите (пересмотре и учете), а сокращение финансирования вновь ведет к еще большему прогрессированию неэффективности (рис. 1) [6].



Рисунок. Схема снижения эффективности работы лечебно-профилактических учреждений

Figure. Decrease in the effectiveness of the healthcare facility operation

В связи с этим возникает необходимость разгрузить врача и максимально освободить его рабочее время от рутинного заполнения медицинской документации в пользу непосредственного обследования пациента. С этой целью внедряются программно-аппаратные комплексы. С их помощью медицинский работник может получить доступ к единой государственной (или частной) информационной системе медицинских данных, в которой хранятся персональные данные о конкретном пациенте, что сокращает время на заполнение документации и исключает дублирование информации на различных носителях. Также возможности ИТ позволяют сделать более доступной поликлиническую помощь населению, упростив процедуру дистанционной записи на

прием к врачу, и распределить поток пациентов, тем самым оптимизировав и сократив очереди. Стоит отметить, что исследования и проектные разработки в этом направлении имеют приоритетное место [7].

Для менеджеров здравоохранения, ответственных за распределение ресурсов и определение путей стратегического развития отрасли, фундаментом для принятия их решений являются данные медицинской статистики по целому ряду показателей, имеющих особое значение в рамках программно-целевого метода расходования бюджетных средств [8]:

- медико-демографические: рождаемость, смертность, средняя продолжительность жизни, ожидаемая продолжительность жизни;
- показатели заболеваемости: общая, первичная, по нозологиям;
- показатели, характеризующие стойкую утрату нетрудоспособности.

Однако у медицинской статистики имеется ряд ограничений, обуславливающих искажение объективной картины, таких как мнение граждан РФ, а также большое число ошибок, возникающих при заполнении медицинской документации. Поведенческая стратегия населения в сфере охраны индивидуального здоровья граждан является одним из факторов, влияющих на объективность статистических данных. Так, по данным опроса Всероссийского центра исследования общественного мнения [9], 38% россиян в случае болезни занимаются самолечением и не обращаются в государственную бесплатную поликлинику. Еще 8% обращаются в платные поликлиники, 5% ничего не делают, пуская заболевание на самотек. В конечном итоге часть этих людей попадет в больницу в связи с ухудшением общего состояния, что определенно отразится на показателях заболеваемости. Данную проблему частично можно решить путем внедрения дистанционной записи на прием к врачу, ликвидации очередей и созданием сервиса вызова врача на дом, реализованного при помощи медицинских информационных систем (МИС) [10, 11].

Огромную роль в формировании погрешностей в статистических отчетах играют ошибки, возникающие при заполнении первичной медицинской документации, начиная от кодирования заболевания согласно номенклатурной классификации и заполнения статистических талонов, заканчивая отсутствием процедур проверки точности внесенных данных. По результатам специальных проверок, организованных комитетами здравоохранения субъектов аналитическими центрами, обнаружи-

вается существенная доля допущенных ошибок. Так, в ходе внеплановой проверки первичной документации за период с августа по декабрь 2009 г., проведенной сотрудниками Санкт-Петербургского медицинского информационно-аналитического центра, было выявлено более 7 000 медицинских свидетельств о смерти и рождении, содержащих ошибки в кодировке номенклатурных единиц МКБ-10, что составляет более 20% от общего числа медицинских документов данного субъекта РФ. А в настоящее время ежемесячно выявляется более 1 000 подобных ошибок [7, 12, 13].

Следует отметить, что многими руководителями системы здравоохранения недооценена возможность привлечения дополнительных ресурсов и сокращения средних и маржинальных издержек с помощью МИС, поэтому вся статистическая отчетность до сих пор формируется вручную и на бумажных носителях. При этом МИС обладают большим потенциалом для автоматизации подобной отчетности, снижения количества ошибок при заполнении документации и сокращения времени на формирование статистических результатов деятельности конкретного ЛПУ. Ведение, систематизация, хранение и оборот медицинской документации как раз и являются фундаментальными задачами, которые призваны решать МИС. Так, в результате анализа экономической эффективности внедрения информационных систем было установлено, что автоматизация рабочих мест в медицинском учреждении позволит сэкономить ЛПУ около 48 тыс. рублей на одного сотрудника в год. Затраты на внедрение автоматизированных рабочих мест (АРМ) – программно-технических комплексов автоматизированных систем окупаются в течение 7–8 мес, а производительность труда медицинских работников возрастает в среднем на 14% [14, 15].

Цель данной статьи заключается в исследовании вопросов развития и внедрения информационных систем в структуру практического здравоохранения РФ по данным, размещенным в свободном доступе. Коллективом авторов проанализированы нормативно-правовые акты в сфере здравоохранения, публикации ведущих отечественных и зарубежных исследователей в сфере экономики и управления здравоохранением, аналитические обзоры консалтинговых компаний, таких как «РосБизнесКонсалтинг» Price Waterhouse Coopers (г. Лондон, Великобритания), C-News Analytics (г. Москва, Россия) и делового издания Vademecum (г. Москва, Россия).

Впервые вопрос информатизации здравоохранения в СССР подняли в 1974 г., когда был

сформирован Научный совет по медицинской кибернетике и вычислительной технике при Ученом медицинском совете Министерства здравоохранения Российской Советской Федеративной Социалистической Республики (РСФСР), образованном на базе Второго Московского ордена Ленина Государственного медицинского института имени Н.И. Пирогова (в настоящее время – Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава РФ) [16]. При непосредственном участии членов данного Научного совета и в сотрудничестве с отделом статистики и информатики Минздрава РСФСР были разработаны целевые программы информатизации здравоохранения [17–20].

Концепции, заложенные в республиканской целевой программе «Разработка и внедрение автоматизированных консультативных систем диагностики, прогноза и выбора лечебной тактики при неотложных состояниях на 1979–1982 гг.» (1-я очередь), 1983–1990 гг. (2-я очередь) [21, 22], позволили сформировать основные принципы современной телемедицины. По средствам реализации данной программы была представлена возможность дистанционного привлечения специалистов крупных научно-исследовательских институтов и клиник к решению вопросов о тактике лечения пациентов с неотложными состояниями в лечебных учреждениях более низкого уровня и (или) с нехваткой высококвалифицированных специалистов. Такой подход позволил повысить качество диагностики, обеспечил качество оказания первичной медицинской помощи, помощи на догоспитальном этапе, что способствовало снижению летальности при ведении пациентов с неотложными состояниями с использованием автоматизированных консультативных систем. Пользователями являлись: фельдшерско-акушерские пункты, сельские участковые и центральные районные больницы, скорая и неотложная медицинская помощь, судовые медицинские лазареты и прочие пункты оказания медицинской помощи [17].

Технология реализовывалась следующим образом: Научным советом по медицинской кибернетике и вычислительной технике был разработан набор формализованных карт, содержащих информацию о симптомах, лабораторных данных, синдромах и прочих признаках, характеризующих клиническое состояние больного. По прямой телефонной связи пользователь диктовал номера признаков сотруднику центра консультативной диагностики, который вводил их в указанные карты, загруженные в базу данных электронно-вычислительной машины (ЭВМ), под-

бирающей наиболее вероятный диагноз. Иногда алгоритм ЭВМ предлагал ввести дополнительные признаки (клинические или лабораторные), которые необходимо было добавить для уточнения клинического диагноза или назначения специализированного, узконаправленного метода обследования с целью проведения более детальной дифференциальной диагностики патологических состояний [23].

Проведенный анализ результатов двухлетней работы системы показал, что уровень точности диагностики врачей сельских и районных больниц возрос с 63 до 86%, а при повторном обращении с выдачей дополнительных данных – до 96%. Таким образом, было повышено качество ранней диагностики при urgentных состояниях без усиления ресурсов экстренной помощи. Была зафиксирована прямая зависимость между внедрением консультативной системы диагностики и снижением летальности в детских стационарах г. Ленинграда на 15% [9, 16].

Первая очередь реализации целевой программы «Информатизация здравоохранения России», которая должна была завершиться в 1995 г. [19], представляла собой результат переосмысления возможностей своей предшественницы «Автоматизированной консультативной системы диагностики, прогноза и выбора лечебной тактики при неотложных состояниях». Программа включала в себя уже не только расширенный комплекс программно-аппаратных средств, направленный на помощь практикующим врачам в решении сложных клинических случаев, но и предоставляла возможности для автоматизации документооборота, статистической отчетности и ведения регистров. Разработчики системы стремились охватить федеральный, региональный и районный уровни здравоохранения, разработав для каждого из них программную среду, отвечающую специфике требований каждого из уровней, и обеспечив их полную интеграцию. Была продолжена работа по информатизации процессов диагностики и выбора тактики лечения [24].

В результате реализации программы был внедрен в эксплуатацию Государственный регистр больных сахарным диабетом, проведены работы по внедрению медицинской телекоммуникационной сети Mednet. Разработаны типовые программные формы для обеспечения деятельности ЛПУ в системе обязательного медицинского страхования (ОМС), впервые разработаны автоматические рабочие места (АРМ) для работников аппарата Минздравмедпрома России. В рамках целевой программы впервые была разработана

система планирования и анализа завершенных научно-исследовательских работ, а также введен в эксплуатацию ряд интеллектуальных диагностических систем. Стоит отметить, что развертывание подобных продуктов проходило не повсеместно, а лишь на отдельных пилотных территориях и базе опытных учреждений.

По итогам выполнения целевой программы по информатизации здравоохранения выяснилось, что из 40 запланированных проектов полностью выполнено лишь 19, 15 проектов разработаны, но не введены в эксплуатацию, и 6 проектов не выполнены из-за отсутствия финансирования [25–27].

При проведении анализа основных и общих трудностей, с которыми столкнулись разработчики информационных систем, были выделены следующие: отсутствие централизованного финансирования научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ для выполнения проектов в полном объеме [28, 29]. Это обстоятельство можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, сложной экономической ситуацией в стране (перераспределением ресурсов на военные цели в связи с начавшейся войной в Чечне) и отсутствием жесткой позиции Министерства здравоохранения в вопросе распределения средств между министерствами. Во-вторых, отсутствие координирования деятельности руководителей различных разделов программы, инициативы объединения финансовых ресурсов с привлечением средств ОМС и органов управления здравоохранением субъектов РФ, методических материалов по разработке автоматизированных систем различного назначения, использованию средств телекоммуникаций, информационному обеспечению многоуровневых мониторинговых систем, созданию баз и банков данных. Основным недостатком программы явилась ее слабая ориентация на широкое внедрение в практическое здравоохранение [26].

Следующим этапом внедрения информационных технологий в систему здравоохранения РФ стала программа «Информатизация здравоохранения России на 1996–1998 гг.» [20], которая являлась продолжением программы 1993–1995 гг. В ходе реализации программы 1996–1998 гг. был учтен опыт предыдущей деятельности и скорректирована методика достижения заявленных целей. Но сами цели остались практически неизменными: создание новых информационных технологий на всех уровнях здравоохранения и их интеграция, повышение качества и эффективности оказываемой медицинской помощи насе-

лению с помощью внедрения интеллектуальных медико-технологических систем [10].

Приняв во внимание трудности, с которыми столкнулись разработчики, в особенности недостаток финансирования и отсутствие централизованной схемы распределения средств, а также недостаточная вовлеченность средств субъектов РФ в процесс информатизации, был изменен подход к финансированию этой программы. Финансирование осуществлялось следующим образом: 46% от необходимой суммы – за счет федерального бюджета, 49,6% – субъектов РФ, 1,6% – Российской академии медицинских наук, 2,9% – инвестиции от коммерческих структур.

Однако при подведении итогов программы было установлено, что из 117 запланированных проектов выполнено полностью 73, частично – 16, не выполнено – 28. Самые большие трудности, с которыми столкнулись разработчики, – это резкое ухудшение финансового положения здравоохранения на фоне общеэкономического кризиса, снижение заработной платы научно-исследовательским коллективам, сокращение большого числа научных сотрудников, отсутствие средств на закупку современной вычислительной техники, изменение условий сертификации программных продуктов Минздравом РФ. Значительную роль сыграли и такие недостатки менеджмента проектов, как отсутствие обстоятельных методических рекомендаций по постановке задач и проектированию систем, а также трудности в координации работ с руководящими учреждениями. Были недооценены сроки, силы и средства, необходимые для реализации ряда проектов. Так, из 23 проектов, запланированных к реализации в 1996 г., были выполнены полностью только три, на завершение остальных потребовались дополнительные ресурсы и время [29, 30].

Тем не менее благодаря этой программе был сделан большой шаг в развитии телемедицины и модернизации систем диагностики и лечения. Многие из проектов остаются актуальными и в наши дни.

В настоящее время комплекс программно-аппаратных технологий в составе автоматизированных систем здравоохранения ориентирован на решение следующих задач:

1. Автоматизация функциональной, лабораторной и лучевой диагностики.

2. Консультативная поддержка принятия врачебных решений в клинической медицине (диагностика, лечение, реабилитация) на основе вычислительных процедур и (или) моделирования логики врача.

3. Ведение медицинской документации в электронном виде – электронная медицинская карта, электронная история болезни – с обеспечением расчетов со страховой медицинской организацией и возможностями интеграции информации.

4. Мониторинг здоровья населения по половозрастной и социальной структуре.

5. Мониторинг ресурсов здравоохранения.

6. Поддержка принятия решений организаторами здравоохранения на разных уровнях управления отраслью [31].

7. Контроль качества оказания медицинской помощи населению.

Согласно Приказу Минздрава РФ от 14.07.1999 № 279 «Основные направления развития информатизации охраны здоровья населения на 1999–2002 гг.» [25] были обозначены следующие векторы:

1. Информатизация процессов охраны здоровья населения и оценка общественного здоровья на федеральном и региональном уровнях.

2. Информатизация специализированной медицинской помощи.

3. Информационные технологии учреждений здравоохранения, научных и образовательных учреждений.

4. Введение в эксплуатацию и активное пользование специалистами медико-технологических систем и АРМ, предназначенных для автоматизации процессов сбора данных о состоянии здоровья и поддержки врачебных решений.

5. Телекоммуникационные технологии и глобальные корпоративные сети.

6. Информатизация процесса подготовки кадров и последилового образования.

7. Методологические, методические и правовые аспекты информационных технологий.

Однако данный нормативный акт включал в себя только основные направления работы в сфере информатизации здравоохранения, но не определял ответственных исполнителей, объем работ и главное – сроки его исполнения. Соответственно, отсутствуют и отчеты о его исполнении, поэтому не представляется возможным оценить масштаб проделанной работы и ее эффективность [16].

После принятия Концепции развития телемедицинских технологий в Российской Федерации [17] в 2000 г. деятельность Минздрава в этом вопросе прекратилась вплоть до 2008 г., когда был учрежден Департамент информатизации здравоохранения, но и тогда дело не сдвинулось с мертвой точки. По словам министра здравоохранения Т.А. Голиковой на заседании Совета по развитию информационного общества в России от 8

июля 2010 г.: «...в условиях, когда нам пришлось существенно урезать бюджетные расходы в прошлом году, мы это направление, как финансовое направление, в том числе для поддержки информатизации системы здравоохранения субъектов, исключили». Отсутствие централизованных организационных усилий со стороны Министерства РФ по информатизации здравоохранения создало благоприятную почву для деятельности частных компаний, однако все их усилия носили фрагментарный характер и не способствовали решению данной проблемы [11].

Заседание Совета по развитию информационного общества в России под председательством Президента России Д.А. Медведева послужило отправной точкой для нового витка внедрения высоких технологий в здравоохранение. По итогам заседания совета была принята государственная программа «Информационное общество (2011–2020 гг.)». Эта программа объединяла в себя основные направления работы по созданию информационного общества в России и внедрению высоких технологий во все сферы социальной жизни общества: муниципальное управление, жилищно-коммунальное хозяйство, образование, сельское хозяйство и др., в том числе здравоохранение. Вместе с государственной программой в 2011 г. была утверждена Концепция создания единой государственной информационной системы в сфере здравоохранения, где определялись цель, принципы, общая архитектура, основные этапы создания информационной системы, механизм управления и ресурсного обеспечения ее создания и сопровождения, а также ожидаемый социально-экономический эффект [18].

Основные цели создания Единой государственной информационной системы в сфере здравоохранения (ЕГИСЗ):

– увеличение эффективности управления в сфере здравоохранения на основе информационно-технологической поддержки решения задач прогнозирования и планирования расходов на оказание медицинской помощи;

– совершенствование информационно-технологического обеспечения деятельности медицинских и фармацевтических организаций;

– повышение информированности населения по вопросам ведения здорового образа жизни, профилактики заболеваний, получения медицинской помощи [29].

На реализацию концепции из федерального бюджета планировали выделить 24 млрд рублей. По факту на реализацию программы было выделено 33,4 млрд рублей (72% от этой суммы соста-

вили средства федерального фонда ОМС, а 28% – ассигнования регионов).

Для внедрения ЕГИСЗ был выбран ряд пилотных регионов: Амурская, Белгородская, Волгоградская области, Забайкальский край, Омская, Свердловская области, Ставропольский край. На территории данных регионов необходимо было определить должностных лиц, ответственных за внедрение в субъектах РФ ЕГИСЗ, а также разработать и утвердить план-график выполнения мероприятий, выбрать и подготовить объекты автоматизации. Однако с практической частью ввода в эксплуатацию ЕГИСЗ возникли серьезные проблемы. Из семи пилотных регионов только Волгоградская область представила отчет о завершении трех проектов из 10 запланированных, а остальные шесть регионов не выполнили ни один [26].

Мероприятия в пилотных регионах были разделены на два этапа. Первый (подготовительный) этап включал в себя:

1. Формирование рабочей группы.
2. Определение органа, ответственного за разработку и внедрение методологии выполнения работ.
3. Определение должностного лица и (или) органа, ответственного за программно-аппаратное обеспечение пилотных объектов.
4. Утверждение план-графика пилотирования проекта.
5. Определение количества объектов автоматизации в каждом регионе.
6. Определение количества рабочих мест на объектах автоматизации, которые будут участвовать в опытной эксплуатации.
7. Определение количества рабочих мест, оснащенных необходимым компьютерным оборудованием и общесистемным программным обеспечением (ПО) (доля от планового количества).
8. Определение количества объектов автоматизации, в которых организована внутренняя локальная вычислительная сеть (ЛВС) (доля от планового количества).
9. Определение количества объектов автоматизации, для которых обеспечены широкополосные каналы доступа к аппаратно-программному комплексу Минздравсоцразвития (доля от планового количества).
10. Создание защищенной сети с ЕГИСЗ и включение Удостоверяющего центра в единое пространство доверия.
11. Установка необходимого оборудования для организации защищенной сети.

12. Установка необходимого ПО для организации защищенной сети.

13. Тестирование защищенной сети и подготовка к ее использованию.

14. Формирование в пилотных регионах удостоверяющих центров.

15. Включение удостоверяющих центров в единое пространство доверия.

Второй (эксплуатационный) этап – тестирование информационных систем:

1. Интеграция существующих информационных систем пилотных ЛПУ с системой ведения нормативно-справочной информации.

2. Интеграция сервиса электронной медицинской карты с региональной МИС или МИС ЛПУ, участвующих в пилотировании.

3. Интеграция сервиса административно-хозяйственной деятельности с существующими информационными системами ЛПУ и (или) субъекта РФ.

4. Пилотирование использования федерального сервиса защищенной электронной почты.

5. Пилотирование процесса актуализации справочников в системе ведения нормативно-справочной информации.

6. Опытная эксплуатация пользовательского интерфейса интегрированной электронной медицинской карты (по технологии Software as a Service (SaaS)) для ЛПУ, не имеющих собственной МИС.

7. Опытная эксплуатация пользовательского интерфейса административно-хозяйственной деятельности (по технологии SaaS) для ЛПУ, не имеющих собственных ИС.

8. Опытная эксплуатация пользовательского интерфейса сервиса регистратуры для ЛПУ, не имеющих собственной МИС (по технологии SaaS).

9. Опытная эксплуатация пользовательского интерфейса сетевой консоли управления Exchange Administration Center (по технологии SaaS).

Оценка мероприятий по внедрению ЕГИС на 3 мая 2012 г. показала, что все субъекты РФ выполнили первый этап внедрения – создание организационной и информационно-коммуникационной инфраструктуры.

Сегодня участники рынка называют сразу несколько причин фактического провала второго этапа строительства ЕГИСЗ – коррупционные сюжеты, конфликты заказчиков с подрядчиками, кадровую «чехарду» в IT-департаментах региональных администраций и Минздрава РФ [32]. В 2013 г. Минздрав РФ утвердил план деятельности

ведомства на 2013–2018 гг., включающий показатели по информатизации здравоохранения, которых планируется достигнуть за этот период.

В документе выделены пять ключевых направлений информатизации, которые необходимо достигнуть:

- внедрение медицинской электронной карты;
- создание единого информационного пространства для оказания телемедицинских услуг;
- обеспечение возможности удаленного мониторинга здоровья граждан, входящих в группы риска;
- общедоступная электронная библиотека для врачей;
- дополнительное дистанционное образование для медработников [33].

По планам Минздрава, к концу 2013 г. не менее 26% медицинских карт граждан должны быть представлены в электронном виде в соответствии с едиными стандартами, в 2015 г. – 50%, 2018 г. – 95%. Возможностями телемедицины в 2013 г. должны обладать не менее 95% федеральных медицинских учреждений, в 2015 г. аналогичный показатель запланирован для учреждений на уровне межрайонных центров, 2018 г. – на уровне муниципалитета.

Не менее 10% граждан, входящих в группу повышенного риска, в 2014 г. должны быть обеспечены возможностью дистанционного мониторинга состояния здоровья. В 2015 г. этот показатель должен составлять 70%, в 2017 – 100% [27].

Минздрав в составе Правительства РФ продолжил прилагать усилия для введения в эксплуатацию ЕГИСЗ. Премьер-министр Д.А. Медведев 29 декабря 2014 г. утвердил Концепцию региональной информатизации, которая в медицинской части дублировала цели первого этапа внедрения ЕГИСЗ. Несмотря на видимые усилия, в 2014 г. на эти цели из федерального бюджета было выделено всего 745 млн рублей, что несоизмеримо уступает суммам, которые тратятся на информатизацию здравоохранения в европейских странах.

По данным аналитического центра Vademecum, власти 19 субъектов РФ не собирались тратить средства на развитие и продвижение ЕГИСЗ, так как в их дотационных хозяйствах не было необходимого количества ресурсов на информатизацию здравоохранения. Капиталовложения остальных регионов позволили собрать бюджет в 6,5 млрд рублей, что почти в четыре раза меньше, чем было освоено на первом этапе внедрения ЕГИСЗ [34]. Последствиями снижения финансирования в 2014 г. стал перевод в электронную форму только

14,9% историй болезни вместо запланированных Минздравом (40%) и планируемых (50%) к 2015 г.

Стоит отметить, что внедрением медицинских информационных систем в регионах занимаются частные предприятия, работающие в системе государственного заказа. Круг компаний, работающих на рынке здравоохранения, постепенно сужается [34]. Так, в рейтинге проектов, реализованных в 2010–2011 гг., принимали участие более 30 интеграторов. В 2012 г. их число сократилось до 21, в 2013 – до 13. В 2014 г. осталось 12, среди которых как давно работающие и ориентированные в основном на рынок IT-технологий в здравоохранении компании («Пост Модерн Текнолоджи», «СП.АРМ», «Комплексные медицинские информационные системы» («К-МИС»), «Смарт Дельта Системс», «Сван», «СофтТраст», «Комтек»), так и интеграторы широкого профиля, активно развивающие у себя направление автоматизации медицины («Форс», «Барс Груп» и др.) [35].

Здесь следует учитывать специфику ведения бизнеса компаниями, которые занимаются предоставлением услуг в сфере облачных вычислений. Облачные технологии (вычисления) – концепция в информационно-технологической сфере, согласно которой компьютерные ресурсы, как программные, так и аппаратные, могут быть предоставлены удаленным пользователям в виде интернет-сервиса, способствующего решению технологических задач конкретного клиента. Используя облачные вычисления, можно значительно сократить расходы на инфраструктуру информационных технологий и оперативно реагировать на изменения потребностей в необходимых мощностях, пользуясь вычислительной гибкостью данных услуг [36].

Недоверие к облачным сервисам было продиктовано тем, что не до конца был определен круг задач, которые можно решить с помощью этих технологий. Кроме того, у специалистов возникло множество вопросов относительно средств защиты персональных данных, хранящихся на облачном сервере, и пропускная способность каналов передачи данных. В настоящее время доля облачных сервисов увеличивается [37]. Здесь следует отметить, что в вопросе безопасности персональных данных произошла переоценка угроз. Скопировать личную информацию о пациенте из истории болезни на бумажном носителе значительно проще, чем взломать базу данных ЛПУ и дешифровать закодированные сведения. Это требует гораздо больше специальных навыков и технической подготовки.

Существуют компании-провайдеры, занимающиеся построением собственной серверной инфраструктуры и ее наполнением программными решениями, которые будут потом предоставлены в возмездное пользование клиентам. Провайдеры решают следующие задачи:

- поддержка актуальности и работоспособности компонентов программы;
- поддержка существующей структуры баз данных МИС;
- обеспечение работы с пользовательскими данными, накопленными за весь период эксплуатации МИС;
- обеспечение совместимости с предыдущими версиями программного обеспечения;
- обновление программного обеспечения [38].

В качестве партнеров компаний-провайдеров выступают компании-интеграторы, занимающиеся техническим обеспечением деятельности провайдеров. Интеграторы решают следующие задачи:

- прокладка коммуникаций на объекте клиента для обеспечения функционирования канала связи с достаточной пропускной способностью;
- построение локальной вычислительной сети на клиентском объекте информатизации;
- установка необходимого оборудования на локальном уровне.

Партнерство компаний заключается в том, что интеграторы занимаются материально-техническим оснащением клиента для подключения к серверам провайдера, а провайдеры обеспечивают функционирование программной части облачных вычислений [24].

В 2015 г. на информатизацию здравоохранения было потрачено всего 4,7 млрд рублей, что на 28% меньше, чем годом ранее. В научных кругах бытует шутка, что только по завершению исследования становится ясно, с чего нужно было начинать. Так, в 2015 г. Минздрав опубликовал рекомендации по структурированию работы региональных медицинских информационных систем (РМИС), т. е. спустя 5 лет с момента внедрения ЕГИСЗ. Параметры РМИС были утверждены в конце июня 2016 г., и все интеграторы, занимающиеся внедрением ЕГИСЗ, теперь должны привести все свои программно-аппаратные решения в соответствие с этими рекомендациями. Следует принять к сведению тот факт, что ранее Минздрав отказался [37] от идеи типовой автоматизированной информационной системы ЛПУ и использования для реализации таких проектов только облачных технологий, теперь же были предприняты шаги к созданию единообразия среди программных

продуктов. Также IT-департамент министерства с большим недоверием [26] относится к облачным сервисам и таким технологиям, как IaaS (Infrastructure as a Service), PaaS (Platform as a Service), SaaS (Software as a Service) [29].

Таким образом, из всего вышесказанного следует, что процесс информатизации здравоохранения в настоящее время продвигается достаточно медленно ввиду многих обстоятельств. К основным проблемам, с которыми столкнулось Министерство здравоохранения, в первую очередь, следует отнести:

- недостаточность финансирования процесса информатизации в целом;
- нерациональное распределение средств бюджета внутри проектов, выбор изначально затратной стратегии информатизации с децентрализацией сети и слабым использованием облачных технологий, которые могли бы значительно снизить затраты;

– коррупционные схемы. Согласно данным аналитического обзора компании Price Waterhouse Coopers, наиболее распространены мошеннические действия на этапе отбора поставщиков, заключения и ведения договоров с поставщиками, подачи заявок на участие в тендере и контроле качества выполнения работ;

– конфликты заказчиков (в лице ЛПУ, департаментов здравоохранения регионов) с интеграторами, из-за которых многие проекты так и остались невыполненными;

– проблемы менеджмента (недостатки процесса управления проектами, вследствие которых взаимодействие на разных уровнях их реализации не происходило должным образом);

– несоответствие действующей законодательной базы современным технологиям и тенденциям. На сегодняшний день на уровне нормативно-правовых актов все еще не отрегулирован процесс сбора статистической информации в электронном виде, это привело к тому, что все ЛПУ предоставляют необходимые данные на бумажных носителях. Кроме того, в соответствии с законодательством персональные данные пациентов, которые содержатся в электронной медицинской карте, могут быть переданы только организациям, непосредственно связанным с оказанием медицинской помощи. Для того, чтобы операторы могли передать их в ЕГИСЗ, необходимо разработать и внедрить законодательные проекты, которые позволят определить формат взаимодействия с регулятором. Также электронная история болезни юридически не приравнена к бумажной, поэтому современные доктора про-

должают писать истории болезни от руки (для отчетности в органы исполнительной власти, Прокуратуру субъекта РФ, Росздравнадзор и прочие надзорные органы), пренебрегая написанием электронных;

– недостаточные усилия региональных властей по внедрению МИС;

– отсутствие компьютерной грамотности среди работников здравоохранения [23, 36].

Однако, проанализировав сложившуюся ситуацию, коллективом авторов предложен ряд решений обозначенных проблем, среди которых стимулирование коммерческого интереса частных IT-компаний для привлечения дополнительных инвестиций в процесс информатизации, а также проведение аудита проделанной работы и последующим анализом ее недостатков для более рационального распределения ресурсов, организации и координации деятельности. Стоит ужесточить персональную ответственность должностных лиц, ответственных за внедрение МИС, в случае срыва сроков и невыполнения проекта, усовершенствовать системы госзаказа для привлечения самых высококвалифицированных интеграторов, облегчить процесс взаимодействия менеджеров здравоохранения различных уровней с интеграторами путем снижения бюрократической «бумажной» нагрузки.

На государственном уровне необходимо отдельно уделить внимание оперативному совершенствованию законодательства РФ, которое обеспечивало бы прогрессивное развитие и внедрение информационных технологий, оптимизировать системы сбора медицинской статистики и медицинского документооборота, расширить частно-государственное сотрудничество в этом вопросе (для дальнейшего поиска и привлечения максимального числа заинтересованных лиц для консолидации совместных усилий). С момента создания и попыток внедрения ЕГИСЗ прошло пять лет. Это неуклонно привело к тому, что некоторые технологии, используемые внутри этой системы, начинают устаревать. Соответственно данной системе необходимо совершенствование, в том числе таких кластеров, как модернизация технологии защиты персональных данных, а также повышение пропускной способности каналов передачи данных и внедрение облачных технологий.

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 / REFERENCES

1. Бразовский К.С., Демкин В.П., Пеккер Я.С., Рязанцева Н.В. Технологии телемедицины инструмент оптимизации ресурсов в здравоохранении. *Вестник науки Сибири*. 2012; 2 (3): 117–122. [Brazovskij K.S., Demkin V.P., Pekker Ja.S., Rjazanceva N.V. Technologies of telemedicine the instrument of optimization of resources in health care. *Vestnik nauki Sibiri*. 2012; 2 (3): 117–122 (in Russ.)].
2. Федеральная служба государственной статистики. Российский статистический ежегодник – 2015. Заболеваемость населения. URL: http://www.gks.ru/bgd/regl/b15_13/Main.htm (дата обращения: 05.03.2017). [Population morbidity – 2015. URL: http://www.gks.ru/bgd/regl/b15_13/Main.htm (in Russ.)].
3. Федеральная служба государственной статистики. Российский статистический ежегодник – 2015. Лечение-профилактическая помощь населению. URL: http://www.gks.ru/bgd/regl/b15_13/Main.htm (дата обращения: 15.03.2017). [Treatment-and-prophylactic help to the population – 2015. URL: http://www.gks.ru/bgd/regl/b15_13/Main.htm (in Russ.)].
4. Шулаев А.В., Фатыхов А.М. Организация скорой и неотложной медицинской помощи в условиях информатизации городского здравоохранения. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; 5. [Shulaev A.V., Fatykhov A.M. The organization of ambulance and emergency medical service in the conditions of informatization of urban health care. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; 5 (in Russ.)].
5. План деятельности Министерства здравоохранения Российской Федерации на 2013–2018 годы. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/open/discuss/projects/51> (дата обращения: 12.02.2017). [Plan of activity of the Ministry of Health of the Russian Federation for 2013–2018. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/open/discuss/projects/51> (in Russ.)].
6. Хрустиккая Л.Б., Телешева Т.Ю. XXI век – глобальная информатизация и «мобилизация» медицины и здравоохранения. *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. 2015; 4 (16): 54–69. [Hrustickaja L.B., Telesheva T.Ju. The 21st century – global informatization and «Mobilization» of medicine and health care. *Mezhdunarodnye obzory: klinicheskaja praktika i zdorov'e*. 2015; 4 (16): 54–69 (in Russ.)].
7. Куракова Н.Г. Информатизация как инструмент создания «Саморегулируемой системы организации медицинской помощи»: что нужно, чтобы это положение проекта «Концепции развития системы здравоохранения в Российской Федерации до 2020 г.» реализовалось? *Врач и информационные технологии*. 2009; 2: 9–27. [Kurakova N.G. Informatization as instrument of creation of «The self-regulating system of the organiza-

- tion of medical care»: what is necessary that this provision of the «Concepts of Development of a Health Care System in the Russian Federation till 2020» project was implemented? *Vrach i informacionnye tehnologii*. 2009; 2: 9–27 (in Russ.).
8. Крашенинникова Ю.А. Медицинская статистика как способ легитимации распределения ресурсов в российской системе здравоохранения. Вопросы государственного и муниципального управления. 2011; 4: 28–42. [Krashennnikova Ju. A. Medical statistics as a way of legitimization of distribution of resources in the Russian health care system. *Voprosy gosudarstvennogo i municipal'nogo upravlenija*. 2011; 4: 28–42 (in Russ.).]
 9. Антонов А.И. Демографические аспекты здоровья семьи, личности и общества. Сборник материалов X Международной научной конференции «Сорокинские чтения» «Здоровье российского общества в XXI веке: социологические, психологические и медицинские аспекты». М., 2016: 540. [Antonov A.I. Demographic aspects of health of family, personality and society. *Sbornik materialov X Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii "Sorokinskie chtenija" "Zdorov'e rossijskogo obshhestva v XXI veke: sociologicheskie, psihologicheskie i medicinskie aspekty"*. М. 2016: 540 (in Russ.).]
 10. Гаспарян С.А., Пашкина Е.С. Страницы истории информатизации здравоохранения России. М., 2002: 304. [Gasparjan S.A., Pashkina E.S. Pages of history of informatization of health care of Russia. М., 2002: 304 (in Russ.).]
 11. Егоренков Д.А. Эффективность государственного управления сферой здравоохранения. *Власть*. 2012; 6: 111–115. [Egorenkov D.A. Efficiency of public administration by health sector. *Vlast'*. 2012; 6: 111–115 (in Russ.).]
 12. Андриянова Е.А., Гришечкина Н.В. Проблемы формирования системы электронного здравоохранения в России. *Здравоохранение РФ*. 2012; 6: 27–30. [Andrijanova E.A., Grishechkina N.V. Problems of formation of system of electronic health care in Russia. *Zdravoobranenie RF*. 2012; 6: 27–30 (in Russ.).]
 13. Копаница Г., Цветкова Ж. Европейский опыт и пути развития информатизации системы здравоохранения. *Врач и информационные технологии*. 2013; 1: 49–53. [Korpanica G., Cvetkova Zh. European experience and ways of development of informatization of a health care system. *Vrach i informacionnye tehnologii*. 2013; 1: 49–53 (in Russ.).]
 14. Шадов С.С., Чиповская И.С. К вопросу об эффективности информационных технологий на российском рынке медицинских услуг. *Территория новых возможностей*. 2013; 3 (21): 239–246. [Shadov S.S., Chipovskaja I.S. To a question of efficiency of information technologies in the Russian market of medical services. *Territorija novyh vozmozhnostej*. 2013; 3 (21): 239–246 (in Russ.).]
 15. Шиф А.А., Лушнов М.С., Солдатенкова Ж.М., Березин А.И. Возможные направления автоматизации сбора и обработки данных о показателях демографических процессов. *Фундаментальные исследования*. 2010; 2: 152–156. [Shif A.A., Lushnov M.S., Soldatenkova Zh.M., Berezin A.I. The possible directions of automation of collecting and data processing about indicators of demographic processes. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2010; 2: 152–156 (in Russ.).]
 16. Ковалев В.П. Информационное обеспечение системы здравоохранения. *Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки*. 2011; 3: 911–914. [Kovalev V. P. Information support of a health care system. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Serija: Estestvennye i tebnicheskie nauki*. 2011; 3: 911–914 (in Russ.).]
 17. Концепция развития телемедицинских технологий в Российской Федерации. Приказ Минздрава РФ и РАМН № 344/76 от 27.08.2000. М., 2001: 23. [The concept of development of telemedicine technologies in the Russian Federation. *Prikaz Minzdrava RF i RAMN № 344/76 ot 27.08.2000*. М., 2001: 23 (in Russ.).]
 18. Концепция создания единой государственной информационной системы в сфере здравоохранения. Приказ Минздрава РФ № 364 от 28.04.2011. М., 2001: 19. [The concept of creation of a uniform state information system in health sector. *Prikaz Minzdrava RF № 364 ot 28.04.2011*. М., 2001: 19 (in Russ.).]
 19. Целевая программа информатизации здравоохранения России на 1993–1995 гг. Приказ Минздрава РФ №308 от 30.12.93. М., 1993. [The target program of informatization of health care of Russia for 1993–1995. *Prikaz Minzdrava RF № 308 ot 30.12.93*. М., 1993 (in Russ.).]
 20. Целевая программа информатизации здравоохранения России на 1996–1998 гг. Приказ Минздравмедпрома РФ № 158 от 23.04.96. М., 1996. [The target program of informatization of health care of Russia for 1996–1998. *Prikaz Minzdravmedproma RF № 158 ot 23.04.96*. М., 1996 (in Russ.).]
 21. Республиканская целевая программа «Разработка и внедрение автоматизированных консультативных систем диагностики, прогноза и выбора лечебной тактики при неотложных состояниях» на 1979–1982 гг. (1-я очередь). М., 1979. [The republican target program «Development and Deployment of the Automated Advisory Systems of Diagnostics, the Forecast and the Choice of Medical Tactics at Medical Emergencies» for 1979–1982. М., 1979 (in Russ.).]
 22. Республиканская целевая программа «Разработка и внедрение автоматизированных консультативных систем диагностики, прогноза и выбора лечебной тактики при неотложных состояниях» на 1983–1990 гг. (2-я очередь). М., 1983: 101. [The republican target program «Development and Deployment of the Automated Advisory Systems of Diagnostics, the Forecast and the Choice of Medical Tactics at Medical Emergencies» for 1982–1990. М., 1983: 101 (in Russ.).]

23. Пашкина Е.С., Зарубина Т.В. О программах информатизации здравоохранения России (обзор). *Врач и информационные технологии*. 2009; 6: 46–57. [Pashkina E. S., Zarubina T. V. About programs of informatization of health care of Russia (review). *Vrach i informacionnye tehnologii*. 2009; 6: 46–57 (in Russ.)].
24. Барков С.А., Носуленко С.В. «Облачные технологии» как этап в развитии информационного общества. *Известия Саратовского университета. Социология. Политология*. 2015; 2: 16–24. [Barkov S.A., Nosulenko S.V. «Cloud computing» as a stage in development of information society. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Sociologiya. Politologiya*. 2015; 2: 16–24 (in Russ.)].
25. Основные направления развития информатизации охраны здоровья населения России на 1999–2002 годы. Приказ Минздрава РФ № 279 от 14.07.99. М., 1999: 8. [The main directions of development of informatization of public health care of Russia for 1999–2002. *Prikaz Minzdrava RF № 279 ot 14.07.99*. M., 1999: 8 (in Russ.)].
26. Отчет о ходе выполнения мероприятий по внедрению ЕГИСЗ в пилотных регионах. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/6837-informatsiya-ot-10-maya-2012-g> (дата обращения: 21.02.2017). [Report on the course of performance of actions for introduction of EGIS – It is sensible in pilot regions. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/6837-informatsiya-ot-10-maya-2012-g> (in Russ.)].
27. Стенографический отчет о заседании Совета по развитию информационного общества в России от 8 июля 2010 года. URL: <http://www.kremlin.ru/events/president/transcripts/8296> (дата обращения: 05.02.2017). [The verbatim record about a meeting of Council for development of information society in Russia of July 8, 2010. URL: <http://www.kremlin.ru/events/president/transcripts/8296> (in Russ.)].
28. Данилова Л.В., Борщук Е.А., Чолоян С.Б., Гильмутдинов Р.Г. Проблемы информатизации регионального здравоохранения. *Медицинский альманах*. 2013; 6 (30): 12–15. [Danilova L.V., Borshhuk E.A., Cholojan S.B., Gil'mutdinov R.G. Problems of informatization of regional health care. *Medicinskij al'manah*. 2013; 6 (30): 12–15 (in Russ.)].
29. Обзор: ИТ в здравоохранении 2015. URL: <http://www.cnews.ru/reviews/publichealth2015/> (дата обращения: 11.02.2017). [Review: IT in health care 2015. URL: <http://www.cnews.ru/reviews/publichealth2015/> (in Russ.)].
30. Лукьяненко З.Б., Югова Н.В. Программно-целевой метод в государственном управлении бюджетной сферой. *ARS ADMINISTRANDI*. 2014; 2: 72–78. [Luk'janenko Z.B., Jugova N.V. Program and target method in public administration by the budgetary sphere. *ARS ADMINISTRANDI*. 2014; 2: 72–78 (in Russ.)].
31. Общественное здоровье и здравоохранение: национальное руководство; под ред. В.И. Стародубова, О.П. Щепина и др. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014: 624. [Public health and health care: national leaders; pod red. V.I. Starodubova, O.P. Shhepina i dr. M.: GJeOTAR-Media Publ., 2014: 624 (in Russ.)].
32. Гусев А.В., Эльянов М.М. Региональные программы информатизации здравоохранения: хроника событий 2010–2011 гг. *Врач и информационные технологии*. 2011; 6: 6–14. [Gusev A.V., Jel'janov M.M. Regional programs of informatization of health care: chronicle of events of 2010–2011. *Vrach i informacionnye tehnologii*. 2011; 6: 6–14 (in Russ.)].
33. Пискунов С.В., Чевтаева Н.Г. Государственно-частное партнерство в управлении здравоохранением. *Вопросы управления*. 2015; 3 (15): 38–48. [Piskunov S.V., Chevtaeva N.G. [Public-private partnership in management of health care. *Voprosy upravlenija*. 2015; 3 (15): 38–48 (in Russ.)].
34. Гончарова О. Не за страх, а за софт. *VADEMECUM*. 2016; 1: 23–27. [Goncharova O. Not for fear, and for software. *VADEMECUM*. 2016; 1: 23–27 (in Russ.)].
35. Баранова С.С. Исследования тенденций развития облачных сервисов. *Cloud of Science*. 2014; 3: 517–523. [Baranova S.S. Researches of tendencies of development of cloud services. *Cloud of Science*. 2014; 3: 517–523 (in Russ.)].
36. Бурый А.С. Тенденции развития распределенных информационных систем на основе облачных технологий. *ТДР*. 2013; 6: 160–162. [Buryj A.S. Tendencies of development of the distributed information systems on the basis of a cloud computing. *TDR*. 2013; 6: 160–162 (in Russ.)].
37. Плужник Е.В., Никульчев Е.В., Паяин С.В. Лабораторный экспериментальный стенд облачных и сетевых технологий. *Cloud of Science*. 2014; 1: 79–88. [Pluzhnik E.V., Nikul'chev E.V., Pajain S.V. Laboratory experimental stand of cloud and network computing. *Cloud of Science*. 2014; 1: 79–88 (in Russ.)].
38. Мурзин Ф.А., Батура Т.В., Семич Д.Ф. Облачные технологии: основные модели, приложения, концепции и тенденции развития. *Программные продукты и системы*. 2014; 3 (107): 64–72. [Murzin F.A., Batura T.V., Semich D.F. Cloud computing: main models, applications, concepts and tendencies of development. *Programmnye produkty i sistemy*. 2014; 3 (107): 64–72 (in Russ.)].

Поступила в редакцию 14.02.2017

Утверждена к печати 30.06.2017

Липатов Вячеслав Александрович, д-р мед. наук, профессор, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, КГМУ, г. Курск.

Зайцев Илья Геннадьевич, студент, КГМУ, г. Курск.
Северинов Дмитрий Андреевич, студент, КГМУ, г. Курск.

(✉) Липатов Вячеслав Александрович, e-mail: drli@yandex.ru.

УДК 614.2:004:005.334

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-177-190

For citation: lipatov V.A., Zaytsev I.G., Severinov D.A. About problems of implementation of it-systems in practical health care. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 177-190.

About problems of implementation of it-systems in practical health care

lipatov V.A., Zaytsev I.G., Severinov D.A.

Kursk State Medical University (KSMU)
3, Karl Marx Str., 305041, Kursk, Russian Federation

ABSTRACT

The article presents the background of healthcare system computerization development starting from the time when preconditions for IT systems implementation appeared up to the present moment. It outlines the problems that emerged in the course of implementing the projects aimed at computerizing the RF Healthcare System and providing a high-technology support for it; it features also the indicators related to financial investments into the healthcare information systems. Based on the reports of the authorized agencies the project implementation efficiency is analyzed and solution options for the existing problems are shown. The article reveals development prospects for IT implementation in healthcare.

Objective. Study of IT systems development and incorporation into the practical healthcare structure of the Russian Federation based on the freely available data.

Laws and regulations, including reports in healthcare, publications of Russian and foreign lead researchers in economics and medical administration, analytical reviews of consulting companies such as RBC, Price Waterhouse Coopers (London, UK), C-News Analytics (Russia, Moscow), and Vademecum business magazine (Russia, Moscow).

Results. The healthcare computerization process in Russia is slower than it is set out in the Governmental plans. The most common and significant problems include the following: lack of funding for the computerization process in general; irrational distribution of resources within the projects and selection of a costly computerization strategy from the beginning; corrupt practices; conflicts between customers with the contractors because of which many projects were not implemented; management problems; a clash between the current legislation to modern technologies and trends, lack of efforts aimed at implementation of healthcare information systems on the part of the regional authorities.

Conclusion. To make the healthcare computerization more successful it is required to awaken a commercial interest in the private IT companies to attract additional investment. Personal responsibility of the officials in charge of the computerization should become more stringent in case of a delay in a project or a project failure, the government procurement system should be improved in order to attract the most qualified integrators, the interaction between healthcare managers at various levels with the integrators should be facilitated through reducing bureaucratic «paper» load.

At the state level it is necessary to focus on the operational improvement of the RF legislation to ensure the progressive development and implementation of information technologies.

Key words: computerization, healthcare, the Unified State Healthcare Information System, the concept of computerization, administration efficiency, development prospects.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

Received 14.02.2017

Accepted 30.06.2017

Lipatov Vyacheslav A., DM, Professor, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, KSMU, Kursk, Russian Federation.

Zaytsev Ilya G., Student, KSMU, Kursk, Russian Federation.

Severinov Dmitriy A., Student, KSMU, Kursk, Russian Federation.

(✉) **Lipatov Vyacheslav A.**, e-mail: drli@yandex.ru.

УДК 577.122.015.6:616-008.853.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-191–198

Для цитирования: Лычковская Е.В., Шуваев А.Н., Герцог Г.Е., Труфанова Л.В., Шадрина Л.Б., Семенчуков А.А., Салмина А.Б. Роль молекулярных компонентов депо-зависимого тока Ca^{2+} – белков Stim и Orai – в лимфоцитах. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 191–198.

Роль молекулярных компонентов депо-зависимого тока Ca^{2+} – белков Stim и Orai – в лимфоцитах

Лычковская Е.В., Шуваев А.Н., Герцог Г.Е., Труфанова Л.В.,
Шадрина Л.Б., Семенчуков А.А., Салмина А.Б.

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

РЕЗЮМЕ

В процессе эволюционного развития эукариот сформировался высокоорганизованный механизм поддержания и регуляции гомеостаза внутриклеточного кальция, который является одним из наиболее важных элементов клеточной сигнализации на всех ветвях филогенетического древа. Внутриклеточный кальций контролирует множество физиологических процессов в клетке, формируя сигналы в виде их пространственно-временного распределения, при этом сила сигнала определяет частоту и амплитуду колебаний уровня кальция, поэтому вызывает кратковременные или долговременные ответы клеток. Главным образом кальциевые сигналы в лимфоцитах опосредуют инициацию программы экспрессии генов, которая приводит к пролиферации, дифференциации, продукции провоспалительных цитокинов, также активируют формирование инфламмосом. Вследствие этого кальциевые сигналы опосредуют развитие инфекционного иммунитета, воспалительных ответов, аутоиммунные реакции лимфоцитов.

В основе сигнальных событий лимфоцитов лежит механизм депо-зависимого тока Ca^{2+} . Это центральный путь распространения кальциевых сигналов в клетках в ответ на высвобождение ионов из депо – эндоплазматического ретикула – и последующей активации кальций-селективных каналов в плазматической мембране. Данный механизм обеспечивается согласованной работой белков (stromal interaction molecule) Stim и Orai. Белок Stim представляет собой трансмембранный мономер, который локализуется в мембране эндоплазматического ретикула. Эта молекула является сенсором Ca^{2+} , в ответ на опустошение депо активирует кальций-селективные каналы плазматической мембраны. Данные каналы экспрессируют белки Orai, которые представляют собой тетрамеры. Они формируют пору внутри канала, которая действует в качестве сайта, связывающего Ca^{2+} . Белки Orai активируются тогда, когда с ними связываются белки, сигнализируя о том, что депо истощено.

Таким образом, взаимосвязь и координация белков Stim и Orai обеспечивает депо-зависимый ток Ca^{2+} и вызывает функциональные ответы клетки. Повышение уровня Ca^{2+} индуцирует активацию факторов транскрипции, таких как NFAT, JNK, MEK, CREB, и в большинстве случаев является решающим фактором развития клеток или гибели. В настоящем обзоре рассмотрен механизм депо-зависимого тока Ca^{2+} в лимфоцитах.

Ключевые слова: внутриклеточный Ca^{2+} , лимфоциты, депо-зависимый ток Ca^{2+} , белки Stim и Orai.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе эволюционного развития эукариот сформировался высокоорганизованный механизм поддержания и регуляции гомеостаза внутриклеточного кальция, который является одним из наиболее важных элементов клеточной сигнализации на всех ветвях филогенетического древа [1]. Внутриклеточный кальций контролирует множество физиологических процессов в клетке, передавая сигналы в виде их пространственно-временного распределения, при этом сила сигнала определяет частоту и амплитуду колебаний уровня кальция. Модуляция кальциевых сигналов агонистами представляет собой консервативный механизм сигнальной трансдукции и имеет особое значение в функционировании лимфоцитов. Главным образом кальциевые сигналы в лимфоцитах инициируют программу экспрессии генов, которая приводит к их пролиферации и дифференциации, продукции провоспалительных цитокинов и активации инфламмасом [1–6]. Вследствие этого кальциевые сигналы опосредуют развитие инфекционного иммунитета, воспалительных ответов и аутоиммунные реакции лимфоцитов.

Ключевую роль в сигнальных процессах лимфоцитов играет депо-зависимый ток Ca^{2+} из внеклеточной среды в цитозоль, который осуществляется после высвобождения кальция из депо и последующей активации кальций-селективных каналов в плазматической мембране [7]. Основным депо кальция внутри лимфоцитов является эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Взаимодействие иммунорецепторов с антигенами вызывает ток ионов Ca^{2+} из этого компартмента за счет фосфоинозитол-сигнального каскада. Так, инозитол-1,4,5-трифосфат способствует высвобождению ионов Ca^{2+} из депо, инициируя первую фазу распространения кальциевых сигналов. В свою очередь, опустошенное депо является стимулом для активации кальций-селективных каналов в плазматической мембране (ПМ). Далее осуществляется вторая, более длительная, фаза распространения кальциевых сигналов в клетке, которые обеспечивают восполнение депо [1, 4].

За последние несколько лет исследованы механизмы кальциевой сигнализации, особенно достигнут значительный прогресс в изучении механизма депо-зависимого тока Ca^{2+} . Так, были открыты белки Stim (stromal interaction molecule) и Orai и исследованы их функции. В настоящее время известно, что механизм депо-зависимого тока Ca^{2+} и его сигнальные функции обеспечива-

ются согласованной работой белков Stim и Orai [8–10]. Белки Stim действуют в качестве сенсоров Ca^{2+} в мембране ЭПР. Так, активируясь во время истощения депо, они взаимодействуют с белками Orai. Затем белки Orai во время взаимодействия с белками Stim способствуют току ионов в клетку [11–14]. Сообразно этому депо-зависимый ток Ca^{2+} в клетках выполняет две функции: стимулирует восполнение депо, частично истощенного действием агониста; оказывает влияние на изменение амплитуды кальциевых сигналов, модифицируя при этом кальциевые осцилляции [15–18].

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ДЕПО-ЗАВИСИМОГО ТОКА Ca^{2+} В КЛЕТКАХ

Этот механизм имеет относительно недавнюю историю исследования, так как молекулярное строение ионных каналов определено только в последнее десятилетие [19]. Впервые в серии экспериментальных работ между 1882 и 1885 г. Сидней Рингер обратил внимание на роль ионов кальция в клеточных функциях, исследуя процессы сокращения сердечной мышцы [20]. В 1983 г. Майкл Берридж продемонстрировал роль молекулы инозитол-1,4,5-трифосфата (InsP_3) в качестве вторичного мессенджера. Он указал на взаимосвязь InsP_3 и процесса опустошения депо. В 1986 г. Джеймс Патни предложил модель емкостного входа Ca^{2+} , основанную на взаимосвязи регуляции уровня внутриклеточного кальция и генерации сигналов. Дж. Патни установил зависимость активации кальций-селективных каналов от истощения внутриклеточного депо [17]. В 1988–1989 гг. были проведены первые измерения агонист-индуцированного Ca^{2+} -тока.

В середине 1990 г. был впервые исследован инозитол-1,4,5-трифосфат чувствительный рецептор (IP_3R), образующий ионные каналы в мембране ЭПР. Этот рецептор представляет собой крупный трансмембранный белок с четырьмя субъединицами, каждая из которых содержит кальций-селективную пору. Несколькими годами позже была найдена область, отвечающая за связывание инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3) с аминокислотными остатками рецепторов, лизином и аргинином. В 1992 г. была показана взаимосвязь с активацией ядерного фактора, активирующего Т-лимфоциты (NFAT), и мутацией генов. Несколько позже, в 1996 г., впервые был открыт белок Stim1, а в 2001 г. – его гомолог Stim2. В 1999 г. была предложена взаимосвязь ПМ и ЭПР в осуществлении депо-зависимого тока кальция в клетку. Наконец, в 2005 г., белки Stim

и Orai были обнаружены в кальций-селективных каналах [21].

В настоящее время установлено, что депо-зависимый ток Ca^{2+} осуществляется кооперацией структурных компонентов: белков Stim1 и Orai1. Они координируют кальциевые сигналы и регулируют гомеостаз Ca^{2+} в клетке, обеспечивая активацию каналов и передачу сигналов [21–23].

БЕЛОК STIM1 В ДЕПО-ЗАВИСИМОМ ТОКЕ Ca^{2+}

Белки Stim являются молекулярными медиаторами депо-зависимого тока Ca^{2+} в клетках [24]. Они функционируют в мембране ЭПР в качестве сенсоров Ca^{2+} . Так, белки Stim информируют белки Orai о том, что депо опустошено [25, 26]. Известны два гомолога, Stim1 и Stim2, которые имеют подобное строение, однако отличаются свойствами. В частности, гомолог Stim2 является более слабым активатором белков Orai, чем белок Stim, хотя весьма чувствительным сенсором Ca^{2+} [7, 27, 28].

Белок Stim1 представляет собой трансмембранный мономер с молекулярной массой 77 кДа, который содержит сигнальный пептид с N-концевым доменом в просвете ЭПР и связывающий пептид с C-концевым доменом в цитозоле [29, 30]. Сигнальный пептид содержит три домена с консервативными мотивами: канонический мотив (сEF-hand), который связывает ионы Ca^{2+} ; слабоаффинный мотив к Ca^{2+} , также стерил-насыщенный α -мотив (SAM) [20, 31]. В покоящихся клетках эти мотивы находятся в форме стабильных ассоциированных комплексов. В этой форме Stim1 воспринимают небольшие изменения уровня Ca^{2+} в просвете ЭПР [9, 32].

Кроме того, слабоаффинный мотив играет важную роль в стабилизации канонического мотива, тогда как мотив SAM во время активации клетки участвует в олигомеризации белков Stim. Связывающий пептид в цитозоле Stim1 содержит молекулярные структуры, которые обеспечивают взаимодействие с белками Orai и их активацию в плазматической мембране. Среди них различают три биспиральных домена, они обозначаются как CC1, CC2 и CC3 [33, 34].

Эти домены опосредуют формирование олигомеров Stim1 и взаимодействуют с белками Orai. Домены CC2 и CC3 образуют структурный комплекс (CAD), который, связываясь с белками Orai, активирует кальций-селективные каналы и индуцирует ток Ca^{2+} . Кроме этих доменов в

цитозоле белки Stim1 образуют кластер, насыщенный аминокислотами серином и пролином, и полиосновный домен. Последний имеет большое значение в структуре белка Stim1, так как обеспечивает образование структурного комплекса. Данный комплекс участвует в связывании плазматической мембраны и ЭПР, взаимодействуя с фосфолипидами. Следует отметить, что на протяжении нескольких лет в биохимических исследованиях рассматривается природа C-концевого домена в молекуле Stim1, который отвечает за связывание с белками Orai. Ранее предполагали, что в основе этого взаимодействия CAD и Orai1 лежит электростатическое взаимодействие. Однако в настоящее время показано, что наибольшее значение имеет гидрофобное взаимодействие, которое играет важную роль в кооперации белков Stim и Orai [35].

БЕЛКИ ORAI

Депо-зависимый ток Ca^{2+} осуществляется активацией белков Orai – молекулярных компонентов кальций-селективных каналов плазматической мембраны [11]. Белки Orai образуют три гомолога: Orai1, Orai2, Orai3, из которых наиболее эффективным является Orai1. Этот белок представляет собой политопический α -гликопротеин с молекулярной массой 32,7 кДа, образующий канал из ансамбля тетрамеров или гексамеров в плазматической мембране с N- и C-концевыми доменами в цитоплазме. Они взаимодействуют с доменом CAD молекулы Stim1. В высокоселективном канале внутри N-концевого остатка образуется пора из шести доменов (TM1), которая участвует в связывании с белком Stim [9, 29, 36]. Отрицательно заряженные остатки глутаминовой кислоты в канале действуют в качестве воронки для Ca^{2+} . Кроме того, канал содержит селективный фильтр, гидрофобную полость и основную область. В основной области, насыщенной лизином, находятся три домена TM2, TM3, и TM4. Они исполняют роль ключевых регуляторов канала в закрытом состоянии Orai [10, 27, 37]. Кроме того, N-концевой остаток содержит кальмодулин-связывающий домен, который опосредует кальций-зависимую деактивацию кальций-селективных каналов [29]. Этот процесс обратной связи осуществляется при повышении уровня в цитозоле Ca^{2+} .

Взаимодействие Stim1 с Orai1 происходит после истощения депо, поэтому генетические нарушения структуры Orai1 ослабляют активность кальций-селективных каналов.

АКТИВАЦИЯ КАЛЬЦИЙ-СЕЛЕКТИВНЫХ КАНАЛОВ, БЕЛКОВ STIM И ORAI

Процесс активации белков Stim и Orai представляет собой сложную серию скоординированных шагов. Прежде всего отметим, что в поющих клетках депо насыщено ионами Ca^{2+} , где они связаны с доменом EF-hand в белке Stim1. Конформация белков Stim регулируется определенной последовательностью из 14 аминокислот. В этом состоянии эти белки диффузно распределены по всей мембране ЭПР и неактивны [35].

В результате агонист-индуцированного фосфоинозитол-сигнального каскада образу-

ется инозитол-1,4,5-трифосфат, который индуцирует открытие каналов IP3R эндоплазматического ретикула и высвобождение Ca^{2+} из депо.

В этих условиях инициируется ответ Stim1 на истощение депо [24, 38]. Опустошение депо вызывает диссоциацию Ca^{2+} из cEF-hand мотива Stim1. Это событие сопровождается рефолдингом белков и дестабилизацией EF-SAM комплекса в N-концевом домене [39, 40]. Затем домены CC1 и CAD, в белке Stim1 изменяют конформацию за счет гидрофобного взаимодействия и образуют стабильные олигомеры (рис.) [26, 35].

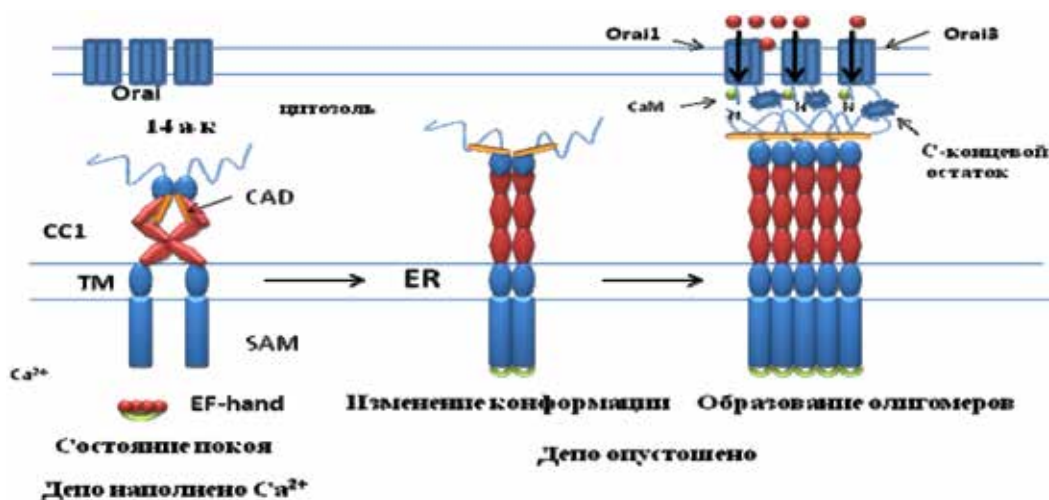


Рисунок. Активация белков Stim и Orai

Figure. Activation of Stim and Orai proteins

Олигомеры Stim1 транслоцируются в связующий сайт ЭПР, который находится в тесной ассоциации с ПМ. Далее белок Stim1 образует крупные кластеры в плазматической мембране, там, где формируется полиосновный мультимерный комплекс белков Stim и Orai [19, 21]. В комплексе Stim–Orai олигомеры Stim1 связываются с белками Orai [26]. Образующий пору в плазматической мембране гомолог Orai1 за счет отрицательно заряженных остатков глутаминовой кислоты связывает внеклеточный Ca^{2+} [23, 36, 39]. Так осуществляются последовательное взаимодействие белков Stim и Orai, активация кальций-селективных каналов в плазматической мембране и поступление Ca^{2+} в клетку. В процессе восполнения депо Ca^{2+} белки Stim1 перемещаются обратно в просвет ЭПР [9, 24].

Таким образом, активация кальций-селективных каналов и их молекулярных компонентов белков Stim1 и Orai1 предполагает сложную серию скоординированных шагов, где белки Stim1 выполняют две важные роли [12, 25]. Во-первых,

они проявляют высокую чувствительность к опустошению депо Ca^{2+} ; во-вторых, участвуют в процессе коммуникации кальциевых каналов плазматической мембраны об истощении депо [1, 4, 31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, депо-зависимый ток Ca^{2+} контролирует большинство фундаментальных клеточных функций, особенностью которых являются активация кальций-селективных каналов ПМ после опустошения внутриклеточного депо и обеспечение непрерывного тока Ca^{2+} в цитозоль. Повышение уровня Ca^{2+} индуцирует активацию факторов транскрипции, таких как NFAT, JNK1, MEK2, CREB, и, в большинстве случаев, является решающим фактором развития клеток и их гибели. Развитие многих патологических процессов, таких как синдром иммунодефицита, кардиоваскулярные патологии, неоплазии, связаны с нарушением взаимодействия молекулярных медиаторов депо-зависимого тока Ca^{2+} . Вследствие этого бел-

ки Stim и Orai представляют собой потенциальные мишени для фармакологических препаратов.

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 / REFERENCES

1. Fracchia K., Pai C., Walsh G. Modulation of T cell metabolism and function through calcium signaling. *Frontiers in Immunology*. 2013; 4: 1–10.
2. Кувачева Н.В., Моргун А.В., Хилажева Е.Д., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Фролова О.В., Труфанова Л.В., Мартынова Г.П., Салмина А.Б. Формирование инфламасом: новые механизмы регуляции межклеточных взаимодействий секреторной активности клеток. *Сибирское медицинское обозрение*. 2013; 5: 3–10. [Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Khilazheva E.D., Malinovskaya N.A., Gorina Ya.V., Pozhilenkova E.A., Frolova O.V., Trufanova L.V., Martynova G.P., Salmina A.B. Formation of inflammasomes: new mechanisms of regulation of intercellular interactions of secretory activity of cells. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye – Siberian Medical Review*. 2013; 5: 3–10 (in Russ.)].
3. Bhardway R., Hediger M., Demaurex N. Redox modulation of Stim-Orai signaling. *Cell Calcium*. 2016; 60: 142–152.
4. Hogan P.G., Lewis R.S., Rao A. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu. Rev. Immunol.* 2010; 28: 491–533.
5. Nohara L.L., Stanwood S.R., Omilusik K.D., Jefferies W. A. Tweetters, Woofers And Horns: The Complex Orchestration Of Calcium Currents In T Lymphocytes. *Front. Immunol.* 2015; 6 (234): 1–9.
6. Rüdiger S. Stochastic models of intracellular calcium signals. *Physics Reports*. 2014; 534: 39–87.
7. Robert V., Triffaux E., Savignac M., Pelletier L. Calcium signaling in T-lymphocytes. *Biochimie*. 2011; 93: 2087–2094.
8. Hot M. CRAC channels, calcium and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016; 1863 (13): 1408–1417.
9. Prakriya M. Store-Operated Orai Channels: Structure and Function. *Published by Elsevier*. 2013; 71: 1–32.
10. Rothberg B.S., Wang Y., Gill D.L. Orai Channel Pore Properties And Gating By STIM: Implications From The Orai Crystal Structure. *Sci. Signal*. 2013; 6 (267): 1–9.
11. Derler I., Schindl R., Fritsch R., Heftberger P., Riedl M., Beggb M., Houseb D., Romanin C. The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium*. 2013; 53 (1.2): 139–151.
12. Feske S. Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1238: 74–90.
13. Mukherjee S., Brooks W.H. Stromal interaction molecules as important therapeutic targets in diseases with dysregulated calcium flux. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 8: 1–8.
14. Tian C., Du L., Zhou Y., Li M. Store-operated CRAC channels inhibitors opportunities and challenges. *Future Medicinal Chemistry*. 2016; 8 (7): 817–832.
15. Muik M., Schindl R., Fahrner M., Romanin C. Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) current, structure, and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012; 69: 4163–4176.
16. Niemeyer B. Changing calcium CRAC channel (STIM and Orai) expression, splicing and posttranslational modifiers. *Cell Physiology*. 2016; 310 (9): 701–709.
17. Putney J.W. Calcium Signaling: Deciphering the Calcium–NFAT Pathway. *Current Biology*. 2011; 22 (3): 87–89.
18. Samuels E., Parys J.B., Missiaen L., Smedt H.D., Bultynck G. Intracellular Ca^{2+} storage in health and disease: A dynamic equilibrium. *Cell Calcium*. 2010; 47: 297–314.
19. Amcheslavsky A., Wood M.L., Yeromin A.V., Parker I., Freites J.A., Tobias D.J., Cahalan M.D. Molecular Biophysics of Orai Store-Operated Ca^{2+} Channels. *Biophysical Journal*. 2015; 108: 237–246.
20. Krebs J., Agellon L.B., Michalak M. Ca^{2+} homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 460: 114–121.
21. Soboloff J., Rothberg B.S., Madesh M., Gil D.L. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Molecular Cell Biology*. 2012; 13: 549–564.
22. Joseph N., Reicher B., Barda-Saad M. The calcium feedback loop and T cell activation: How cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1838: 557–568.
23. Shaw P.J., Qu B., Hoth M., Feske S. Molecular regulation of CRAC channel and their role in lymphocyte function. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70: 2637–2656.
24. Wang Y., Deng X., Gill D.L. Calcium Signaling by STIM and Orai: Intimate Coupling Details Revealed. *Science Signaling*. 2010; 3 (1.148): 1–4.
25. Feske S., Prakriya M. Conformational dynamics of STIM1 activation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2013; 20 (8): 918–919.
26. Muik M., Fahrner M., Schindl R., Stathopoulos P., Frischauf I., Derler I., Plenk P., Lackner B., Groschner K., Ikura M., Romanin C. STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *The EMBO Journal*. 2011. 30: 1678–1689.
27. Rosado J.A., Diez R., Smani T., Jardin I. Stim and orai1 variants in store-operated calcium entry. *Front Pharmacology*. 2015; 6 (365): 1–9.
28. Stathopoulos P., Ihura M. Structural aspects of calcium – release activated calcium channel function. *Channels*. 2014. 17: 344–353.

29. Palty R., Isacoff E.Y. Cooperative binding of stromal interaction molecule 1 (STIM1) to the N and C termini of calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1). *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 2015; 3: 1–15.
30. Tirado-Lee L., Yamashita M., Prakriya M. Conformational changes in the Orai1 C-terminus evoked by STIM1 binding. *Plos One*. 2015; 2: 1–17.
31. Hogan P.G., Rao A. Store-operated calcium entry: mechanisms and modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 460: 40–49.
32. Deng X., Wang Y., Zhou Y., Soboloff J., Gill D.L. STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284 (34): 22501–22505.
33. Kim J.Y., Muallem S. Unlocking SOAR releases STIM. *The EMBO Journal*. 2011; 30: 1673–1675.
34. Maus M., Jairaman A., Stathopulos P.B., Muir M., Fahrner M., Weidinger C., Benson M., Fuchs S., Romanine C., Ikurac M., Prakriya M., Feske S. Missense mutation in immunodeficient patients shows the multifunctional roles of coiled-coil domain 3 (CC3) in STIM1 activation. *PNAS*. 2015; 112 (19): 6206–6211.
35. Korzeniowski M.K., Baird B., Holowka D. STIM1 activation is regulated by a 14 amino acid sequence adjacent to the CRAC activation domain. *AIMS Biophys.* 2016; 3 (1): 99–118.
36. Smyth J.S., Hwang S., Tomita T., de Haven W.I., Mercer J.C., Putney J.W. Activation and regulation of store-operated calcium entry. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010; 14 (10): 2337–2349.
37. Xie J., Pan H., Yan J. et al. SOCE and cancer recent progress and new perspectives. *International Journal of Cancer*. 2016. 138: 2067–2077.
38. Wen J., Huang Y., Xiu H., Shan Z., Xu K. Altered expression of stromal interaction molecule (STIM)-calcium release activated calcium channel protein (ORAI) and inositol-1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) in cancer: will they become a new battlefield for oncotherapy? *Chin. J. Cancer*. 2016; 35 (32): 2–9.
39. Shim A.H., Lee L.T., Prakriya M. Structural and Functional Mechanisms of CRAC Channel Regulation. *J. Mol. Biol.* 2015; 427: 77–93.
40. Zhou, Soboloff J., Gill D.L., Deng X., Wang Y. Signals Coupling to Control Cellular Calcium STIM and Orai: Dynamic Intermembrane. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 22501–22505.

Поступила в редакцию 07.11.2016

Утверждена к печати 30.06.2017

Лычковская Елена Викторовна, ст. преподаватель, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Шуваев Антон Николаевич, канд. мед. наук, науч. сотрудник, НИИ молекулярной медицины и патофизиологии, КГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Труфанова Людмила Васильевна, канд. биол. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Герцог Галина Евгеньевна, канд. биол. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Шадрина Людмила Борисовна, ассистент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Семенчуков Алексей Алексеевич, ст. преподаватель, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени проф. 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 патофизиологии, КГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) Лычковская Елена Викторовна, e-mail: lychk-elena@mail.ru.

УДК 577.122.015.6:616-008.853.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-191-198

For citation: Lychkovskaya E.V., Shuvaev A.N., Gercog G.E., Trufanova L.V., Shadrina L.B., Semenchukov A.A., Salmina A.B. The role of proteins Stim and Orai as molecular components of the store-dependent current Ca^{2+} in lymphocytes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 191–198.

The role of proteins Stim and Orai as molecular components of the store-dependent current Ca^{2+} in lymphocytes

Lychkovskaya E.V., Shuvaev A.N., Gercog G.E., Trufanova L.V.,
Shadrina L.B., Semenchukov A.A., Salmina A.B.

Krasnoyarsk State Medical University (KSMU) named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky
1, Partizn Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

ABSTRACT

In the process of evolution of eukaryotes has formatted a highly organized mechanism for maintaining and regulating intracellular calcium homeostasis, which is one of the most important components of cell signaling in all branches of the phylogenetic tree. Intracellular calcium controls numerous physiological processes in the cell. Ca^{2+} forms signals as their spatial-temporal distribution. The frequency and amplitude of calcium oscillations depends on the signal strength. Calcium signals causing long-term or short-term responses of cells. Mainly, calcium signals in lymphocytes mediate gene expression program initiation that leads to proliferation, differentiation and production of proinflammatory cytokines also activate formation of inflammasome. Therefore, calcium signals mediate immune, and inflammatory response, autoimmune reaction of lymphocytes.

The main mechanism of calcium signaling in lymphocytes is store-dependent Ca^{2+} current. Mobilization of cellular Ca^{2+} in response to receptor stimulation commonly occurs through release of Ca^{2+} ions from intracellular Ca^{2+} stores or influx across the plasma membrane through calcium - selective channels. Calcium-selective channels are assembled from two protein families: the Orai proteins which form the ion channel pore, and the stromal interaction molecule (STIM) proteins which function as endoplasmic reticulum calcium sensors and activators of the channel. Stim protein is a transmembrane monomer which is localized at the membrane of the endoplasmic reticulum. This molecule is a sensor Ca^{2+} in response to emptying store activates calcium-selective channels the plasma membrane. These channels express proteins Orai which are tetramers forming inside the channel pore and act as a site Ca^{2+} . Orai binds to Stim. Orai proteins are activated after receiving information from Stim about Store depletion.

Thus, the relationship and coordination of Stim and Orai proteins provides store - dependent Ca^{2+} current and causes cellular functional responses. Increased Ca^{2+} levels induce the activation of transcription factors such as NFAT, JNK1, MEF2, CREB, and, in most cases, is a crucial factor in the all differentiation or death. In this review, the mechanism of the store-dependent Ca^{2+} current in lymphocytes is presented.

Key words: intracellular Ca^{2+} , store-dependent Ca^{2+} , the proteins Orai and Stim.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

Received 07.11.2016

Accepted 30.06.2017

Lychkovskaya Elena V., Senior Lecturer, Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical & Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Shuvaev Anton N., PhD, Researcher, Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, KSMU named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Trufanova Ludmila V., PhD, Assistant Professor, Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical & Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Gercog Galina E., PhD, Assistant Professor, Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical & Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Shadrina Ludmila B., Assistant, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Semenchukov Aleksey A., Senior Lecturer, Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical & Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Salmina Alla B., DM, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry with the Course of Medical Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) **Lychkovskaya Elena V.**, e-mail: lychk-elena@mail.ru.

УДК 616-089.819.843-085.37:577.27

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-199–210

Для цитирования: Сенников С.В., Хантакова Ю.Н., Кнауэр Н.Ю. Клеточная Т-регуляторная терапия в трансплантологии: от получения до клинического применения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 199–210.

Клеточная Т-регуляторная терапия в трансплантологии: от получения до клинического применения

Сенников С.В., Хантакова Ю.Н., Кнауэр Н.Ю.

¹Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Интенсивное изучение клеточных подходов для коррекции различных нарушений, включая иммунологические и онкологические процессы, а также изучение иммуносупрессорной роли регуляторных Т-клеток (Трег-клеток) стали основными предпосылками для разработки методик клеточной коррекции различных иммуноопосредованных состояний, таких как аутоиммунная патология или трансплантация. В связи с малочисленностью Трег-клеток в периферической крови, а также отсутствием строго-специфичных маркеров изолированное использование методов сортировки цельной крови затрудняет получение достаточного количества клеток, что делает актуальным поиск оптимальных условий генерации и экспансии Трег-клеток с использованием стимуляторов пролиферации и направленной дифференцировки чистой популяции Трег без пролиферации эффекторных клеток.

Насегодшний день в различных экспериментальных и клинических испытаниях показаны многообещающие результаты применения Трег-клеточной иммунотерапии для индукции аллоспецифической толерантности у реципиентов с пересаженными органами и тканями. Ключевые проблемы данной терапии заключаются как в недостаточной изученности механизма действия и специфического фенотипа Трег-клеток, которые в наибольшей степени способствуют индукции толерантности, так и в трудностях получения стабильной популяции функционально-активных Трег-клеток. Кроме того, остается открытым вопрос получения и механизма действия антиген-специфической популяции Трег-клеток. В обзоре проводится анализ имеющихся различных протоколов генерации регуляторных Т-клеток, а также анализ данных о клиническом применении Трег-клеток для индукции аллоспецифической толерантности в условиях трансплантации.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, клеточная иммунотерапия, трансплантация, РТПХ, рапамицин, ATRA, витамин Д.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большое число исследований, посвященных разработке новых лекарственных препаратов, вакцин и способов лечения, некоторые заболевания до сих пор могут приводить к ситуациям, когда трансплантация становится единственным вариантом лечения. На сегодняшний

день, благодаря использованию новейших технологий и иммуносупрессивной терапии, показатели приживления пересаженных органов достигают 90% [1]. Однако длительное применение иммуносупрессивных препаратов не способно предотвратить хронические реакции отторжения. Кроме того, данная терапия сопровождается побочными эффектами, такими как сердечно-сосудистые заболевания, оппортунистические инфекции, нефротоксичность, онкологические заболева-

✉ Сенников Сергей Витальевич, e-mail: SennikovSV@gmail.com.

ния, гипертензия, метаболический синдром, что суммарно приводит к дисфункции пересаженного органа [1]. В связи с такими неудовлетворительными данными клеточная иммунотерапия с использованием Treg-клеток, а особенно антиген-специфических Treg-клеток, является перспективным подходом к индукции иммунологической толерантности, которая основывается на введении реципиенту клеток, которые будут стимулировать селективную толерантность к пересаженным органам и тканям.

Современная парадигма иммунологии и трансплантологии утверждает, что иммунная толерантность при трансплантации достигается при балансе Т-регуляторных и Т-эффекторных клеток. В связи с этим терапевтический потенциал Treg-клеток, индуцированных непосредственно *in vivo*, или при внесении аутологичных Treg-клеток, полученных *ex vivo*, представляет собой эффективный подход для индукции и поддержания трансплантационной толерантности. Так, на мышиных моделях было показано, что присутствие Treg-лимфоцитов у реципиента во время трансплантации кожи или сердца является значимо важным для индукции и поддержания толерантности [2]. Кроме того, при пересадке костного мозга показано, что одновременное введение изолированных Treg-клеток и аллотрансплантата значительно уменьшает реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и улучшает приживление [3]. Очевидным преимуществом использования клеточной аллоспецифичной терапии является то, что иммуномодулирующая активность данных регуляторных Т-клеток будет сосредоточена в области аллоантигена и иммунной активации [4], а не по всему организму, как в случае использования медикаментозной терапии. В связи с этим ученые склоняются к тому, что Т-клеточная терапия не будет сопровождаться повышенным риском инфекционных и онкологических осложнений как в случае системной иммуносупрессии. В данном обзоре обобщаются литературные данные о современных возможностях получения регуляторных Т-клеток для клинического применения, а также имеющиеся данные о первых испытаниях Т-клеточной терапии для модуляции иммунологической толерантности.

СУБПОПУЛЯЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Открытие С. Сакагучи с соавт. особой популяции Т-клеток, обладающих регуляторными свойствами, определение основных маркеров и

механизмов реализации своих функций привели к интенсивному изучению роли Т-регуляторных клеток как в норме, так и при различных патологических состояниях, включая онкологию, аутоиммунные заболевания и трансплантологию [5, 6]. Treg-клетки дифференцируются из наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в тимусе, аналогично нормальным функционально зрелым CD4⁺ Т-клеткам, и составляют около 5–10% от всей популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов периферической крови. Согласно современной номенклатуре, принято разделять Treg-клетки на естественные, образующиеся в тимусе (nTreg), и индуцированные, образованные на периферии при иммунологическом ответе (iTreg) [7]. Кроме того, индуцированные Treg-клетки в зависимости от поверхностных маркеров и преимущественного механизма действия могут быть разделены на ряд субпопуляций: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ IL-10-зависимые Tr1, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ TGF- β -зависимые Th3, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ IL-35-зависимые iTr35 [5].

В связи с гетерогенностью субпопуляционного состава iTreg-клеток на сегодняшний день нет единой точки зрения по поводу маркеров Treg-клеток, которые позволили бы строго дифференцировать данные популяции клеток. Основными маркерами, характерными для Treg-клеток, являются поверхностная молекула CD25 – α -цепь рецептора интерлейкина (IL) 2, а также ядерный фактор FoxP3, необходимый для реализации супрессорной функции Treg-клетками. С одной стороны, считается, что при экспрессии FoxP3 происходит стабилизация регуляторного фенотипа клеток в условиях воспаления за счет индукции Treg-ассоциированных генов при подавлении экспрессии Th1-, Th2- и Th17-ассоциированных генов [5]. С другой стороны, такие клетки, как Tr1, не экспрессируют FoxP3, однако продуцируют в большом количестве IL-10 и TGF- β и оказывают ярко выраженные супрессорные свойства, тем самым указывая на неоднозначность имеющихся данных и необходимость поиска новых знаковых маркеров, которые позволили бы проводить четкую дифференциацию эффекторных и регуляторных клеток.

Если говорить про индуцированные Treg-клетки, то показано, что их активация на периферии происходит по антиген-специфическому пути, характерному для любой Т-клетки при взаимодействии корецеторов CD28 на Treg-клетках и B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86) на антиген-презентирующих клетках (АПК) [8]. Это предполагает, что иммуносупрессивные свойства Treg-клеток зависят от презентации антигена АПК в ходе

иммунного ответа. Кроме того, эксперименты *in vitro* показали, что для запуска супрессивных механизмов Трег-клетки требуют ТСР-опосредованной активации [9]. В различных доклинических и клинических исследованиях трансплантационной толерантности было показано, что аллоантиген-специфическая пролиферация Трег-лимфоцитов может пролонгировать функционирование аллогraftа [2, 10–12]. Согласно имеющимся в мировой литературе данным, регуляторные Т-клетки, как естественные, так и индуцированные, подавляют пролиферацию и эффекторную активность иммунокомпетентных клеток для предотвращения развития аутоиммунного ответа и контроля над воспалительными реакциями. Для этого они используют различные механизмы, опосредованные либо через мембранные молекулы, такие как CTLA-4, PD-L1, GITR, LAG-3, а также цитолитические молекулы Fas и гранзим В, либо через продукцию таких цитокинов, как IL-10 и TGF- β .

Кроме того, среди механизмов иммуносупрессии можно отметить истощение IL-2 в воспалительном микроокружении за счет увеличенного потребления цитокина CD4+CD25^{hi} Трег-клетками, увеличение продукции IDO как самими клетками, так и АПК (дендритные клетки (ДК)) при контакте с регуляторными Т-клетками, а также продукцию внеклеточного аденозина в виде ADP и AMP, которые через аденозиновые рецепторы A2AR способствуют супрессии эффекторных Т-клеток [5].

Т-регуляторные клетки – это особая популяция Т-лимфоцитов, которая выступает фактором контроля развития и уровня иммунного ответа против антигенов, собственных и чужеродных. Поэтому является актуальным вопрос о возможности проведения Трег-клеточной терапии, направленной на индукцию состояния иммуносупрессии для подавления развития патологических аутоиммунных или воспалительных реакций. Для клинического применения важным является вопрос выделения чистой культуры Трег-клеток без примеси других субпопуляций Т-лимфоцитов. Анализ литературы показал, что все протоколы получения Трег-клеток можно разделить на два направления: выделение регуляторных клеток из цельной крови различными методами сортировки или их генерация *in vitro* с использованием разнообразных блокирующих и стимулирующих агентов.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Для выделения регуляторных клеток из периферической крови используют несколько

подходов. Во-первых, это удаление клеток CD8⁺ и позитивная селекция оставшихся клеток по экспрессии CD25⁺ с использованием методов магнитной сепарации. Основным минусом данной технологии является невозможность селекции Трег-клеток по нескольким желаемым характеристикам. Кроме того, при использовании магнитной сепарации получается смесь клеток CD25^{hi}, которая включает в себя не только регуляторные Т-клетки, но и активированные эффекторные Т-клетки, что уменьшает чистоту данного метода по сравнению с проточной цитометрией. В связи с этим сортировка только по CD25 позволяет различать регуляторные Т-клетки с наивной популяцией Т-лимфоцитов, но не с антиген-активированными Т-клетками [13].

Метод проточной сортировки позволяет получать чистые популяции клеток благодаря возможности использования нескольких комбинаций маркеров. Так, для выделения Трег-клеток на первом этапе, согласно данным литературы, выделяют популяцию клеток CD4+CD25^{hi} с дополнительной селекцией по CD45RA⁺ для удаления дифференцированных клеток и клеток-памяти [14]. В результате чего можно получить популяцию наивных регуляторных Т-клеток, которая обладает более выраженными супрессорными свойствами, чем вся популяция клеток CD25^{hi} [15]. Следующим этапом для отделения Трег-клеток и эффекторных Т-лимфоцитов предлагается использовать два маркера FoxP3 или CD127. В связи с тем, что FoxP3 является внутриклеточным маркером, при его применении для сортировки получается популяция нежизнеспособных клеток, что не позволяет их использовать в клеточных протоколах иммунотерапии. Кроме того, под воздействием таких цитокинов, как IL-6 и IL-1, может происходить дифференцировка Трег-клеток в Th17-клетки с потерей экспрессии FoxP3 и экспрессией IL-17 [16], что указывает на нестабильность экспрессии данного маркера.

Хотя для естественных Трег-клеток у человека доказан фенотип CD4+CD25^{hi}FoxP3⁺, для индуцированных Трег-клеток, которые преобладают на периферии и контролируют развитие мукозального и воспалительного иммунного ответа, экспрессия CD25 и FoxP3 не является конститутивной [5, 15, 17]. Так, для Tr1-субпопуляции индуцированных Трег-клеток не характерна экспрессия CD25 и FoxP3. Для дифференцировки этих клеток предлагают использовать совместную экспрессию таких маркеров, как CD49b и LAG-3 [18], но эти поверхностные маркеры не строго специфичные. Определение внутриклеточного со-

держания IL-10 позволяет устанавливать данную субпопуляцию Treg-клеток [19], но не допускает использования полученных клеток в клинических протоколах в связи с необходимой фиксацией клеток для проточной сортировки. Для Th3-клеток показана экспрессия CD25 и FoxP3, что препятствует их дифференцировке от естественных регуляторных Т-клеток [20]. Некоторыми авторами даже предполагается, что Th3-клетки являются активированной формой nTreg-клеток на периферии. Каких-либо других поверхностных маркеров для Th3-регуляторных клеток на сегодняшний день не установлено, для их дифференцировки от других субпопуляций предлагается использовать определение внутриклеточного содержания TGF- β [20]. Экспрессия дополнительных маркеров, таких как CTLA-4 [5], GITR [21], CD39 [22], HLA-DR [13], CD127 [23], показана на Treg-клетках, но она неспецифична и их также недостаточно для определения Treg.

Среди потенциальных маркеров nTreg-клеток рассматривают α -цепь рецептора IL-7, или CD127. Этот рецептор имеет общую γ -цепь (CD127) с другими членами семейства рецепторов IL-2 (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 и IL-21), но экспрессия уникальной высокоаффинной цепи специфична только для IL-7. IL-7R α -цепь экспрессируется на поющих Т-лимфоцитах CD4+ у здоровых доноров. Показана обратная корреляция между уровнем экспрессии рецептора и супрессорными возможностями данной субпопуляции [23]. Treg-клетки, которые определяют как CD4+CD25+CD127low, обладают выраженными супрессорными функциями и одновременно экспрессируют большое количество FoxP3 [24]. При сравнении функциональных свойств Treg-клеток CD25hi и CD25hiCD127low выявлено, что последние оказывают более выраженное подавление аллостимулированных эффекторных Т-клеток *in vitro* [24]. В связи с этим использование CD127 является более предпочтительным для выделения чистой популяции Treg-клеток.

Таким образом, в отличие от метода магнитной сепарации использование метода проточной сортировки позволяет выделять чистую популяцию регуляторных Т-клеток, что является важным критерием возможности применения таких клеток в иммунотерапии. Однако если для естественных Treg-клеток были определены поверхностные маркеры, которые позволяют проводить процедуру сортировки, то для индуцированных на периферии Treg-клеток на данный момент не приводится строгоспецифичных маркеров. Разделение iTreg-клеток по большей части происходит

по функциональному состоянию и в зависимости от внутриклеточной продукции цитокинов, что не позволяет использовать выделенные таким образом клетки в клинических испытаниях.

Кроме того, использование любого из перечисленных методов сортировки не позволяет выделять антиген-специфические клоны Treg-клеток, а все методы приводят к выделению клонов, обладающих антиген-неспецифическими супрессорными свойствами. Дополнительным затруднением при сортировке регуляторных клеток из цельной крови и последующим применением таких клеток является их малочисленность. Это означает, что для проведения клинических исследований требуется разработка клеточных протоколов генерации и экспансии достаточного количества функционально-активных регуляторных клеток *in vitro*.

ГЕНЕРАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК IN VITRO

Исследования по генерации регуляторных клеток *in vitro* можно разделить на два направления: пролиферация Treg-клеток, выделенных различными методами сортировки из периферической крови, или направленная дифференцировка наивных CD4+ Т-клеток в сторону регуляторных клеток с последующей пролиферацией необходимых клонов. Так, показано, что использование анти-CD3/CD28-покрытых частиц при добавлении IL-2 приводит к увеличению (преумножению, экспансии) Treg-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, *in vitro* [25]. Однако в данных условиях происходит пролиферация и эффекторных клеток, что является главной проблемой культивирования Treg-клеток CD4+CD25hi, полученных после сортировки с помощью проточной цитометрии, так как они часто бывают загрязненными Т-клетками CD25+FOXP3-. В связи с этим много усилий сосредоточено на подборе таких условий культивирования, которые позволили генерировать большое количество Treg-клеток, без пролиферации других популяций Т-лимфоцитов.

Одним из веществ, которые блокируют пролиферацию эффекторных клеток, но способствуют выживанию Treg-клеток, является рапамицин. Показано, что рапамицин ингибирует mTOR, молекулу, участвующую в запуске активационного сигнала от IL-2R и CD28 через фосфотидилинозитол-3-киназу (PI3K), тем самым блокируя поступление активационного сигнала в эффекторных Т-клетках и их пролиферацию [26]. В то же время у Treg-клеток активационный сигнал с IL-2R пе-

редается не через PI3K, а через путь JAK-STAT, который не затрагивается при использовании рапамицина [27]. При трансплантации органов у пациентов, которые принимали в качестве иммуносупрессанта рапамицин, в сравнении с пациентами, принимающими ингибиторы кальциневрина, в крови содержалось большее количество Treg-клеток [28]. Таким образом, благодаря поддержанию жизнеспособности и увеличению количества регуляторных Т-клеток, с одной стороны, и предотвращению роста эффекторных Т-клеток, с другой стороны, рапамицин гарантирует получение чистой популяции Treg-лимфоцитов. Кроме того, при дальнейшем исследовании было показано, что Treg-клетки CD4+CD25^{hi}FoxP3+, обработанные рапамицином, обладают стабильным фенотипом и не дифференцируются в сторону IL-17-продуцирующих клеток *in vitro* и *in vivo* [29], что связано с эпигенетическими изменениями в активации транскрипции FoxP3 [30].

Несмотря на недавние достижения в исследовании Treg-клеток, получение большого количества клеток до сих пор остается нерешенной задачей. Основной проблемой является потеря экспрессии FoxP3 даже в чистой популяции Treg-клеток при длительном культивировании, что связано с необходимостью проведения повторных стимуляций [15]. В связи с этим внимание ученых на сегодняшний день сосредоточено на создании подходов, позволяющих получать стабильную популяцию Treg-клеток. Одним из кандидатов для использования в клеточных протоколах получения стабильных регуляторных клеток является полностью транс-ретиноевая кислота (all-trans retinoic acid, ATRA). Замечено, что естественные дериваты и метаболиты витамина А, такие как ретинол, ретиналь, ATRA и др., играют важную роль в клеточной дифференцировке, росте и апоптозе [31]. Совместное использование TGF-β и ATRA способствует дифференцировке наивных Т-клеток в сторону Treg-клеток, увеличению их количества и улучшению супрессорной активности у человека [32]. Молекулярный механизм действия ATRA на количество Treg-клеток до конца не выяснен. Однако показано, что делеция ядерного рецептора ATRA приводит к значительной потере экспрессии FoxP3 Treg, предполагая роль ATRA как стабилизатора экспрессии ядерного фактора [33]. Существенным минусом использования ATRA является то, что он предпочтительно стимулирует *ex novo* образование iTreg-клеток, которые обладают нестабильным фенотипом при воспалительных процессах *in vivo* [30]. Согласно этому, регуляторный фенотип iTreg-клеток мо-

жет быть легко изменен на провоспалительный при введении *in vivo* [34].

Еще одним кандидатом для увеличения количества Treg-клеток является витамин Д в связи с увеличением числа данных об иммуномодулирующей роли этого витамина и необходимости в индукции и поддержания Treg-клеток FoxP3+ *in vivo*. Так, показано, что концентрация витамина Д в плазме прямо коррелирует с количеством Treg-клеток FoxP3+ [35, 36]. Точного механизма действия витамина Д на поддержание генерации и (или) пролиферации Treg-клеток не описывается, однако известно, что эффект его зависит от концентрации. Высокие нефизиологичные концентрации витамина Д (10^{-6} М) приводят к продукции IL-10 CD4+ Т-клетками [36]. При физиологических концентрациях (10^{-7} М) витамин Д совместно с TGF-β способствует увеличению количества Treg-клеток FoxP3+ с высокой супрессорной активностью [37].

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК

Одним из важных вопросов остается антигенная специфичность регуляторных Т-клеток, полученных непосредственно из периферической крови методами сортировки либо культивированных *in vitro*. Так, на гуманизированных мышинных моделях было показано, что донорские антиген-специфические Treg-клетки более эффективны для индукции толерантности, чем полиспецифические Treg-клетки [2]. Хотя в первых исследованиях было показано умеренное преимущество антиген-специфичных Treg-клеток перед полиспецифичными [38].

Для получения аллоантиген-специфических регуляторных Т-клеток предлагается использовать сокультивирование донорских АПК и нефракционированных МНК реципиента [2]. Исследование активационных маркеров Treg-клеток человека при стимуляции с аллогенной периферической кровью или дермальными CD11c+ ДК выявило увеличение экспрессии CD69 и CD71 в течение 3–5 сут после активации. На основании этого авторы утверждали о формировании аллоантиген-специфических Treg-клеток. Кроме того, авторы продемонстрировали, что такие активированные Treg-клетки обладают более выраженным супрессорным эффектом, чем поликлональные Treg-клетки. Кроме того, в последних исследованиях была показана роль CD40L-активированных В-клеток для индукции антиген-специфических Treg-клеток *in vitro* [25]. При дополнительном

использовании анти-CD3/CD28-покрытых частиц совместно с IL-2 продемонстрировано не только увеличение количества Treg-клеток в 300–500 раз, но и аллореактивность полученных данным способом Treg-клеток против донорских антигенов. Показано, что антиген-специфическая супрессорная активность таких регуляторных Т-клеток защищает против повреждения кожи, опосредованного аллоантигенами, на гуманизированных мышиных моделях трансплантации.

Другим способом получения аллоантиген-специфических Treg-клеток является генетический перенос на них необходимых антиген-специфических TCR [39] или использование химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptors, CAR) [40]. На сегодняшний день большинство исследований CAR сосредоточено на получении антиген-специфических противоопухолевых Т-клеток CD8+. Только в нескольких исследованиях показана возможность получения Treg-клеток заданной специфичности, которые предотвращают развитие экспериментального аутоиммунного энцефалита или колита [40].

Ключевым вопросом для возможности проведения иммунотерапии с применением Treg-клеток остается возможность получения достаточного количества клеток с устойчивым фенотипом, которые при введении в организм будут способствовать развитию супрессии и не будут изменять свой фенотип в условиях трансплантации органов и (или) тканей в сторону аутоиммунных и цитотоксических реакций. Выделение Treg-клеток из периферической крови требует трудоемких дорогостоящих высокотехнологических манипуляций, что не всегда можно провести при трансплантации из-за тяжести состояния пациентов. Успехи клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний указывают на имеющиеся перспективные возможности развития новых клеточных технологий перепрограммирования иммунных реакций при трансплантации для создания условий иммуносупрессии при помощи ДК, Т-лимфоцитов и иммуносупрессорных цитокинов с последующей экспансией Treg-клеток. Использование ДК для презентации аллоантигенов Т-клеткам *in vitro* предоставляет возможность, используя небольшое количество материала, обеспечивать формирование достаточного пула стабильных аллоантиген-специфических регуляторных Т-клеток.

Таким образом, несмотря на разнообразие возможностей генерации регуляторных Т-клеток, не существует регламентированного протокола получения чистой популяции Treg-лимфоцитов. И если протоколы получения популяции

Treg-клеток для испытаний *in vitro* созданы, то одобренной технологии получения Treg-клеток для клинического применения на сегодняшний день еще не разработано. В последние несколько лет усилия исследователей сосредоточены на определении оптимальной методики для выделения и увеличения количества аллоантиген-специфических Treg-клеток из периферической или пуповинной крови. Авторами отмечается, что в перечисленных выше условиях для наиболее успешной экспансии Treg-клеток *ex vivo* необходимо проведение тщательной сортировки для выделения чистой популяции Treg-клеток. Изложенный выше материал отражает направления исследований с точки зрения создания протоколов для получения оптимального количества Treg-клеток для применения в клеточной коррекции реакций отторжения трансплантата.

ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ TREG ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Одним из серьезных трансплантационных осложнений у гематологических пациентов является развитие реакции «трансплантат против хозяина», являющейся потенциально жизнеугрожающей. Существующие в настоящее время протоколы терапии включают в себя иммуносупрессивный компонент, подавляющий развитие РТПХ, однако данный вариант нельзя назвать оптимальным. В связи с этим большой интерес вызывает возможность использования Т-регуляторных клеток.

Первыми в контексте предотвращения РТПХ были исследованы nTreg-клетки как более стабильная субпопуляция. Было продемонстрировано, что введение естественных Treg-клеток мышам предотвращает развитие острой РТПХ, однако соотношение Т-регуляторных и Т-эффекторных клеток должно быть высоким (1 : 1) [41]. Аналогичные подходы использовались и при работе на людях. При введении Treg-клеток после инфузии Т-клеток пациентам, перенесшим HLA-гаплоидентичную трансплантацию, после химиотерапии и лучевой терапии не происходило развития РТПХ даже без иммуносупрессивной терапии, отмечалась также высокая выживаемость пациентов (12 из 28 характеризовались медианой выживаемости 12 мес после трансплантации) [42, 43]. В работах, подобной этой, также применялись методы культивирования изолированных из периферической крови в присутствии IL-2, CD4+-фидерных клеток или в условиях антиCD3/CD28-стимуляции [44, 45].

В ряде других работ было показано, что Treg-клетки пуповинной крови человека, введенные мышам в модели острой РТПХ, улучшают выживаемость особей и уменьшают выраженность симптоматики. Это действие было опосредовано как секрецией IL-10 и TGF β , так и поляризацией Th17/Treg-баланса у реципиента в сторону Treg-клеток [46]. В одном из первых клинических испытаний на людях было показано, что введение обогащенной фракции Treg-клеток CD4+CD25+FoxP3+, выделенной из пуповинной крови, пациентам после химио- и лучевой терапии, сокращает риск развития РТПХ до 43% по сравнению с историческим контролем, где РТПХ II–IV степеней развивалась у 61% пациентов [47].

Упомянутые выше подходы были связаны с использованием естественных T-регуляторных клеток и имеют такие недостатки, как малая численность популяции при введении, а также отсутствие антиген-специфичности.

Следующим шагом стало использование индуцированных Treg-клеток, в том числе антиген-специфичных. Примечательным представляется тот факт, что, по данным разных исследователей, результаты применения iTreg-клеток являются достаточно противоречивыми. Так, например, показано, что для эффективного предотвращения развития РТПХ требуется или введение больших количеств iTreg-клеток [48], или дополнительное введение рапамицина и IL-2 [49] для поддержания стабильности фенотипа клеток. В то же время в модели острой РТПХ у мышей введение TGF β -индуцированных антиген-специфичных iTreg-клеток предотвращало развитие клинической симптоматики антиген-специфичным образом, при этом введение данной субпопуляции производило больший эффект, нежели введение поликлональных iTreg-клеток. Следует отметить, что экспансия iTreg-клеток после инфузии происходит более активно по сравнению с nTreg-клетками, однако nTreg-клетки характеризуются более стабильной экспрессией FoxP3 [50]. Аналогичные результаты были получены и для других типов антиген-специфичных iTreg-клеток [51].

Введение реципиент-специфичных T-регуляторных клеток в модели острой РТПХ у мышей не только предотвращало развитие нежелательных реакций, потери массы тела и последующей гибели особей, но и способствовало эффективному восстановлению субпопуляций лимфоцитов, в том числе экспансии собственных Treg-клеток. При этом на ранних стадиях CD4-лимфоциты характеризовались сниженной способностью к секреции провоспалительных цитокинов, однако

восстанавливали ее к 30-м сут. При введении вируса коровьей оспы профиль секреции IFN γ был близок к нормальному, однако не обнаружено секреции нейтрализующих антител, что связывается авторами с дефектами функционирования CD4+ и (или) В-лимфоцитарного компартмента [52]. Можно заключить, что, по-видимому, именно антиген-специфичность получаемых T-регуляторных клеток является показателем эффективности и специфичности терапии. Наблюдаемая же противоречивость результатов может быть объяснена использованием разных протоколов генерации клеток.

Таким образом, в настоящий момент показано, что и естественные, и индуцибельные T-регуляторные клетки, равно как и FoxP3-негативные IL-10-секретирующие Tr1-клетки, активны в предотвращении РТПХ в соответствующих моделях [45, 53]. Однако открытым остается вопрос сохранения Treg-клетками своего фенотипа и функциональной активности в условиях воспалительного микроокружения [54]. Одним из вероятных подходов может стать введение Treg-клеток в совокупности с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), способными поддерживать стабильность Treg-клеток после трансплантации. В работе, проведенной на мышинной модели острой РТПХ, продемонстрировано, что введение такого сочетания клеток улучшает выживаемость мышей (100% особей по сравнению с 80% в группе с изолированным введением Treg-клеток) и клиническую симптоматику РТПХ. При этом отмечалось подавление Th1-иммунного ответа и экспансии Th17-клеток у мышей-реципиентов. Вклад МСК при этом был связан не только с поддержанием стабильности T-регуляторных клеток, но и с восстановлением популяции эндогенных Treg-клеток [55].

Важной проблемой при проведении терапии Treg-клетками является потенциальное подавление реакции «трансплантат против лейкоза», что в целом негативно сказывается на прогнозе у пациентов. Первые попытки решения этой проблемы были связаны с увеличением дозы вводимых Treg-клеток, однако данный вариант является относительно более дорогостоящим и технически трудоемким. В связи с этим разрабатываются и другие подходы. Так, использование ингибитора HIF-1 α эхиномицина у мышей с острой РТПХ приводит к экспансии Treg-клеток и подавлению аллоген-специфичного Th1- и Th17-ответа и, как следствие, подавлению РТПХ с сохранением эффекта «трансплантат против лейкоза» [56].

Еще один вариант проведения клеточной терапии предполагает совместное введение аллореак-

тивных CD4⁺- и CD8⁺-регуляторных клеток [57]. Само по себе использование CD8⁺- поликлональных iTreg-клеток, видимо, оказывается не столь эффективным вследствие быстрой потери экспрессии FoxP3 и меньшей выраженностью ответа на рапамицин и IL-2 [49]. При этом именно воздействие Т-регуляторных клеток CD8⁺ при совместном введении связывают с модулированием реакции, позволяющим сохранить анти-РТПХ-ответ без потерь и способствующим эффективности противоопухолевой терапии. Примечательно, что в данном исследовании в мышинной модели супрессия РТПХ аллореактивными CD4-регуляторными клетками была антиген-специфической [57].

Таким образом, при планировании использования Т-регуляторных клеток в терапии РТПХ критическими моментами являются количественные показатели субпопуляции (в случае pTreg-клеток), стабильности фенотипа (в случае iTreg-клеток) и антиген-специфичности, влияющей как на эффективность профилактики РТПХ, так и на эффективность противоопухолевого ответа. Исходя из этих принципов, к настоящему моменту проведено несколько клинических исследований для оценки возможности использования различных протоколов введения Т-регуляторных клеток людям. Как было упомянуто выше, первые исследования показали безопасность введения Т-регуляторных клеток, а также их потенциальную активность в отношении РТПХ [42, 47]. В дальнейшем проводился эксперимент по введению изолированных донорских Treg-клеток пациентам с острым лейкозом перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Введение конвенциональных Т-клеток в количестве 10⁶/кг и Treg-клеток (2 x 10⁶/кг) привело к увеличению выживаемости пациентов, отсутствию проявлений РТПХ, более быстрой иммунной реконструкции [58]. По мнению некоторых исследователей, это может говорить об отсутствии влияния Treg-клеток на реакцию «трансплантат против лейкоза», но такое мнение требует дополнительного подтверждения [58].

Помимо этого, проведено исследование по лечению хронической РТПХ у резистентных к терапии пациентов при помощи введения Treg-клеток и низких доз IL-2. У всех пациентов наблюдалось улучшение или стабилизация состояния. При этом у трех из пяти пациентов отмечалась активация Т-клеточного звена, не имевшая, по-видимому, негативных клинических проявлений вследствие использования малых доз IL-2 [60]. В одном из исследований (ALT-TEN) использо-

вались Tr1-клетки, вводимые пациентам после кондиционирования и трансплантации гаплоидентичных гемопоэтических стволовых клеток. Следует отметить, что в ходе исследования восемь пациентов умерли, поэтому корректная дальнейшая интерпретация результатов была затруднена. Кроме того, соотношение введенных эффекторных и регуляторных клеток было слишком высоким. Таким образом, требуются дальнейшие исследования для полной оценки возможностей использования Tr1-клеток [60].

Суммируя все вышесказанное, важно подчеркнуть, что получение антиген-специфических Т-регуляторных клеток со стабильным фенотипом и функциональными способностями для терапии и профилактики РТПХ по-прежнему остается актуальной задачей, решение которой может включать как использовавшиеся ранее подходы, так и новые разработки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для нормального функционирования организма естественные Treg-клетки CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ являются незаменимой составляющей установления и поддержания иммунологической аутоотолерантности и иммунного гомеостаза. На сегодняшний день исследования ученых сосредоточены на выделении и экспансии не полиспецифичных клонов Treg-клеток, как было в начале их открытия, а на получении аллоантиген-специфичных клонов Treg, которые способны прицельному и сильному подавлению аллоантиген-специфических эффекторных клеток, ответственных за развитие реакций отторжения трансплантата. Совместно с современными успехами в получении Treg-клеток *in vitro*, а также результатами первых испытаний *in vivo* на мышах, все вышеперечисленное позволит начать разработку клеточных протоколов иммунокоррекции, основанной на использовании Т-регуляторных клеток, как аллоспецифичных, так и полиспецифичных, в качестве дополнительной профилактики реакций отторжения трансплантата. Такие испытания улучшат понимание механизмов развития иммунного контроля и позволят открыть новые биомаркеры, которые будут служить предикторами успешной индукции иммунологической толерантности. Полученные в клинических испытаниях данные могут позволить уменьшить объем проводимой системной иммуносупрессорной терапии, которая сейчас применяется для снижения вероятности реакций отторжения пересаженных органов и тканей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (соглашение № 16-15-00086 от 11.01.2016).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Katabathina V., Menias C.O., Pickhardt P., Lubner M., Prasad S.R. Complications of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation. *Radiol. Clin. N. Am.* 2015; 54. (2): 303–319. DOI: 10.1016/j.rcl.2015.09.009.
- Sagoo P., Ali N., Garg G., Nestle F.O., Lechler R.I., Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T-cells. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3 (83): p.83ra42. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002076.
- Hanash A.M., Levy R.B. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2005; 105 (4): 1828–1836. DOI: 10.1182/blood-2004-08-3213.
- Dijke I.E., Weimar W., Baan C.C. Regulatory T cells after organ transplantation: where does their action take place? *Hum. Immunol.* 2008; 69 (7): 389–398. DOI: 10.1016/j.humimm.2008.05.006.
- Sakaguchi S., Vignali D.A.A., Rudensky A.Y., Niec R.E., Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology.* 2013; 13: 461–467. DOI: 10.1038/nri3464.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* 2004; 22: 531–562. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
- Abbas A.K. et al. Regulatory T-cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nature Immunol.* 2013; 14: 307–308. DOI: 10.1038/ni.2554.
- Zeng M., Guinet E., Nouri-Shirazi M. B7-1 and B7-2 differentially control peripheral homeostasis of CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Transplant. Immunology.* 2009; 20: 171–179. DOI: 10.1016/j.trim.2008.09.009.
- Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Iwata M., Shimizu J., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology.* 1998; 10: 969–1980.
- Golshayan D., Jiang S., Tsang J., Garin M.I., Mottet C., Lechler R.I. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood.* 2007; 109: 827–835. DOI: 10.1182/blood-2006-05-025460.
- Joffre O., Santolaria T., Calise D., Al Saati T., Hudrisier D., Romagnoli P., van Meerwijk J.P. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* 2008; 14: 88–92. DOI: 10.1038/nm1688.
- Todo S., Yamashita K., Goto R., Zaitzu M., Nagatsu A., Oura T., Watanabe M., Aoyagi T., Suzuki T., Shimamura T. et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology.* 2016; 64 (2): 632–643. DOI: 10.1002/hep.28459.
- Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J. and Haffler D.A. CD4+CD25 high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001; 167: 1245–1253. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1245>.
- Hoffmann P., Eder R., Boeld T.J., Doser K., Piseschka B., Andreessen R. et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood.* 2006; 108 (13): 4260–4267. DOI: 10.1182/blood-2006-06-027409.
- Hoffmann P., Boeld T.J., Eder R., Huehn J., Floess S., Wieczorek G. et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39 (4): 1088–1097. DOI: 10.1002/eji.200838904.
- Yang X.O., Nurieva R., Martinez G.J., Kang H.S., Chung Y., Pappu B.P. et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 2008; 29 (1): 44–56. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.05.007.
- Miyao T., Floess S., Setoguchi R., Luche H., Fehling H.J., Waldmann H., Huehn J., Hori S. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity.* 2012; 36 (2): 262–275. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.12.012.
- Gagliani N.I., Magnani C.F., Huber S., Gianolini M.E., Pala M. et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* 2013; 19 (6): 739–746. DOI: 10.1038/nm.3179.
- Fujio K., Okamura T. and Yamamoto K. The family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Advances in Immunology.* 2010; 105: 99–129. DOI: 10.1016/S0065-2776(10)05004-2.
- Weiner H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* 2001; 182: 207–214. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2001.1820117.x.
- Shevach E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell mediated suppression. *Immunity.* 2009; 30 (5): 636–645. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.04.010.
- Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 1257–1265. DOI: 10.1084/jem.20062512.
- Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg

- cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1701–1711. DOI: 10.1084/jem.20060772.
24. Hartigan-O'Connor D.J., Poon C., Sinclair E. et al. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J. Immunol. Methods.* 2007; 319: 41–52. DOI: 10.1016/j.jim.2006.10.008.
25. Putnam A.L., Safinia N., Medvec A., Laszkowska M., Wray M., Mintz M.A. et al. Clinical grade manufacturing of human alloantigen-reactive regulatory T cells for use in transplantation. *Am. J. Transplant.* 2013; 13 (11): 3010–3020. DOI: 10.1111/ajt.12433.
26. Thomson A.W., Turnquist H.R., Raimondi G. Immuno-regulatory functions of mTOR inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9 (5): 324–337. DOI: 10.1038/nri2546.
27. Zeiser R., Leveson-Gower D.B., Zambricki E.A., Kambham N., Beilhack A., Loh J. et al. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+C-D25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood.* 2008; 111 (1): 453–462. DOI: 10.1182/blood-2007-06-094482.
28. Segundo D.S., Ruiz J.C., Izquierdo M., Fernandez-Fresnedo G., Gomez-Alamillo C., Merino R. et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2006; 82 (4): 550–557. DOI: 10.1097/01.tp.0000229473.95202.50.
29. Tresoldi E., Dell'albani I., Stabilini A., Jofra T., Valle A., Gagliani N. et al. Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells. *Haematologica.* 2011; 96 (9): 1357–1365. DOI: 10.3324/haematol.2011.041483.
30. Rossetti M., Spreafico R., Saidin S., Chua C., Moshref M., Leong J.Y. et al. Ex vivo-expanded but not in vitro-induced human regulatory T cells are candidates for cell therapy in autoimmune diseases thanks to stable demethylation of the Foxp3 regulatory T cell-specific demethylated region. *J. Immunol.* 2015; 194 (1): 113–124. DOI: 10.4049/jimmunol.1401145.
31. Theodosiou M., Laudet V., Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol. Life Sci.* 2010; 67 (9): 1423–1445. DOI: 10.1007/s00018-010-0268-z.
32. Lu L., Lan Q., Li Z., Zhou X., Gu J., Li Q. et al. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2014; 111 (33): 3432–3440. DOI: 10.1073/pnas.1408780111.
33. Lu L., Ma J., Li Z., Lan Q., Chen M., Liu Y. et al. All-trans retinoic acid promotes TGF-beta-induced Tregs via histone modification but not DNA demethylation on Foxp3 gene locus. *PLoS One.* 2011; 6 (9): e24590. DOI: 10.1371/journal.pone.0024590.
34. Basu R., Whitley S.K., Bhaumik S., Zindl C.L., Schoeb T.R., Benveniste E.N. et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance. *Nat. Immunol.* 2015; 16 (3): 286–295. DOI: 10.1038/ni.3099.
35. Smolders J., Thewissen M., Peelen E., Menheere P., Tervaert J.W., Damoiseaux J. et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One.* 2009; 4 (8): e.6635. DOI: 10.1371/journal.pone.0006635.
36. Urry Z., Chambers E.S., Xystrakis E., Dimeloe S., Richards D.F., Gabrysova L. et al. The role of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines in the pro-motion of distinct Foxp3+ and IL-10+ CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2012; 42 (10): 2697–2708. DOI: 10.1002/eji.201242370.
37. Chambers E.S., Suwannasaen D., Mann E.H., Urry Z., Richards D.F., Lertmemongkolchai G. et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in combination with transforming growth factor-beta increases the frequency of Foxp3(+) regulatory T cells through preferential expansion and usage of interleukin-2. *Immunology.* 2014; 143 (1): 52–60. DOI: 10.1111/imm.12289.
38. Trenado A., Charlotte F., Fisson S., Yagello M., Klatzmann D., Salomon B.L. et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J. Clin. Invest.* 2003; 112 (11): 1688–1696. DOI: 10.1172/JCI17702.
39. Brusko T.M., Koya R.C., Zhu S., Lee M.R., Putnam A.L., McClymont S.A. et al. Human antigen-specific regulatory T cells generated by T cell receptor gene transfer. *PLoS One.* 2010; 5 (7): e11726. DOI: 10.1371/journal.pone.0011726.
40. Jethwa H., Adami A.A., Maher J. Use of gene-modified regulatory T-cells to control autoimmune and alloimmune pathology: is now the right time? *Clin. Immunol.* 2014; 150 (1): 51–63. DOI: 10.1016/j.clim.2013.11.004.
41. Hoffmann P., Ermann J., Edinger M., Fathman C.G., Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 389–399. DOI: 10.1084/jem.20020399.
42. Di Ianni M., Falzetti F., Carotti A., Terenzi A., Castellino F., Bonifacio E. et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood.* 2011; 117 (14): 3921–3928. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311894.
43. Hillard M. Lazarus. Acute leukemia in adults: novel allogeneic transplant strategies. *Hematology.* 2012; 17 (1): 47–51. DOI: 10.1179/102453312X13336169155493.
44. Godfrey W.R., Ge Y.G., Spoden D.J., Levine B.L., June C.H. et al. In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood.* 2004; 104: 453–461. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0151.
45. Jessica Heinrichs, David Bastian, Anandharaman Veerapathran, Claudio Anasetti, Brian Betts, and Xue-Zhong Yu Regulatory T-Cell Therapy for Graft-versus-host Disease. *J. Immunol. Res. Ther.* 2016; 1 (1): 1–14.

46. Jie Yang, Huahua Fan, Jun Hao, Yana Ren, Liang Chen, Guiping Li, Rufeng Xie, Yiming Yang, Kaicheng Qian, and Mingyao Liu. Amelioration of acute graft-versus-host disease by adoptive transfer of ex vivo expanded human cord blood CD4+CD25+ forkhead box protein 3+ regulatory T cells is associated with the polarization of Treg/Th17 balance in a mouse model. *Transfusion*. 2012; 52 (6): 1333–1347. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03448.x.
47. Brunstein C.G., Miller J.S., Cao Q., McKenna D.H., Hippen K.L., Curtsinger J. et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011; 117 (3): 1061–1070. DOI: 10.1182/blood-2010-07-293795.
48. Beres A., Komorowski R., Mihara M., Drobyski W.R. Instability of Foxp3 expression limits the ability of induced regulatory T cells to mitigate graft versus host disease. *Clin. Cancer Res*. 2011; 17: 3969–3983. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3347.
49. Zhang P., Tey S.K., Koyama M., Kuns R.D., Olver S.D. et al. Induced regulatory T cells promote tolerance when stabilized by rapamycin and IL-2 *in vivo*. *J. Immunol*. 2013; 191: 5291–5303. DOI: 10.4049/jimmunol.1301181.
50. Kenrick Semple, Yu Yu, Dapeng Wang, Claudio Anasetti, and Xue-Zhong Yu. Efficient and selective prevention of GVHD by antigen-specific induced Tregs via linked-suppression in mice. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2011; 17 (3): 309–318. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.12.710.
51. Hippen K.L., Merkel S.C., Schirm D.K., Nelson C., Tennis N.C., Riley J.L., June C.H., Miller J.S., Wagner J.E. and Blazar B.R. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am. J. Transplant*. 2011; 11 (6): 1148–1157. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03558.x.
52. Aline Gaidot, Dan Avi Landau, Gae lle Her le'ne Martin, Olivia Bonduelle, Yenkel Grinberg-Bleyer, Diana Matheoud, Sylvie Gregoire, Claude Baillou, Berhazine Combadiere, Eliane Piaggio et al. Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplantation coadministered with regulatory T cells for GVHD prevention. *Blood*. 2011; 117 (10): 2975–2983. DOI: 10.1182/blood-2010-08-299974.
53. Keli L. Hippen, James L. Riley, Carl H. June, and Bruce R. Blazar Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. *Semin. Immunol*. 2011; 23 (6): 462–468. DOI: 10.1016/j.smim.2011.07.008.
54. Amy J. Beres, William R. Drobyski. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front. Immunol*. 2013; 4: 163. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00163.
55. Eun-Sol Lee, Jung-Yeon Lim, Keon-Il Im, Nayoun Kim, Young-Sun Nam, Young-Woo Jeon, Seok-Goo Cho. Adoptive transfer of Treg cells combined with mesenchymal stem cells facilitates repopulation of endogenous Treg cells in a murine acute GVHD model. *PLoS One*. 2015; 10 (9): e0138846. DOI: 10.1371/journal.pone.0138846.
56. Yushi Yao, Lei Wang, Jihao Zhou and Xinyou Zhang Yao et al. HIF-1 α inhibitor echinomycin reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. *J. Transpl. Med*. 2017; 15 (1): 28. DOI: 10.1186/s12967-017-1132-9.
57. Jessica Heinrichs, Jun Li, Hung Nguyen, Yongxia Wu, David Bastian, Anusara Daethanasanmak, M-Hanief Sofi, Steven Schutt, Chen Liu, Junfei Jin et al. CD8 Tregs promote GVHD prevention and overcome the impaired GVL effect mediated by CD4 Tregs in mice. *Oncoimmunology*. 2016; 5 (6): e1146842. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1146842.
58. Marco Romano, Sim Lai Tung, Lesley Ann Smyth, Giovanna Lombardi. Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl. Int*. 2016. DOI: 10.1111/tri.12909.
59. Theil A., Tuve S., Oelschlägel U. et al. Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2015; 17: 473–486. DOI: 10.1111/cei.12887.
60. Bacchetta R., Lucarelli B., Sartirana C. et al. Immunological outcome in haploidentical-HSC transplanted patients treated with IL-10-anergized donor T cells. *Front. Immunol*. 2014; 5: 1–14. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00016.

Поступила в редакцию 28.06.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Сенников Сергей Витальевич, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии НИИФКИ, г. Новосибирск.

Хантакова Юлия Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Кнауэр Надежда Юрьевна, лаборант-исследователь, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

(✉) Сенников Сергей Витальевич, e-mail: SennikovSV@gmail.com.

УДК 616-089.819.843-085.37:577.27

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-199–210

For citation: Sennikov S.V., Khantakova J.N., Knauer N.Y. T-regulatory cells in transplantology: from preparation to clinical applications. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 199–210.

T-regulatory cells in transplantology: from preparation to clinical applications

Sennikov S.V., Khantakova J.N., Knauer N.Y.

¹ *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yudrincevskay Str., 630099, Novosibirsk, Russian Federation*

ABSTRACT

The intensive study of the cellular approaches for the correction of different pathologies, including immunopathological processes and oncology, as well as the investigation of the immunosuppressive role of the regulatory T-cells (Tregs) made conditions for the development of techniques of the cell-based correction of immune-mediated states, such as autoimmune pathology or transplantation. Since there are few Tregs in periphery and no specific Treg marker is known, the sorting of the whole blood yields insufficient number of cells. That is why it is emerging to search for optimal conditions of Treg generation and expansion using proliferation stimulators and targeted differentiation of the “pure” Treg population that does not involve the proliferation of effector cells. To date, promising results of the Treg immunotherapy to induce allospecific tolerance in recipients having transplanted organs or tissues were obtained in laboratory experiments and clinical trials. The key problems of this therapy are the lack of knowledge about the mechanism of action and the specific phenotype of the most efficient tolerance-inducing Tregs, and the difficulties to obtain stable populations of functional Tregs. Moreover, it is still unknown how to obtain antigen-specific Treg populations and what the mechanism of their action is. In this review the protocols of Treg generation are summarized and the clinical data on the Treg use for the induction of allo-specific tolerance in transplantation are analyzed.

Key words: T-regulatory cells, cell immunotherapy, transplantation, HVGD, rapamycin, ATRA, vitamin D.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The work is supported by the Russian Science Foundation (agreement No. 16-15-00086 of 11.01.2016).

Received 28.06.2017

Accepted 06.02.2018-

Sennikov Sergey V., DM, Professor, Head of Molecular Immunology Department, RIFCI Novosibirsk, Russian Federation.

Khantakova Julia N., PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, RIFCI Novosibirsk, Russian Federation.

Knauer N.Y., Laboratory Assistant Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) Sennikov Sergey V., e-mail: SennikovSV@gmail.com.

УДК 616-001:617.3]-089.168.1-06:616.89

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-211-219

Для цитирования: Стаценко И.А., Стегалов С.В., Лебедева М.Н., Первухин С.А. Современный взгляд на проблему острого послеоперационного делирия у пациентов травматолого-ортопедического профиля в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 211–219.

Современный взгляд на проблему острого послеоперационного делирия у пациентов травматолого-ортопедического профиля в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии

Стаценко И.А., Стегалов С.В., Лебедева М.Н., Первухин С.А.

Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии (ННИИТО) им. Я.А. Цивьяна
Россия, 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

РЕЗЮМЕ

Цель представленного обзора литературы — систематизация известных сведений по проблеме послеоперационного делирия как частого осложнения у пациентов пожилого и старческого возраста при проведении обширных реконструктивных хирургических операций на позвоночнике и крупных суставах. В обзоре, основанном на публикациях зарубежных и отечественных авторов, приводятся современные представления о патогенезе, факторах риска, диагностике, методах лечения и профилактике этого осложнения.

Очевидно, что повышение числа операций в травматологии и ортопедии сопровождается увеличением риска возникновения послеоперационного делирия. И этот риск связан в первую очередь с возрастным составом пациентов. Возрастающий интерес к этой проблематике имеет кроме клинического значения и четкие экономические предпосылки.

В настоящее время считается, что этиология развития делирия — многофакторная. Исключительно важную роль играет создание инструментов диагностики послеоперационного делирия, что обеспечило возможность целевого контроля этого состояния в условиях отделения интенсивной терапии. Правильная организация лечебного процесса подразумевает возможность участия специалистов различных профилей на основе единства понимания патофизиологии данного состояния.

Формируется объем специфических знаний именно о послеоперационном делирии в отделении интенсивной терапии. И эта дефиниция имеет ряд отличий от того, что подразумевают под термином «делирий» в психиатрии и наркологии. Соответственно этим представлениям формируются модели терапевтических подходов. Оценены риски самой терапии. Намечена четкая тенденция к контролируемой седации. Накапливается опыт применения такого препарата, как дексмедетомидин, или дексдор, для профилактики и терапии делирия. Важность медикаментозной терапии делирия сложно переоценить, тем не менее немедикаментозные методы профилактики и лечения делирия сохраняют свою значимость.

Ключевые слова: послеоперационный делирий, патогенез, факторы риска, диагностика, лечение.

С каждым годом количество хирургических вмешательств в травматологии и ортопедии неуклонно возрастает, пропорционально увеличивается число пациентов старшей возрастной

категории. Старение общества — серьезная социально-экономическая проблема. Развитие медицины позволяет надеяться, что возраст активной старости, т. е. состояния, когда пожилой человек может вести полноценную жизнь, будет повышаться. Увеличение возраста пациентов немину-

✉ Стаценко Иван Анатольевич, e-mail: Stacenko_i@mail.ru.

емо ведет к возрастанию риска развития послеоперационных осложнений. Одним из наиболее частых осложнений у пациентов старшей возрастной группы травматолого-ортопедического профиля является развитие послеоперационного делирия (ПОД). Представленная проблема является актуальной и социально значимой. Развитие ПОД ведет к прогрессированию когнитивной дисфункции, увеличению времени нахождения пациента в стационаре и, как следствие, недостижению желаемого качества жизни. Наиболее подробно проблема ПОД представлена в работах зарубежных авторов, но в последнее десятилетие активно обсуждается и в отечественной литературе [1–4].

Частота развития ПОД у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) варьирует в широких пределах и составляет 13–80% [1]. У пациентов травматолого-ортопедического профиля частота развития ПОД, по данным разных авторов, также имеет широкий диапазон – 10–80% [5]. Как сообщают отечественные исследователи, средняя частота развития ПОД в результате хирургических вмешательств по поводу заболеваний крупных суставов нижних конечностей составляет 13–18% [4]. При хирургических операциях по поводу перелома шейки бедренной кости частота развития ПОД – 18–61% [2]. Пациенты, перенесшие декомпрессивные вмешательства на позвоночнике, имеют существенно более низкие показатели ПОД – 5% [6].

Причинами такой широкой частоты встречаемости ПОД, вероятно, являются разрозненные методы диагностики и терминологическая путаница, так как часто в понятие ПОД вкладывают такие состояния, как энцефалопатия, острый психоз, цереброваскулярное заболевание. В настоящее время делирий включен в Международную классификацию болезней МКБ-10. Делирий (F05) – это этиологически неспецифический синдром, характеризующийся сочетанным расстройством сознания, внимания, восприятия, мышления, памяти, психомоторного поведения, эмоций и цикла «сон – бодрствование». Как правило, ПОД развивается в течение первых суток после операции. Более 80% всех случаев ПОД проявляются через 2–5 ч после завершения хирургического вмешательства, он также может возникнуть сразу после пробуждения больного. Однако описаны случаи развития ПОД в более поздние сроки, через 3–5 сут после операции, а его продолжительность может составлять 1–10 сут [7].

В настоящее время существует общепринятая классификация типов клинических проявлений ПОД, впервые предложенная в 1983 г. Z. Lipowski:

1. Гипоактивный делирий (пациенты выглядят подавленными, ослабленными, отстраненными со слабой реакцией на стимулы).

2. Гиперактивный делирий (пациенты возбуждены или агрессивны, могут демонстрировать бредовые идеи и галлюцинации).

3. Смешанный тип делирия (происходит смена гипо- и гиперактивного типов делирия) [1].

При субсиндромальной форме делирия у пациентов проявляется клиника лишь некоторых его признаков. Выделение субсиндромальной формы делирия определило теорию делирия как многофакторного состояния. На данный момент патогенез ПОД до конца неизвестен. Выделяют следующие теории патогенетического развития делирия.

1. Дисбаланс важнейших нейромедиаторов головного мозга – ацетилхолина и дофамина, которые являются антагонистами: дофамин повышает нейрональную возбудимость, а ацетилхолин снижает. Дисбаланс одного или обоих медиаторов вызывает нарушение работы нейронов. По мнению ряда авторов, увеличение дофаминэргической или снижение ацетилхолинэргической активности сопровождается развитием делирия. Важным доказательством правильности этой гипотезы является достаточно высокая клиническая эффективность галоперидола – мощного блокатора дофаминэргической системы мозга [4].

2. Нарушение соотношения концентраций триптофана и неароматических нейтральных аминокислот в крови.

В патогенезе ПОД участвуют и другие нейромедиаторы, в частности норадреналин, гамма-аминомасляная кислота, серотонин, эндорфины. Изменение синтеза основных нейротрансмиттеров может быть результатом нарушения поступления аминокислот – предшественников нейромедиаторов в головной мозг. Это может происходить при изменении соотношения в крови ароматических и неароматических аминокислот. К ароматическим аминокислотам относятся триптофан – предшественник серотонина и фенилаланин – предшественник дофамина и норадреналина.

3. Воспалительный ответ на критические нарушения.

Под действием провоспалительных цитокинов происходит выброс цитокинов, что приводит к протромботическим состояниям. В исследованиях на животных показано, что это состояние является причиной нарушения церебрального кровотока и может провоцировать ПОД [8].

4. Нарушение циркадного ритма.

В недавно выполненных исследованиях было обнаружено, что послеоперационное расстрой-

ство сна и связанное с этим снижение секреции мелатонина способствуют развитию ПОД. Мелатонин играет важную роль в различных функциях организма: обладает значимым хронобиотическим эффектом, регулирует цикл «сон – бодрствование», является эффективным нейтрализатором свободных радикалов, обладает выраженной антиоксидантной активностью, противовоспалительными, опосредованными антиапоптотическими и антиноцицептивными свойствами [9].

Все авторы единогласно склоняются к мнению, что этиология развития ПОД является многофакторной, следовательно, в каждом случае развития данного состояния выделяют несколько ведущих причин развития. В литературе описывают не менее 60 факторов риска развития ПОД [10]. Основные из них: возраст более 70 лет, нарушения питания, дегидратация и обстипация [11], нарушение сна в периоперационном периоде, чрезмерные эмоциональные эпизоды, использование общей анестезии, интраоперационная гиперкапния, продолжительность операции более 3 ч [2].

В целом факторы риска развития ПОД в хирургии позвоночника достаточно схожи с таковыми в хирургии крупных суставов, а именно предоперационные: возраст более 65 лет, зависимость от алкоголя и психоактивных препаратов, неврологические и психические нарушения,

анемия, электролитные нарушения, низкая масса тела. Интраоперационные факторы риска включают кровопотерю, продолжительность оперативного вмешательства [12]. Послеоперационные факторы риска содержат пониженный гемоглобин и натрий, лихорадку [2].

Распознавание делирия и управление им в ОРИТ быстро развивались в течение последнего десятилетия в связи с применением доказанно надежных и легко воспроизводимых шкал. Общество критической медицины Society of Critical Care Medicine рекомендует две системы для выявления делирия в ОРИТ. Одной из них является система Intensive Care Delirium Screening Checklist (ICDSC) – скрининговый контрольный лист, основанный на проявлениях делирия и оценке состояния пациента по пунктам, включая измененный уровень сознания, внимания, дезориентации, особенности психомоторных реакций, нарушений цикла «сон – бодрствование» и колебаний симптомов. У пациентов, имеющих более 4 баллов, диагностируется делирий с чувствительностью 99% и специфичностью 35%. В 2001 г. высокую специфичность (98–100%), чувствительность (93–100%) и надежность показал метод оценки психического статуса Confusion assessment method intensive care unit (CAM-ICU), по сути, представляющий собой алгоритм диагностики делирия [8, 13, 14] (рис.).

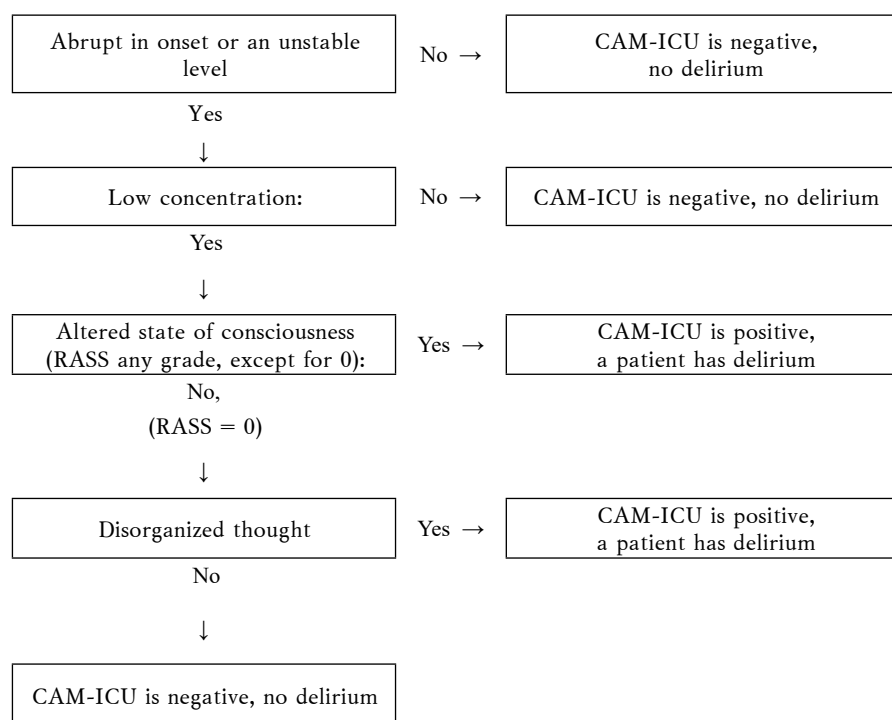


Рисунок. Алгоритм CAM-ICU

Figure. CAM-ICU algorithm

Алгоритм используется в комбинации с шкалой Richmond Agitation-Sedation Score (RASS) и другими, которые могут быть использованы как старшим, так и средним медицинским персоналом отделений интенсивной терапии, а также врачами других специальностей [14]. Алгоритм обеспечивает структуру оценки седации и делирия, которая может быть выполнена менее чем за 2 мин. Протоколы диагностики делирия очень полезны в отслеживании динамики изменений неврологического статуса пациентов с параллельной коррекцией доз наркотических и седативных препаратов. Эффективностью использования алгоритма и шкалы RASS являются уменьшение продолжительности делирия и снижение дозы медикаментов, таких как галоперидол [15]. Предложенные шкалы и алгоритм оценки ПОД с успехом реализуются на практике, о чем свидетельствуют многочисленные рандомизированные проспективные исследования [16–19].

Терапия ПОД в настоящее время начинается с немедикаментозных методов профилактики и предупреждения развития данного состояния путем использования методов скрининга делирия у всех пациентов: устранение факторов, способствующих развитию делирия, проведение седации только в ночное время, пребывание родственников рядом с пациентом с целью устранения необходимости его фиксации. Назогастральный зонд, мочевого и центральный венозный катетеры должны быть удалены как можно раньше. Предприняты меры по нормализации моторной функции кишечника [1, 11].

В 2013 г. Американская коллегия специалистов по неотложной медицине American College of Critical Care Medicine опубликовала пересмотренную версию рекомендаций по лечению боли, возбуждения и делирия (Pain, Agitation, Delirium) (PAD). Основным принципом рекомендаций PAD является важность устранения боли, возбуждения и делирия у пациентов в критических состояниях с использованием комплексного междисциплинарного подхода. По сравнению с предыдущей версией данного руководства версия рекомендаций PAD за 2013 г. в большей степени основана на доказательствах и ориентирована на потребности пациента в ней, профилактику избыточной седации, а также обеспечение более ранней экстубации и физической мобилизации [20].

Ранняя стратегия проведения седации бензодиазепинами кардинально изменена, и в настоящее время их применение (кроме случаев алкогольного делирия) нежелательно, так как увеличивает риск возникновения делирия в три раза [21, 22].

Галоперидол используется в качестве антипсихотика уже более 60 лет. Столь длительный период применения является своеобразным гарантом безопасности [11]. Препарат рекомендован к использованию в 2002 г. обществом критической медицины Sociate Critical Care Medicine. Несмотря на это, галоперидол используют только 42–80% врачей отделений интенсивной терапии, а атипичные нейролептики применяются в 35–40% случаев [21]. Отмечено, что в тех случаях, когда на ранних стадиях развития делирия назначался галоперидол, продолжительность течения делирия значительно уменьшалась ($p = 0,02$) [23].

Доказательства высокой эффективности галоперидола были получены в 2005 г., когда Е.В. Milbrant с соавт. опубликовали ретроспективное когортное исследование с участием 989 пациентов, находившихся на искусственной вентиляции легких и получавших галоперидол. Летальность в данной группе пациентов была меньше в сравнении с группой пациентов, не получивших галоперидол ($p = 0,004$) [24]. В другом исследовании тестировали эффективность малых доз галоперидола у пожилых пациентов, имеющих риск возникновения делирия. Это исследование доказало неэффективность галоперидола в снижении частоты ПОД, но продемонстрировало положительный результат в уменьшении длительности течения и тяжести делирия. Авторы сообщают о статистически значимом уменьшении количества дней госпитализации ($p = 0,001$) [23].

Другие авторы в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании тестировали возможное влияние галоперидола на частоту ПОД у 557 пациентов, поступивших в ОРИТ после некардиохирургических операций [25]. В течение 7 сут после операции пациентов тестировали на наличие делирия. Случаи делирия в группе с использованием галоперидола составили 15,3% в сравнении с 23,2% в контрольной группе ($p = 0,031$). В целом показаны надежность и эффективность применения галоперидола, что отмечено в ряде исследований. Основным механизмом действия галоперидола – антагонизм к D₂-рецепторам и высвобождение ацетилхолина. Позитронно-эмиссионное томографическое исследование показало, что даже малые дозы (2–4 мг/сут) галоперидола обеспечивают блокаду 53–74% рецепторов и, следовательно, возможно использование малых доз для снижения частоты побочных эффектов препарата. А предполагаемый противовоспалительный эффект галоперидола может также иметь клиническое значение при наличии мультиорганной дисфункции [26].

Начиная с 2004 г., в опубликованных исследованиях сравнивается эффективность терапевтического действия галоперидола и атипичных нейролептиков. Логика достаточно проста: атипичные нейролептики могут быть эффективны при лечении ПОД и проявлять меньше побочных эффектов по сравнению с галоперидолом. Атипичные нейролептики отличаются от нейролептиков-антипсихотиков, таких как галоперидол, своим ограниченным сродством к дофаминовым рецепторам (особенно к D₂-рецепторам) и имеют широко вариативную аффинность к другим рецепторам центральной нервной системы, включая серотонинергические, адренергические и мускариновые [27].

Были продемонстрированы результаты в исследованиях с амисульпидом [28], кветиапином и рисперидоном [29]. В недавно проведенном проспективном слепом рандомизированном исследовании сравнивали эффективность и безопасность галоперидола, оланзапина и рисперидона в терапии ПОД [30]. Было показано, что рисперидон и оланзапин так же эффективны, как галоперидол.

В пилотном исследовании с включением 36 пациентов ОРИТ J.W. Devlin с соавт. продемонстрировали, что кветиапин, дополненный галоперидолом, уменьшает продолжительность делирия ($p = 0,006$), снижает возбуждение, увеличивает количество случаев ранней реабилитации и скорейшего перевода пациентов домой [5]. При лечении кветиапином по сравнению с галоперидолом продолжительность пребывания в ОРИТ сократилась ($p = 0,05$). Другое пилотное исследование, опубликованное T.D. Girard с соавт., показало необходимость проведения плацебо-контролируемых исследований с целью оценки эффективности использования галоперидола и ципразидона для профилактики и лечения делирия в ОРИТ [31]. Эффективно применяемый в наркологии и психиатрии атипичный нейролептик тиаприд пока не нашел своего широкого применения у пациентов ОРИТ как средство для терапии делирия. Хотя он и показал свою эффективность при лечении алкогольной зависимости как эффективный корректор поведения. В раннее проведенных исследованиях было отмечено, что побочные эффекты галоперидола, такие как аритмии типа *torsades de pointes*, злокачественный нейролептический синдром, нарушение углеводного и липидного обмена, венозные тромбозы, превышали таковые у атипичных нейролептиков [32]. Таким образом, профиль безопасности типичных и атипичных нейролептиков у пожилых пациентов остается под вопросом независимо от класса [33].

Антипсихотики позиционируются как класс препаратов, имеющих риск как для возникновения *torsades de pointes*, так и изменения интервала QT [34]. Отмечено, что галоперидол имеет меньшее соотношение возникновения внезапной коронарной смерти среди других типичных и атипичных нейролептиков [35]. Однако последние исследования причин внезапной коронарной смерти подчеркивают необходимость проведения дальнейших плацебо-контролируемых исследований, так как эти медикаменты активно используются в ОРИТ [21, 34]. Нужно понять необходимость будущих исследований по безопасности и эффективности галоперидола и атипичных нейролептиков терапии ПОД и проводить плацебо-контролируемые исследования [31, 36, 37].

Важно заметить, что большинство подходов к седации пациентов в ОРИТ содержат протокол «проснись и дыши», строгое расписание прекращения седации в течение дня, учитывая значимое влияние развития критического состояния на циркадный ритм и когнитивную дисфункцию [38, 39]. Кроме того, медикаменты, используемые у пациентов в критическом состоянии, например бензодиазепины, могут влиять на циркадный ритм [38]. Известно, что мелатонин секретируется шишковидной железой и является общепринятым показателем функции циркадного ритма. Неудивительно, что пациенты в критическом состоянии имеют не только нарушения сна, но и измененный уровень мелатонина. Проведенные исследования показали измененный уровень мелатонина и инициировали интерес к применению мелатонина и агониста мелатонина, чтобы влиять на сон и когнитивные функции. Интересны проведенные исследования о влиянии применения мелатонина на потребность в седации, улучшение неврологического состояния и снижение стоимости лечения [40].

К сожалению, некоторые стратегии терапии делирия, на которые возлагались большие надежды, не оправдались. Так, особое разочарование вызывают ингибиторы холинэстеразы, такие как ривастигмин и донезепил. Предполагаемая эффективность этих препаратов базировалась на популярной холинергической теории развития делирия и наблюдениях, что антихолинергические препараты могут быть вредны для пациентов с делирием. В 2010 г. M.M. Eijk с соавт. в мультицентровом двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании показали, что ривастигмин, добавленный к галоперидолу, не снижал, а напротив, увеличивал продолжительность делирия. Фактически исследование было завершено раньше ввиду

бессмысленности и опасности его продолжения: в группе ривастигмина были отмечены увеличение продолжительности делирия ($p = 0,06$) и увеличение летальности ($p = 0,07$) [41].

В течение последнего десятилетия проявляется интерес к относительно новому $\alpha 2$ -агонисту дексметомидину – гипнотику, одобренному управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США Food and Drug Administration в 1999 г., эффективно-му в терапии делирия и не имеющему значимого депрессивного влияния на дыхание [42, 43]. Известно, что $\alpha 2$ -рецепторы описаны С. Gregoretti с соавт. как наиболее важные пресинаптические рецепторы, которые имеют большую плотность в области серого пятна и желатинозной субстанции. Пресинаптическая активация уменьшает высвобождение норэпинефрина, индуцируя симпатоллизис. Известно, что $\alpha 2$ -агонизм ассоциируется с симпатоллизисом, гипнозом, седацией, аналгезией и общим нейропротективным эффектом [44].

В большом ретроспективном исследовании М. Klompas с соавт. выявлено, что применение дексметомидина было ассоциировано с более коротким временем до экстубации трахеи в сравнении с использованием в качестве гипнотика пропофола [45]. Многие выполненные исследования показывают, что использование дексметомидина для седации ассоциировано с низким уровнем ажитации у пациентов с ПОД [37], быстро проявляет эффект при внутривенном введении (примерно через 15 мин) с пиком концентрации через 1 ч при продленной инфузии [44]. Этот препарат проявляет высокую аффинность к белку и имеет объем распределения 1,33 л/кг, печеночный путь метаболизма с участием цитохрома P450. Но дексметомидин в рекомендуемых дозах не лишен побочных эффектов, таких как брадикардия и гипотензия, что должно учитываться в практике.

А что будет, если дозу вводимого дексметомидина уменьшить? Этот вопрос подтолкнул группу исследователей к проведению плацебо-контролируемого двойного слепого исследования по изучению влияния экстремально низких (0,1 мкг/кг/ч) доз дексметомидина. Такой режим дозирования не сопровождался гипотензией и брадикардией, но был ассоциирован со снижением случаев послеоперационного делирия с 23% до 9% ($p < 0,0001$) [46].

Таким образом, сведения, содержащиеся в многочисленных литературных источниках по проблеме ПОД, реально показывают, что использование стандартизированных оценочных шкал и протоко-

лирование путей седации пациентов с ПОД влияют на уменьшение длительности пребывания пациентов в условиях ОРИТ и стационара [16]. Понимание роли медикаментов, таких как типичные и атипичные нейролептики, дексметомидин, может дать ключ к разработке общей стратегии предупреждения послеоперационных осложнений, уменьшения их количества и сокращения длительности делирия. В выполнении этой задачи фармакотерапия должна быть частью целого ряда мероприятий, к которым относятся многочисленные программы лечения делирия в других условиях, чем ОРИТ, и показавших свою эффективность [47].

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 / REFERENCES

1. Корячкин В.А. Послеоперационный делирий в ортопедо-травматологической практике: пособие для врачей. СПб.: РНИИТО, 2013: 24. [Koryachkin V.A. Postoperative delirium in orthopedic and traumatological practice: manual for doctors. SPb.: RNIITO Publ., 2013: 24 (in Russ.).]
2. Корячкин В.А. Послеоперационный делирий: факторы риска и профилактика в ортопедо-травматологической практике (обзор литературы). *Травматология и ортопедия России*. 2013; 2 (37): 120–135. [Koryachkin V.A. Postoperative delirium: risk factors and prevention in orthopedic and traumatological practice. *Traumatologiya i ortopediya Rossii – Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2013; 2 (37): 120–135 (in Russ.).]
3. Политов М.Е., Бастрыкин С.Ю., Буланова Е.А., Овечкин А.М. Влияние анестезиологической тактики на развитие когнитивных расстройств после операций эндопротезирования тазобедренного и коленного суставов. *Региональная анестезия и лечение острой боли*. 2015; 9 (4): 21–27. [Politov M.E., Bastrykin S.Yu., Bulanov E.A., Ovechkin A.M. The influence of anesthesiological tactics on developing of cognitive disorders following endoplastic surgery on hip and knee joints. *Regionarnaya anesteziya i lechenie ostroy boli*. 2015; 9 (4): 21–27 (in Russ.).]
4. Попугаев К.А., Савин И.А., Лубнин А.Ю., Горячев А.С., Соколова Е.Ю., Зайцев О.С. Делирий в реаниматологической практике. Обзор литературы. *Анестезиология и реаниматология*. 2012; 4: 19–27. [Popugaev K.A., Savin I.A., Lubnin A.Yu., Goryachev A.S., Sokolova E.Yu., Zaytsev O.S. Delirium in neurointensive care unit. Literature review. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2012; 4: 19–27 (in Russ.).]

5. Devlin J.W., Roberts R.J., Fong J.J. et al. Efficacy and safety of quetiapine in critically ill patients with delirium: a prospective, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Crit. Care Med.* 2010; 38: 419–427.
6. Fineberg S.J., Nandyala S.V., Marquez-Lara A., Oglesby M., Patel A.A., Singh K. Incidence and risk factors for postoperative delirium after lumbar spine surgery. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013; 38: 1790–1796.
7. Whitlock E.L., Vannucci A., Avidan M.S. Postoperative delirium. *Minerva Anestesiologica*. 2009; 41 (4): 448–93.
8. Girard T.D., Pandharipande P.P., Ely E.W. Delirium in the intensive care unit. *Critical Care*. 2008; 12 (3): S3.
9. Wu Y. et al. Do fluctuations in endogenous melatonin levels predict the occurrence of postoperative cognitive dysfunction (POCD). *International Journal of Neuroscience*. 2014; Jun.
10. Pinho C., Cruz S., Santos A., Abelha F.J. Postoperative delirium: age and low functional reserve as independent risk factors. *J. Clin. Anesth.* 2016; Sep. 33: 507–513. DOI: 10.1016/j.jclinane.2015.09.002.
11. O'Mahony R., Murthy L., Akunne A., Young J. Guideline Development Group. Synopsis of the National Institute for Health and Clinical Excellence guideline for prevention of delirium. *Ann. Intern. Med.* 2011; Jun. 7; 154 (11): 746–751.
12. Li H., Li C.D., Yi X.D., Liu H., Liu X.Y. Analysis of risk factors for delirium in the elderly patients after spinal operation. *Chinese Beijing Da Xue Xue Bao*. 2012; 44: 467–270.
13. Frontera J.A. Delirium and sedation in the ICU. *Neurocrit. Care*. 2011; 14: 463–474.
14. Riker R.R., Picard J.T., Fraser G.L. Prospective evaluation of the Sedation-Agitation Scale for adult critically ill patients. *Crit. Care Med.* 1999; 19: 1317–1249.
15. Van den Boogaard M., Pickkers P., van der Hoeven H., Roodbol G., van Achteberg T., Schoonhoven L. Implementation of a delirium assessment tool in the ICU can influence haloperidol use. *Crit. Care*. 2009; 13 (4): R131.
16. Girard T.D., Kress J.P., Fuchs B.D. et al. Efficacy and safety of a paired sedation and ventilator weaning protocol for mechanically ventilated patients in intensive care (Awakening and Breathing Controlled trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008; 371: 98–134.
17. Pivec R., Johnson A.J., Mears S.C., Mont M.A. Hip arthroplasty. *Lancet*. 2012; 380: 1768–1777.
18. Riker R.R., Shehabi Y., Bokesch P.M. et al. Dexmedetomidine vs midazolam for sedation of critically ill patients: a randomized trial. *JAMA*. 2009; 301: 489–499.
19. Smith H.A., Boyd J., Fuchs D.C. et al. Diagnosing delirium in critically ill children: Validity and reliability of the Pediatric Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (pCAM-ICU). *Crit. Care Med.* 2009; 39: 150–157.
20. Barr J., Fraser G.L., Puntillo K. et al. Clinical practice guidelines for the management of pain, agitation and delirium in adult patients in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* 2013; 41 (1): 263–306.
21. Patel R.P., Gambrell M., Speroff T. et al. Delirium and sedation in the intensive care unit: survey of behaviors and attitudes of 1346 healthcare professionals. *Crit. Care Med.* 2009; 37: 427–444.
22. Pisani M.A., Murphy T.E., van Ness P.H. et al. Characteristics associated with delirium in older patients in a medical intensive care unit. *Arch. Intern. Med.* 2007; 167 (15): 1629–1634.
23. Kalisvaart K.J., Jonghe J.F., Bogaards M.J. et al. Haloperidol prophylaxis for elderly hip-surgery patients at risk for delirium: a randomized placebo-controlled study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2005; 53: 1658–1666.
24. Milbrant E.B., Rersten A., Kong L. et al. Haloperidol use associated with lower hospital mortality in mechanically ventilated patient. *Crit. Care Med.* 2005; 33: 226–229.
25. Wang W., Li H.L., Wang D.X. et al. Haloperidol prophylaxis decreases delirium incidence in elderly patients after noncardiac surgery: A randomized controlled trial. *Crit. Care Med.* 2012; Mar. 40 (3): 731–739.
26. Song C., Lin A., Kenis G., Bosmans E., Maes M. Immunosuppressive effects of clozapine and haloperidol: enhanced production of the interleukin-1 receptor antagonist. *Schizophr. Res.* 2000; 42: 157–164.
27. Bishara D., Taylor D. Upcoming agents for the treatment of schizophrenia: mechanism of action, efficacy and tolerability. *Drugs*. 2008; 37: 189–2292.
28. Lee K.U., Won W.Y., Lee H.K. et al. Amisulpride versus quetiapine for the treatment of delirium: a randomized, open prospective study. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2005; 20: 311–314.
29. Han C.S., Kim Y.K. A double-blind trial of risperidone and haloperidol for the treatment of delirium. *Psychosomatics*. 2004; 45: 297–301.
30. Grover S., Kumar V., Chakrabarti S. Comparative efficacy study of haloperidol, olanzapine and risperidone in delirium. *J. Psychosom. Res.* 2011; 71: 277–281.
31. Girard T.D., Pandharipande P.P., Carson S.S. et al. Feasibility, efficacy, and safety of antipsychotics for intensive care unit delirium: the MIND randomized, placebo-controlled trial. *Crit. Care Med.* 2010; 38: 420–437.
32. Zornberg G.L., Jick H. Antipsychotic drug use and risk of first-time idiopathic venous thromboembolism: a case-control study. *Lancet*. 2000; 356: 1219–1223.
33. Ballard C., Hanney M.L., Theodoulou M. et al. The dementia antipsychotic withdrawal trial (DART-AD): long-term follow up on a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 151–157.
34. Ray W.A., Chung C.P., Murray K.T., Hall K., Stein C.M. Atypical antipsychotic drugs and the risk of sudden cardiac death. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 217–235.
35. Harrigan E.P., Miceli J.J., Anziano R. et al. A randomized evaluation of the effects of six antipsychotic agents on QTc, in the absence and presence of metabolic inhibition. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2004; 24: 62–69.

36. Eijk M.M., Marum R.J., Klijn I.A. et al. Comparison of delirium assessment tools in a mixed intensive care unit. *Crit. Care Med.* 2009; 37 (6): 2102–2103.
37. Spronk P.E., Riekerk B., Hofhuis J., Rommes J.H. Occurrence of delirium is severely underestimated in the ICU during daily care. *Intensive Care Med.* 2009; 35: 996–1200.
38. Brainard J., Gobel M., Bartels K. et al. Circadian rhythms in anesthesia and critical care medicine: potential importance of circadian disruptions. *Semin. Cardiothorac Vasc. Anesth.* 2015; 19: 49–60.
39. Brainard J., Gobel M., Scott B. et al. Health implications of disrupted circadian rhythms and the potential for day-light as therapy. *Anesthesiology.* 2015; 122: 970–975.
40. Mistraretti G., Umbrello M., Sabbatini G. et al. Melatonin reduces the need for sedation in ICU patients: a randomized controlled trial. *Minerva Anestesiol.* 2015; 42: 1298–1310.
41. Eijk M.M., Roes K.C., Honing M.L. et al. Effect of rivastigmine as an adjunct to usual care with haloperidol on duration of delirium and mortality in critically ill patients: a multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised trial. *Lancet.* 2010; Nov. 27; 376 (9755): 1829–1837.
42. Nelson S., Muzyk A.J., Bucklin M.H. et al. Defining the role of dexmedetomidine in the prevention of delirium in the intensive care unit. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 635397.
43. Gregoretti C., Moglia B., Pelosi P., Navalesi P. Clonidine in perioperative medicine and intensive care unit: more than an anti-hypertensive drug. *Current Drug Targets.* 2009; Aug. 10 (8): 799–814.
44. Panzer O., Moitra V., Sladen R.N. Pharmacology of sedative-analgesic agents: dexmedetomidine, remifentanyl, ketamine, volatile anesthetics, and the role of peripheral mu antagonists. *Crit. Care Clin.* 2009; Jul. 25 (3): 451–469.
45. Klompas M., Li L., Szumita P. et al. Associations between different sedatives and ventilator-associated events, length-of-stay, and mortality in mechanically ventilated patients. *Chest.* 2015; 149 (6): 1339–1379.
46. Michael C. Reade. Low dose dexmedetomidine for the prophylaxis of perioperative ICU delirium – how much evidence is enough? *J. Thorac. Dis.* 2016; 8 (11) : 3020–3023.
47. Lundstrom M., Edlund A., Karlsson S., Brannstrom B., Bucht G., Gustafson Y.A multifactorial intervention program reduces the duration of delirium, length of hospitalization, and mortality in delirious patients. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2005; 53: 622–628.

Поступила в редакцию 23.10.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Стаценко Иван Анатольевич, врач анестезиолог-реаниматолог, отделение реанимации и интенсивной терапии, ННИИТО им. Я.В. Цивьяна, г. Новосибирск.

Стегалов Сергей Владимирович, врач анестезиолог-реаниматолог, отделение реанимации и интенсивной терапии, ННИИТО им. Я.В. Цивьяна, г. Новосибирск.

Лебедева Майя Николаевна, д-р мед. наук, зам. главного врача по анестезиологическому обеспечению, гл. науч. сотрудник, ННИИТО им. Я.В. Цивьяна, г. Новосибирск.

Первухин Сергей Александрович, канд. мед. наук, руководитель функциональной группы реаниматологии, ст. науч. сотрудник, ННИИТО им. Я.В. Цивьяна, г. Новосибирск.

(✉) Стаценко Иван Анатольевич, e-mail: Stacenko_i@mail.ru.

УДК 616-001:617.3]-089.168.1-06:616.89

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-211–219

For citation: Statsenko I.A., Stegalov S.V., Lebedeva M.N., Pervukhin S.A. Modern view on the problem of acute postoperative delirium in trauma and orthopedic patients in the intensive care unit. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2018; 17 (1): 211–219.

Modern view on the problem of acute postoperative delirium in trauma and orthopedic patients in the intensive care unit

Statsenko I.A., Stegalov S.V., Lebedeva M.N., Pervukhin S.A.

Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics (TNRITO)

17, Frunze Str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

ABSTRACT

The purpose of the present literature review is a systematization of known evidence on the problem of postoperative delirium as a frequent complication in elderly and senile patients during extensive reconstructive

surgery on the spine and large joints. The review, which is based on publications of foreign and native authors, provides insights into current understanding of the pathogenesis, risk factors, diagnosis, methods of treatment, and prevention of these complications.

The number of operations in traumatology and orthopedy is increasing. Accordingly with this fact, we are seeing an increase the number of cases of postoperative delirium. We know that the risk of delirium is linked with patient age. The interest to this problem is growing and has clinical and economical background.

The etiology of delirium is considered to be multivariate. The development of diagnostic tools is playing a very important role and provides control of delirium in intensive care unit. Common understanding of this state's pathophysiology and the opportunity to participate another physician leads to correct organization of treatment process.

The knowledge of acute postoperative delirium in intensive care unit is being formed. The basic concept of postoperative delirium varies from its definition psychiatry and narcology due to differences in how different specialties treat the disorder. The risk factors of treatment are estimated. The controlled sedation is a clear trend. The experience of practical application dexmedetomidin for prevention and treatment of postoperative delirium is accumulated. Although the value of drug- therapy is difficult to overestimate the great influence on the result have non- pharmacological methods.

Key words: postoperative delirium, pathogenesis, risk factors, diagnosis, treatment.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

Received 23.10.2017

Accepted 06.02.2018

Statsenko Ivan A., Doctor Anesthesiologist-Resuscitator, TNIITO, Novosibirsk, Russian Federation.

Stegalov Sergey V., Doctor Anesthesiologist-Resuscitator, TNIITO, Novosibirsk, Russian Federation.

Lebedeva Maya N., DM, Deputy Chief Physician for Anesthesia, Chief Research Officer, TNIITO, Novosibirsk, Russian Federation.

Pervukhin Sergey A., PhD, Head of Intensive Care Unit, TNIITO, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Statsenko Ivan A.**, e-mail: Stacenko_i@mail.ru.

УДК 616-006.6-07-08:539.1.06

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-220–231

Для цитирования: Чернов В.И., Медведева А.А., Синилкин И.Г., Зельчан Р.В., Брагина О.Д., Чойнзонов Е.Л. Ядерная медицина в диагностике и адресной терапии злокачественных новообразований. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 220–231.

Ядерная медицина в диагностике и адресной терапии злокачественных новообразований

Чернов В.И.^{1,2}, Медведева А.А.¹, Синилкин И.Г.¹,
Зельчан Р.В.¹, Брагина О.Д.¹, Чойнзонов Е.Л.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

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

РЕЗЮМЕ

В статье рассмотрены основные тенденции и перспективы развития ядерной медицины, проблемы и возможные пути их решения. Описаны основные научные направления в разработке радиофармацевтических препаратов (РФП) для диагностики и радионуклидной терапии злокачественных новообразований (РФП, способные аккумулироваться в тканях, окружающих новообразование; РФП, способные накапливаться на мембранах клеток новообразования; РФП, поступающие в клетки новообразования; лимфотропные РФП для визуализации сторожевых лимфатических узлов). Показано, что современные тенденции развития ядерной медицины тесно связаны с тераностикой (терапия и диагностика) — использованием РФП, полученных на основе того или иного целевого соединения, меченного разными изотопами, предназначенными для диагностики или терапии. В ядерной медицине такие тандемы используются для индивидуализации и планирования радионуклидной терапии с помощью радиодиагностических исследований. Представлены результаты собственных исследований по разработке туморотропных препаратов и РФП для визуализации сторожевых лимфатических узлов. Продемонстрирована функциональная пригодность разрабатываемых препаратов, обозначены перспективы их внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: ядерная медицина, злокачественные новообразования, радиофармпрепараты, сторожевые лимфатические узлы, тераностика.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования (ЗНО) занимают одно из лидирующих мест в статистике смертности и стойкой утраты трудоспособности населения России (в настоящее время на учете в онкологических учреждениях стоит около 2% населения страны). К сожалению, отечественное здравоохранение по уровню ранней диагностики указанных заболеваний и по эффективности их

лечения существенно отстает от стран Запада. В то же время мировой опыт применения методов современной ядерной медицины доказал, что использование радионуклидной диагностики позволяет оптимизировать тактику лечения у 25–40% онкологических пациентов. Радионуклидная терапия с помощью β - или α -излучающих радиофармацевтических препаратов (РФП) хорошо зарекомендовала себя при лечении патологии щитовидной железы, лимфом, опухолей печени, простаты, костных метастазов и др.

✉ Брагина Ольга Дмитриевна, e-mail: rungis@mail.ru.

Высокая эффективность, а в ряде случаев и безальтернативность применения радионуклидов для диагностики и лечения злокачественных опухолей обусловили устойчивое развитие ядерной медицины и превращение ее в неотъемлемую часть онкологии [1–4]. Ежегодно объем мирового производства и использования РФП показывает стабильный рост на 10%. Мировой рынок радионуклидов в 2016 г. составил 9,6 млрд долларов, при этом 80% из них – радиофармпрепараты. Современные тенденции развития ядерной медицины тесно связаны с тераностикой (терапия и диагностика) – использованием РФП, полученных на основе того или иного целевого соединения, меченного разными изотопами, предназначенными для диагностики или терапии. В ядерной медицине такие тандемы используются для индивидуализации и проведения радионуклидной терапии с помощью радиодиагностических исследований [5, 6].

Среди радиофармпрепаратов, используемых для диагностики и адресной терапии опухолей, различают:

1. Радиофармпрепараты, способные аккумулироваться в клетках, окружающих новообразование:
 - в неповрежденных тканях;
 - тканях, измененных под влиянием злокачественного образования.
2. Радиофармпрепараты, способные накапливаться на мембранах клеток новообразования:
 - по механизму «антиген – антитело»;
 - механизму взаимодействия с рецепторами клетки.
3. Радиофармпрепараты, проникающие в клетки новообразования:
 - специфические;
 - неспецифические.
4. Лимфотропные радиофармпрепараты для визуализации сторожевых лимфатических узлов.

РАДИОФАРМПРЕПАРАТЫ, СПОСОБНЫЕ АККУМУЛИРОВАТЬСЯ В НЕПОВРЕЖДЕННЫХ ТКАНЯХ, ОКРУЖАЮЩИХ НОВООБРАЗОВАНИЕ

Эта группа объединяет РФП, способные аккумулироваться в тех или иных неповрежденных тканях организма, что позволяет визуализировать новообразование как дефект аккумуляции индикатора. Типичным представителем этой группы РФП является меченный ^{99m}Tc фитатный коллоид, который в норме накапливается в Купферовских клетках. При отсутствии поражения печени

на скинтиграммах визуализируется равномерное распределение РФП в паренхиме, в то время как в случае гепатоцеллюлярного рака или при наличии ее метастатического поражения появляются дефекты аккумуляции радиоактивного коллоида. Следует отметить, что представленная методика страдает низкой специфичностью, в связи с чем аналогичным образом выглядит любое другое объемное повреждение (например, киста или гемангиома) печени [2, 7].

Такие РФП, как ^{99m}Tc пертехнетат и радиоактивный йод (^{123}I или ^{131}I), также относятся к данной группе. Эти индикаторы много десятилетий успешно применяются с целью выявления злокачественных новообразований щитовидной железы. Указанные РФП накапливаются в нормально функционирующей ткани щитовидной железы, что дает возможность диагностировать ее злокачественное поражение, которое выглядит как область пониженного накопления РФП. Эта методика также не обладает высокой специфичностью, поскольку кисты щитовидной железы схожим образом определяются как дефекты аккумуляции РФП [2, 7]. В связи с низкими показателями чувствительности и специфичности в настоящее время скинтиграфические исследования с РФП указанной группы для диагностики злокачественных новообразований почти не используются.

РАДИОФАРМПРЕПАРАТЫ, СПОСОБНЫЕ АККУМУЛИРОВАТЬСЯ В ИЗМЕНЕННЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ОБРАЗОВАНИЯ ТКАНЯХ, ОКРУЖАЮЩИХ ОПУХОЛЬ

Применение РФП указанной группы основано на их сродстве к участкам ткани, измененных под влиянием роста опухоли. В отличие от вышепредставленных РФП, индикаторы этой группы активно используются на этапах диагностики и лечения злокачественных новообразований. К РФП рассматриваемой группы относятся фосфатные комплексы ^{99m}Tc , которые широко применяются для диагностики костных метастазов и первичных опухолей костей. Дело в том, что ткани, окружающие опухоль кости, в ответ на ее рост реагируют усилением пролиферации остеобластов, которые в свою очередь активно накапливают фосфатные комплексы. Таким образом, для первичных и метастатических злокачественных новообразований костей характерно наличие очагов повышенного накопления РФП. Следует

отметить, что остеосцинтиграфия не обладает высокой специфичностью, поскольку индикаторы рассматриваемой группы активно накапливаются при воспалении, травмах и некоторых других заболеваниях [8]. Диагностическая точность скинтиграфической визуализации ЗНО повышается при выполнении метода в режиме однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), особенно при ее сочетании с компьютерной томографией.

Феномен активного накопления фосфатных комплексов в остеобластах лег в основу паллиативной терапии костных метастазов методами ядерной медицины. В качестве РФП для этих целей используется оксабифор, меченный самарием-153, гидроксиэтилен дифосфонат и золедроновая кислота, меченные рением-186 [9, 10]. Помимо β -излучения, которым обусловлено терапевтическое воздействие на зоны повышенной остеобластической активности, указанные радионуклиды испускают γ -кванты (103 и 137 кэВ соответственно). Это излучение может быть успешно зарегистрировано посредством γ -камеры для визуализации распределения терапевтического РФП в организме пациента.

Не менее популярным нуклидом для лечения костных метастазов является стронций-89. Этот биологический аналог кальция накапливается как в интактной костной ткани, так и в очагах с повышенной активностью остеобластов. Следует отметить, что выведение РФП из пораженных метастазами областей происходит значительно медленнее, чем из нормальной ткани. Стронций-89 в отличие от ^{186}Re и ^{153}Sm не испускает γ -квантов, поэтому распределение этого РФП в организме нельзя визуализировать с помощью γ -камеры [11].

Еще одним механизмом, вызывающим повышенную аккумуляцию этой группы РФП в окружающие опухоль ткани, является активация неоангиогенеза в перифокальных зонах под влиянием биологически активных веществ, вырабатываемых злокачественным новообразованием. Этот феномен используется для скинтиграфической визуализации опухоли с использованием эритроцитов, меченных технецием-99m. При этом зоны повышенного кровоснабжения в тканях, окружающих новообразования, выглядят как горячий очаг.

Несмотря на невысокие показатели чувствительности и специфичности для диагностики опухолей, феномен повышенного кровоснабжения новообразований лег в основу радионуклидной терапии метастазов и первичного рака печени.

С этой целью используют введение в печеночную артерию β -излучающих нуклидов (^{131}I , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{32}P), соединенных с липидом, керамическими смолами, стеклянными или резиновыми микроферами.

РАДИОФАРМПРЕПАРАТЫ, СПОСОБНЫЕ НАКАПЛИВАТЬСЯ НА МЕМБРАНАХ КЛЕТОК НОВООБРАЗОВАНИЯ ПО МЕХАНИЗМУ «АНТИГЕН – АНТИТЕЛО»

Диагностическое использование РФП указанной группы для визуализации опухоли основано на реакции моноклональных антител, меченных γ -излучающими нуклидами с антигенами, расположенными на мембранах злокачественных клеток [5, 12, 13]. Следует отметить, что целые антитела (IgG), с которых начиналась эра радиоиммунодиагностики и радиоиммунотерапии, в настоящее время уступают место фрагментам антител fragments of antibody (Fab). Последние обладают рядом преимуществ, связанных с низкой иммуногенностью и высоким сродством к опухолевым клеткам. В то же время из-за быстрого клиренса меченных Fab из крови и их ускоренного, по сравнению обладающими большей молекулярной массой иммуноглобулинами, выведения почками, в опухолях с обедненным кровотоком может наблюдаться меньшее соотношение «опухоль – фон». К недостаткам Fab относятся также трудоемкость и высокая стоимость технологии их получения.

Следует отметить, что в процессе получения РФП на основе меченных радионуклидами антител или их фрагментов отмечается снижение их иммуноспецифичности. С целью предупреждения этих нежелательных явлений был предложен метод претаргетинга, когда комплекс «антитело – нуклид» образуется непосредственно в организме. При этом способе на I этапе внутривенно вводят антитела или их фрагменты, соединенные с хелатором. После накопления полученного комплекса в ЗНО наступает II этап, когда пациенту инъецируют радионуклид, который, соединившись с хелатором, позволяет диагностировать опухоль. Главным преимуществом претаргетинга являются уменьшение неспецифического связывания РФП и достижение высокой контрастности соотношение «опухоль – фон».

Для радионуклидной диагностики и терапии диссеминированного рака предстательной железы перспективными являются радиофармпрепараты на основе малых пептидных молекул, модифицированных мочевиной, которые отли-

чаются наибольшим сродством к простатспецифическому мембранному антигену. На базе этих соединений получены новые РФП для ОФЭКТ (^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In), ПЭТ/КТ (^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu) – исследований и радионуклидной терапии с изотопами ^{131}I , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{90}Y . Отличительной особенностью этих соединений являются благоприятная фармакокинетика, высокое и длительное накопление в опухоли и метастазах, быстрое выведение из организма, что обеспечивает высокие значения коэффициента дифференциального накопления (отношение концентрации радиоизотопа в органе-мишени к концентрации радиоизотопа во всем теле) и качественную визуализацию мелких опухолевых очагов [14].

Большой интерес в качестве мишени представляет поверхностный рецептор Her-2/neu, который относится к семейству трансмембранных тирозинкиназных рецепторов (EGFR) и в норме экспрессируется на поверхности всех эпителиальных клеток организма. При трансформации злокачественных клеток происходит гиперэкспрессия рецептора Her-2, приводящая к неконтролируемой передаче сигнала, что приводит к нарушению процессов клеточного деления, апоптоза и пролиферации. Гиперэкспрессия Her-2/neu выявляется на поверхности опухолевых клеток при раке легкого, яичников, желудка, простаты и пр. Особое место среди ЗНО занимает рак молочной железы, амплификация гена при котором отмечается у 15–20% больных и ассоциируется с агрессивным течением заболевания, неблагоприятным прогнозом в отношении общей и безрецидивной выживаемости. Все это позволяет успешно использовать Her-2/neu в качестве мишени не только для диагностики, но также и для проведения таргетной (направленной) терапии у пациентов с гиперэкспрессией данного параметра. В последние годы активно разрабатываются РФП на основе антител для выявления специфических опухолевых мишеней с гиперэкспрессией Her2/neu. Однако вышеуказанные исследования проходят стадию доклинических испытаний, и на сегодняшний день отсутствуют коммерчески доступные радиофармпрепараты для этих целей.

Новый класс нацеливающих молекул неиммунноглобулиновой природы Design Ankyrin Repeat Protein (DARPin) активно используется для соединения с радиоактивными изотопами. Главными преимуществами таких белковых структур являются небольшой размер (14–20 кДа), стабильная структура, высокая специфичность и аффинность к антигену, а также значительно более низкая стоимость производства, обусловленная их экс-

прессией в бактериальных средах [15]. Важными в радиохимическом синтезе являются выбор хелатирующего агента для связывания $^{99\text{m}}\text{Tc}$, а также разработка методики химической модификации рекомбинантных адресных молекул с сохранением их способности связываться со специфическими рецепторами опухолевых клеток. Для получения РФП со стабильной химической структурой возможно использование эффективного хелатирующего агента сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноат (DPAH-NHS ester). В настоящее время в НИИ онкологии ТНИМЦ РАН ведутся доклинические исследования РФП « $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DPAH-DARPin9_29» [16].

РАДИОФАРМПРЕПАРАТЫ, СПОСОБНЫЕ НАКАПЛИВАТЬСЯ НА МЕМБРАНАХ КЛЕТОК НОВООБРАЗОВАНИЯ ПО МЕХАНИЗМУ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРАМИ КЛЕТКИ

Применение этой группы РФП для визуализации опухолей основано на их свойстве избирательно накапливаться на некоторых рецепторах мембран злокачественных новообразований. В настоящее время в мировой ядерной медицине из РФП этой группы наиболее часто применяются аналоги соматостатина (^{111}In -октреотид и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -депреотид).

Соматостатин – это тетрадекапептид, который секретируется в гипоталамусе и подавляет освобождение таких нейро-эндокринных гормонов, как глюкагон, гормон роста, гастрин и инсулин [6, 17].

Различают пять подтипов рецепторов соматостатина, которые широко представлены в интактных тканях. При воспалительных процессах и в некоторых злокачественных новообразованиях плотность этих рецепторов существенно увеличивается. Большинство нейроэндокринных опухолей, рак легких, перитуморальные вены некоторых новообразований человека характеризуются гиперэкспрессией рецепторов соматостатина, что является основой для их радионуклидной диагностики [6, 17]. Меченные аналоги соматостатина активно используются для визуализации нейроэндокринных новообразований (карциноид, меланома, параганглиома, феохромоцитомы), рака легких, лимфом и опухолей центральной нервной системы.

Так, применение ^{111}In -октреотида позволяет диагностировать нейроэндокринные опухоли с чувствительностью и специфичностью более 80%.

В то же время из-за высокого уровня физиологического захвата указанного РФП печенью и селезенкой для диагностики поражения этих органов ^{111}In -октреотид не используется. Меченный $^{99\text{m}}\text{Tc}$ депреотид нашел применение для визуализации злокачественных солитарных новообразований легких. Чувствительность ОФЭКТ/КТ в диагностике рака легкого достигает 97%, специфичность составляет 73% [6, 17]. Сегодня меченные ^{177}Lu или ^{90}Y аналоги соматостатина широко используются для радионуклидной терапии нейроэндокринных новообразований. Многоцентровые исследования доказали ее высокую эффективность и безопасность применения. В настоящее время в нашей стране зарегистрирован единственный препарат для диагностики нейроэндокринных опухолей – октреотид, меченный индием-111, что обуславливает необходимость выполнения исследований по разработке новых отечественных диагностических и терапевтических РФП [6]. Сегодня учеными НИ ТПУ и НИИ онкологии ТНИМЦ РАН ведутся научные исследования по разработке РФП « $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ДРАН-октреотид» на основе модифицированного хелатирующим агентом октреотида.

В последние годы все больший интерес онкологов направлен на использование пептидов, меченных ^{123}I . Эти РФП обладают способностью селективно аккумулироваться на мембране клеток опухоли. Так, ^{123}I -вазоактивные кишечные пептиды применяют для диагностики рака поджелудочной железы и новообразований желудочно-кишечного тракта. Несомненной перспективой для диагностики меланом обладает α -меланоцитостимулирующий гормон, меченный йодом-123. Кроме того, для визуализации гепатом нашел применение ^{123}I -инсулин, а для диагностики мелкоклеточного рака легкого – ^{123}I -нейропептиды.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАДИОФАРМПРЕПАРАТЫ, ПРОНИКАЮЩИЕ В КЛЕТКИ НОВООБРАЗОВАНИЯ

Радиофармпрепараты этой группы (^{123}I и ^{131}I , ^{123}I -метайод-бензил-гуанидин, ^{131}I -метайод-бензил-гуанидин и $^{99\text{m}}\text{Tc(V)}$ -ДМСА) включаются в специфический метаболизм клеток опухоли. Уже более 60 лет йод-131 широко используется для диагностики и лечения дифференцированного рака щитовидной железы и его метастазов. Дело в том, что фолликулярный и сосочковый рак щитовидной железы сохраняет способность захватывать йод для синтеза трийодтиронина и тироксина. В этой ситуации новообразование вы-

глядит как при узловом тиреотоксическом зобе в виде горячего очага, а метастатическое поражение визуализируется как области эктопического накопления йода в тех или иных органах [7, 18]. Физиологическое включение радиоактивного йода в слюнные железы, а также его экскреция в мочевой пузырь и пассаж по кишечнику могут стать источником диагностических ошибок и должны приниматься во внимание в процессе подготовки заключения по сцинтиграфическому исследованию. Учитывая тот факт, что атипичные клетки при низкодифференцированном раке щитовидной железы теряют способность к захвату йода, такие новообразования выглядят на сцинтиграммах как «дефекты накопления» РФП.

Следует отметить, что при выполнении сцинтиграфического исследования йод-123 обладает преимуществом перед йодом-131 – короткий период полураспада и, следовательно, меньшая экспозиционная доза облучения пациента, а также оптимальный для регистрации на γ -камере спектр излучения (159 кэВ).

Меченный радиоактивным йодом метайод-бензил-гуанидин (МИБГ) через норэпинефриновый механизм превращается в катехоламины нервных окончаний. Указанное соединение с высокой эффективностью применяется для радионуклидной диагностики и радионуклидной терапии нейроэндокринных новообразований (нейробластом, феохромоцитом, медуллярного рака щитовидной железы, карциноида и параганглиом). При этом для радионуклидной диагностики обычно используют ^{123}I -МИБГ, а для радиотерапевтических целей применяют МИБГ, меченный йодом-131 [19].

Еще одним РФП, относящимся к этой группе, является пентавалентный $^{99\text{m}}\text{Tc(V)}$ -ДМСА. Это соединение аккумулируется в клетках медуллярного рака щитовидной железы, позволяя с высокой специфичностью визуализировать это новообразование, однако механизм аккумуляции данного РФП в опухоли остается неизвестным [1].

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАДИОФАРМПРЕПАРАТЫ, ПРОНИКАЮЩИЕ В КЛЕТКИ НОВООБРАЗОВАНИЯ

В эту группу РФП относятся большинство радиоактивных туморотропных соединений, используемых для диагностики злокачественных опухолей (^{67}Ga -цитрат, ^{201}Tl , ^{199}Tl , ^{18}F -фтордезоксиглюкоза (^{18}F -ФДГ)).

Много десятилетий ^{67}Ga -цитрат успешно используется в онкологии как туморотропный

РФП. В механизме его аккумуляции в злокачественную клетку существенную роль играет комплекс, который ^{67}Ga образует с трансферрином крови после внутривенного введения. Далее ^{67}Ga -трансферрин аккумулируется на рецепторах клеток опухоли и путем инвагинации клеточной мембраны попадает в цитоплазму с последующим образованием стойкой связи с лактоферрином.

Цитрат галлия-67 нашел применение для скинтиграфической визуализации мелкоклеточного рака легких и лимфом. Имеются публикации о возможности применения указанного РФП для диагностики сарком мягких тканей и других новообразований [20]. Следует отметить, что ^{67}Ga -цитрат не применяется для диагностики опухолей брюшной полости из-за своей физиологической аккумуляции в печени и экскреции в желудочно-кишечный тракт. Поскольку ^{67}Ga -цитрат активно накапливается в зонах инфекции и воспаления, специфичность этого метода невысока. В практической онкологии этот РФП обычно используют для оценки влияния химио- или лучевой терапии на верифицированное злокачественное новообразование.

Радионуклиды таллия (^{201}Tl и ^{199}Tl) являются биологическим аналогом калия и проникают через клеточную мембрану с помощью натрий-калиевой АТФ-азы. При этом ^{199}Tl выгодно отличается от широко используемого за рубежом аналога ^{201}Tl более коротким периодом полураспада (7,4 и 72 ч соответственно), и, следовательно, более низкой экспозиционной дозой облучения на обследуемого [21]. Таллий-199 много лет успешно используется для диагностики коронарной недостаточности [22, 23] и оценки результатов лечения ишемической болезни сердца [24]. В последние годы доказана высокая эффективность его применения для визуализации рака молочной железы [25] и злокачественных новообразований гортани и гортаноглотки [26].

Успешное применение меченого технецием $^{99\text{m}}$ метокси-изобутил-изонитрила ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -МИБИ) доказало эффективность и целесообразность использования этого РФП в онкологической практике. Например, проведенные исследования продемонстрировали положительный вклад применения онкотропных РФП в оценке результатов лечения больных раком гортани и гортаноглотки [27]. Также большое количество работ доказало необходимость использования маммоскintiграфии как в первичной диагностике, так и на этапах комбинированного лечения у больных раком молочной железы [4, 28].

Неспецифический позитронизлучающий РФП ^{18}F -ФДГ является наиболее популярным для позитронной эмиссионной компьютерной томографии, поскольку дает возможность с высокой чувствительностью диагностировать злокачественные новообразования различных локализаций. Механизм поступления ^{18}F -ФДГ связан белковым переносчиком глюкозы и гексокиназой II – фермента, который реализует замещение гидроксильной группы глюкозы на фосфатный комплекс аденозинтрифосфата. В свою очередь, фосфорилированный метаболит ^{18}F -ФДГ теряет способность к транспорту через мембрану клетки и остается интрацеллюлярно. Поскольку в малигнизированных клетках активность гексокиназы II существенно выше, чем в нормальных, при использовании ^{18}F -ФДГ достигается высокое соотношение «опухоль – фон».

Учитывая широкую доступность скинтиграфического оборудования в нашей стране (более 200 радиодиагностических подразделений, оснащенных γ -камерами), весьма перспективной для практической онкологии является разработка туморотропных РФП на основе $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Одним из таких РФП является « $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-тио-D-глюкоза» для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний, разработка которого сегодня проводится в НИИ онкологии ТНИМЦ РАН совместно с НИ ТПУ.

Главным преимуществом указанного РФП является возможность визуализации опухоли с использованием обычной γ -камеры, что значительно снижает стоимость диагностики. Радиофармпрепарат представляет собой комплекс производного глюкозы в виде 1-тио-D-глюкоза и $^{99\text{m}}\text{Tc}$, в котором 1-тио-D-глюкоза выполняет функцию транспорта радиоизотопной метки ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Особенностью фармакокинетики указанного РФП является отсутствие его активной аккумуляции в головном мозге и миокарде. На сегодняшний день разработан лабораторный регламент получения РФП, проведен комплекс исследований по разработке методик анализа его качества и валидации, осуществлены синтез и анализ образцов в соответствии с разработанной методикой. Проведен скрининг качества образцов радиофармпрепарата по характеру его распределения в организме лабораторных животных. Доказано, что « $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-тио-D-глюкоза» характеризуется высокой онкотропностью, тем самым позволяет отчетливо визуализировать злокачественную опухоль с высоким индексом накопления РФП у экспериментальных животных [29]. Начатые клинические исследования РФП « $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -1-тио-D-глюкоза» показали перспективность его

применения при раке молочной железы, лимфомах, опухолях головного мозга.

ЛИМФОТРОПНЫЕ РАДИОФАРМПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СТОРОЖЕВЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

В современной онкологической практике все больший интерес вызывает выявление сторожевых лимфатических узлов (СЛУ) – первых узлов, стоящих на пути метастазирования злокачественных новообразований. Указанные узлы, фильтруя лимфу, оттекающую от опухоли, захватывают злокачественные клетки. Считается, что биопсия СЛУ и их морфологическое (гистологическое или цитологическое) исследование позволяют с высокой степенью достоверности определить наличие лимфогенного метастазирования. Если в СЛУ не выявляются метастазы, то и остальные лимфатические узлы интактны, и наоборот, если наблюдается метастатическое поражение СЛУ, то высока вероятность распространения метастазов в другие лимфатические узлы [30]. За рубежом имеется ряд РФП для детекции СЛУ, основным недостатком которых являются низкий (1,5–2% от введенной дозы) уровень накопления в СЛУ и аккумуляция в лимфатических узлах второго и третьего порядков. В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные препараты для визуализации СЛУ, поэтому в НИИ онкологии ТНИМЦ РАН и НИ ТПУ был разработан инновационный РФП на основе γ -оксида алюминия – « ^{99m}Tc -Алотех», а также проведены его доклинические исследования [31–33]. Доклинические испытания « ^{99m}Tc -Алотех» продемонстрировали его эффективность, безопасность и оптимальность фармакокинетических параметров для интраоперационного выявления СЛУ. Через 24 ч после введения в лимфатическом узле аккумулируется около 12% от введенной дозы РФП, что позволяет достоверно производить детекцию СЛУ [31–33]. В настоящее время в НИИ онкологии ТНИМЦ РАН начаты исследования по клиническому использованию « ^{99m}Tc -Алотех» при раке шейки матки и злокачественных новообразованиях молочных желез [34–36].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Чернов В.И. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи

и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Медведева А.А. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Синилкин И.Г. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Зельчан Р.В. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Брагина О.Д. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Чойнзонов Е.А. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

Соглашение о предоставлении субсидии от 23.10.2017 г. № 14.601.21.0015 между Министерством образования и науки Российской Федерации и Томским НИМЦ на выполнение научно-исследовательской работы по теме: «Разработка прогноза реализации приоритета научно-технологического развития, определенного пунктом 20в “Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)” Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации». Уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEF160117X0015. Идентификатор государственного соглашения 0000000007417PE10002.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Национальное руководство по радионуклидной диагностике; под ред. Ю.Б. Лишманова, В.И. Чернова: В 2 томах. Т. 1. Томск: STT Publ., 2010: 290. [National guide of radionuclide diagnostics; edit. by Yu.B. Lishmanov, V.I. Chernov. In 2 v. V. 1. Tomsk: STT Publ., 2010: 290 (in Russ.)].
2. Национальное руководство по радионуклидной диагностике; под ред. Ю.Б. Лишманова, В.И. Чернова. В 2 томах. Т. 2. Томск: STT Publ., 2010: 418. [National guide of radionuclide diagnostics; edit. by Yu.B. Lishmanov, V.I. Chernov. In 2 v. V. 2. Tomsk: STT Publ., 2010: 418 (in Russ.)].
3. Завадовская В.Д., Куражов А.П., Килина О.Ю., Чойнзонов Е.А., Чернов В.И., Слонимская Е.М., Богутдинова А.В., Анисеня И.И., Родионова О.В. Сцинтиграфия с ^{199}Tl -хлоридом в дифференциальной диагностике воспалительных и опухолевых процес-

- сов опорно-двигательного аппарата. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2009; 54 (3): 68–76. [Zavadovskaya V.D., Kurazhov A.P., Kilina O.Yu., Choyznzonov E.L., Chernov V.I., Slonimskaya E.M., Bogoutdinova A.V., Anisenya I.I., Rodionova O.V. 199Tl-chloride scintigraphy in differential diagnostics inflammatory and neoplastic processes of locomotor system. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost – Medical Radiology and Radiation Safety*. 2009; 54 (3): 68–76 (in Russ.)].
4. Тицкая А.А., Чернов В.И., Слонимская Е.М., Синилкин И.Г. Сравнение результатов маммосцинтиграфии с ^{99m}Tc-технетрилом в планарном и томографическом режимах. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2008; 53 (5): 51–60. [Titskaya A.A., Chernov V.I., Slonimskaya E.M., Sinilkin I.G. Comparison of ^{99m}Tc-MIBI mammoscintigraphy findings in planar and tomographic images. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost – Medical Radiology and Radiation Safety*. 2008; 53 (5): 51–60 (in Russ.)].
 5. Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радионуклидная тераностика злокачественных образований. *Вестник рентгенологии и радиологии*. 2016; 97 (5): 306–313. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Zel'chan R.V. Radionuclide teranostic of malignancies. *Vestnik rentgenologii i radiologii – Vestnik Rentgenologii i Radiologii*. 2016; 97 (5): 306–313 (in Russ.)].
 6. Чернов В.И., Брагина О.Д., Зельчан Р.В., Медведева А.А., Синилкин И.Г., Ларькина М.С., Стасюк Е.С., Нестеров Е.А., Скуридин В.С. Меченые аналоги соматостатина в тераностике нейроэндокринных опухолей. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2017; 62 (3): 42–49. [Chernov V.I., Bragina O.D., Zel'chan R.V., Medvedeva A.A., Sinilkin I.G., Lar'kina M.S., Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Skuridin V.S. Labeled Somatostatin Analogues in Theranostics of Neuroendocrine Tumors. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost – Medical Radiology and Radiation Safety*. 2017; 62 (3): 42–49 (in Russ.)].
 7. Рак щитовидной железы. Современные подходы к диагностике и лечению; под ред. П.О. Румянцева, А.А. Ильина, У.В. Румянцева, В.А. Саенко. М.: 2009: 448. [Thyroid cancer. Modern approaches to diagnosis and treatment; ed. by P.O. Romyantsev, A.A. Il'in, U.V. Romyantseva, V.A. Saenko. M.: 2009: 448 (in Russ.)].
 8. Рыжков А.Д., Ширяев С.В., Оджарова А.А., Аплевич Н.Н., Крылов А.С., Гончаров М.О. Остеосцинтиграфия метастазов в кости с фосфатными соединениями, меченными ^{99m}Tc. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2007; 52 (4): 62–68. [Ryzhkov A.D., Shiryayev S.V., Odzharova A.A., Aplevich N.N., Krylov A.S., Goncharov M.O. ^{99m}Tc-labelled phosphonate metastases bone scintigraphy. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost – Medical Radiology and Radiation Safety*. 2007; 52 (4): 62–68 (in Russ.)].
 9. Цыб А.Ф., Крылов В.В., Дроздовский Б.Я., Карякин О.Б., Бирюков В.А., Медведев В.Н., Смирнова И.А., Воробьева С.Л. Радионуклидная терапия самарием-оксабифором, ¹⁵³Sm при раке молочной и предстательной железы с метастазами в кости. *Сибирский онкологический журнал*. 2006; 3: 8–17. [Tsyb A.F., Krylov V.V., Drozdovskiy B.Ya., Karyakin O.B., Biryukov V.A., Medvedev V.N., Smirnova I.A., Vorob'eva S.L. Radionuclide therapy with samarium-oxabiphore, ¹⁵³Sm for breast and prostate cancer with bone metastases. *Sibirskii onkologicheskii journal – Siberian Journal of Oncology*. 2006; 3: 8–17 (in Russ.)].
 10. Кочетова Т.Ю., Крылов В.В., Смолярчук М.Я., Волознев Л.В., Лунев А.С. 188Re-золедроновая кислота – новый отечественный терапевтический радиофармацевтический препарат: первый клинический опыт. *Поволжский онкологический вестник*. 2014; 3: 41–47. [Kochetova T.Yu., Krylov V.V., Smolyarchuk M.Ya., Voloznev L.V., Lunev A.S. 188Re-zoledronic acid – a new domestic therapeutic radiopharmaceutical: the first clinical experience. *Povoljskii onkologicheskii vestnik – Oncology Bulletin of the Volga Region*. 2014; 3: 41–47 (in Russ.)].
 11. Рыжков А.Д., Габуня Р.И., Ширяев С.В. Лечение болевого синдрома с помощью хлорида стронция-89 у больных раком предстательной железы с метастазами в кости. *Онкоурология*. 2006; 1: 44–47. [Ryzhkov A.D., Gabuniya R.I., Shiryayev S.V. Treatment of pain syndrome with strontium-89 chloride in patients with prostate cancer with bone metastases. *Oncourologiya – Cancer Urology*. 2006; 1: 44–47 (in Russ.)].
 12. Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радиомунотерапия: современное состояние проблемы. *Вопросы онкологии*. 2016; 62 (1): 24–30. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Zel'chan R.V. Radioimmunotherapy: current state of the problem. *Voprosi onkologii – Oncological Questions*. 2016; 62 (1): 24–30 (in Russ.)].
 13. Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радиомунотерапия в лечении злокачественных образований. *Сибирский онкологический журнал*. 2016; 15 (2): 101–106. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Zel'chan R.V. Radioimmunotherapy in the treatment of malignancies. *Sibirskii onkologicheskii journal – Siberian Journal of Oncology*. 2016; 15 (2): 101–106 (in Russ.)].
 14. Власова О.П., Герман К.Э., Крылов В.В., Петриев В.М., Эпштейн Н.Б. Новые радиофармпрепараты для диагностики и лечения метастатического рака предстательной железы на основе ингибиторов простатспецифического мембранного антигена. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015; 70 (3): 360–365. [Vlasova O.P., German K.E., Krylov V.V., Petriev V.M., Epshteyn N.B. New radiopharmaceuticals for diagnosis and treatment of metastatic prostate cancer based on inhibitors of prostate-specific membrane

- antigen. *Vestnik Rossiiskoi akademii nauk – Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (3): 360–365 (in Russ.).
15. Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксического белка DARPIN-MINISOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека. *Acta Nature*. 2015; 7 (3): 141–148. [Shilova O.N., Proshkina G.M., Lebedenko E.N., Deev S.M. Internalization and recycling of the HER2 receptor by interaction of the targeted phototoxic protein DARPIN-MINISOG with human adenocarcinoma cells. *Acta Nature*. 2015; 7 (3): 141–148 (in Russ.).]
16. Брагина О.Д., Ларкина М.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Юсубов М.С., Скуридин В.С., Деев С.М., Зельчан Р.В., Булдаков М.А., Подрезова Е.В., Белоусов М.В. Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченых ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (3): 25–33. [Bragina O.D., Larkina M.S., Stasyuk E.S., Chernov V.I., Yusubov M.S., Skuridin V.S., Deyev S.M., Zelchan R.V., Buldakov M.A., Podrezova E.V., Belousov M.V. Development of highly specific radiochemical compounds based on ^{99m}Tc -labeled recombinant molecules for targeted imaging of cells overexpressing Her-2/neu. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (3): 25–33 (in Russ.).]
17. Ширяев С.В. Возможности ядерной медицины в диагностике и терапии нейроэндокринных опухолей. *Эффективная фармакотерапия*. 2010; 22: 50–52. [Shiryaev S.V. The possibilities of nuclear medicine in the diagnosis and therapy of neuroendocrine tumors. *Effektivnaya farmakoterapiya – Effective Pharmacotherapy*. 2010; 22: 50–52 (in Russ.).]
18. Родичев А., Гарбузов П., Дроздовский Б., Крылов В., Гусева Т., Давыдов Г., Паршин В., Ильин А., Чеботарева И. Двадцатилетний опыт радиоiodотерапии отдаленных метастазов дифференцированного рака щитовидной железы у детей и подростков. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2009; 20 (2): 19–20. [Rodichev A., Garbuzov P., Drozdovskiy B., Krylov V., Guseva T., Davydov G., Parshin V., Il'in A., Chebotareva I.. Twenty-year experience of radioiodine therapy of distant metastases of differentiated thyroid cancer in children and adolescents. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina – Herald of the RCRC. NN Blokhin RAMS*. 2009; 20 (2): 19–20 (in Russ.).]
19. Giammarile F., Chiti A., Lassmann M., Brans B., Flux G. EANM procedure guidelines for ^{131}I -meta-iodobenzylguanidine (^{131}I -mIBG) therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2008; 35: 1039–1047.
20. Крылов А.С., Ширяев С.В., Оджарова А.А., Гончаров М.О. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc -технетрилом и ^{67}Ga -цитратом при оценке эффективности лечения сарком мягких тканей у детей. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2011; 56 (3): 46–53. [Krylov A.S., Shiryaev S.V., Odzharova A.A., Goncharov M.O. Scintigraphy with ^{99m}Tc -technetrit and ^{67}Ga -citrate in evaluating the effectiveness of treatment of soft tissue sarcomas in children. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost – Medical Radiology and Radiation Safety*. 2011; 56 (3): 46–53 (in Russ.).]
21. Лишманов Ю.Б., Чернов В.И., Кривоногов Н.Г., Глухов Г.Г., Маслова Л.В. Перфузионная сцинтиграфия миокарда с ^{199}Tl -хлоридом в эксперименте. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 1988; 33 (3): 13–16. [Lishmanov Yu.B., Chernov V.I., Krivonogov N.G., Glukhov G.G., Maslova L.V. Perfusion myocardial scintigraphy with ^{199}Tl -chloride in the experiment. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost – Medical Radiology and Radiation Safety*. 1988; 33 (3): 13–16 (in Russ.).]
22. Лишманов Ю.Б., Чернов В.И., Кривоногов Н.Г., Ефимова И.Ю., Веснина Ж.В., Завадовский К.В., Минин С.М., Сазонова С.И., Скуридин В.С., Панькова А.Н., Саушкин В.В., Ильющенкова Ю.Н., Ефимова Н.Ю. Радионуклидные методы исследования в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний. *Сибирский медицинский журнал*. 2010; 25 (4-1): 8–13. [Lishmanov Yu.B., Chernov V.I., Krivonogov N.G., Efimova I.Yu., Vesnina Zh.V., Zavadovskiy K.V., Minin S.M., Sazonova S.I., Skuridin V.S., Pan'kova A.N., Saushkin V.V., Il'yushenkova Yu.N., Efimova N. Yu.. Radionuclide research methods in the diagnosis of cardiovascular diseases. *Sibirskii medicinskii journal – The Siberian Medical Journal*. 2010; 25 (4-1): 8–13 (in Russ.).]
23. Карпов Р.С., Павлюкова Е.Н., Врублевский А.В., Чернов В.И., Усов В.Ю. Современные методы диагностики коронарного атеросклероза. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2006; 26 (2): 105–117. [Karpov R.S., Pavlyukova E.N., Vrublevskiy A.V., Chernov V.I., Usov V.Yu. Modern methods of diagnosing coronary atherosclerosis. *Sibirskii nauchnii medicinskii journal – Siberian Scientific Medical Journal*. 2006; 26 (2): 105–117 (in Russ.).]
24. Чернов В.И., Гарганеева А.А., Веснина Ж.В., Лишманов Ю.Б. Перфузионная сцинтиграфия миокарда в оценке результатов курсового лечения триметазином больных ишемической болезнью сердца. *Кардиология*. 2001; 41 (8): 14–16. [Chernov V.I., Garganeeva A.A., Vesnina Zh.V., Lishmanov Yu.B. Perfusion scintigraphy of myocardium in the evaluation of the results of course treatment with trimetazidine in patients with coronary heart disease. *Kardiologiya – Cardiology*. 2001; 41 (8): 14–16 (in Russ.).]
25. Тицкая А.А., Чернов В.И., Слонимская Е.М., Синилкин И.Г. Маммосцинтиграфия с ^{199}Tl в диагностике рака молочной железы. *Сибирский онкологический журнал*. 2008; 6: 5–10. [Titskaya A.A., Chernov V.I., Slonimskaya E.M., Sinilkin I.G. Mammoscintigraphy with ^{199}Tl in the diagnosis of breast cancer. *Sibirskii onkolog-*

Поступила в редакцию 20.10.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Чернов Владимир Иванович, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе и инновационной деятельности ТНИМЦ РАН; зав. отделением радионуклидной диагностики, НИИ онкологии ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Медведева Анна Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Синилкин Иван Геннадьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Зельчан Роман Владимирович, канд. мед. наук, врач-радиолог, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Брагина Ольга Дмитриевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Чойнзон Евгений Ахамацыренович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ онкологии ТНИМЦ РАН, г. Томск.

(✉) Брагина Ольга Дмитриевна, e-mail: rungis@mail.ru.

УДК 616-006.6-07-08:539.1.06

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-220-231

For citation: Chernov V.I., Medvedev A.A., Sinilkin I.G., Zelchan R.V., Bragina O.D., Choynzonov E.L. Nuclear medicine as a tool for diagnosis and targeted cancer therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 220–231.

Nuclear medicine as a tool for diagnosis and targeted cancer therapy

Chernov V.I.^{1,2}, Medvedev A.A.¹, Sinilkin I.G.¹, Zelchan R.V.¹, Bragina O.D.¹, Choynzonov E.L.^{1, 2}

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

² National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU) 30, Lenina Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

The main trends and prospects of development of nuclear medicine, problems and possible ways of their solution are considered in the article. The main scientific directions in the development of radiopharmaceuticals for the diagnosis and radionuclide therapy of malignant tumors (radiopharmaceuticals that can accumulate in tissues surrounding the tumor; radiopharmaceuticals that can accumulate on the membranes of tumor cells, radiopharmaceuticals that can accumulate in tumor cells, radiopharmaceuticals for sentinel lymph nodes detection). It is shown that the current trends in the development of nuclear medicine are closely related to theranostics (therapy + diagnostics) using radiopharmaceuticals obtained on the basis of a target compound labeled with different isotopes intended for diagnosis or therapy. In nuclear medicine, such tandems are used to individualize and plan of radionuclide therapy. The results of our own research on the development of radiopharmaceuticals for tumor imaging and detection of sentinel lymph nodes are presented. The functional utility of radiopharmaceuticals and the prospects of their clinical use are shown.

Key words: nuclear medicine, malignant neoplasms, radiopharmaceuticals, sentinel lymph nodes, theranostics.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

Federal target program “Research and development in priority areas of development of Russia’s scientific and technological complex for 2014–2020” Agreement on

granting a subsidy as of October 23, 2017 No.14.601.21.0015 between the Ministry of Education and Science of the Russian Federation and Tomsk NRC on conducting research project titled: Development of a forecast for the implementation of the priority of scientific and technological development defined in paragraph 20c "personalized medicine, high-

tech health care and health saving technologies, including the rational use of medicines (primarily antibacterial)" Scientific and technological development strategy of the Russian Federation. The unique identifier of the project is RFMEF160117X0015. The state agreement identifier is 0000000007417PE10002.

Received 20.10.2017

Accepted 06.02.2018

Chernov Vladimir I., DM, Professor, Head of the Nuclear Medicine Department, Deputy Director for Scientific Work and Innovative Activities of TNRMC RAS, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Medvedeva Anna A. PhD, Senior Researcher, Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Sinilkin Ivan G., Senior Researcher, Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Zelchan Roman V., PhD, Radiologist, Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Bragina Olga D., PhD, Senior Researcher, Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Choynzonov Evgeny L., DM, Professor, Academician of the RAS, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Bragina Olga D.**, e-mail: rungis@mail.ru.

УДК 618.19-006.5-07

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-232–238

Для цитирования: Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Тарабановская Н.А., Таширева Л.А., Дерюшева И.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. Клиническое наблюдение ВПЧ-положительной опухоли молочной железы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 232–238.

Клиническое наблюдение ВПЧ-положительной опухоли молочной железы

Ибрагимова М.К.^{1,2}, Цыганов М.М.¹, Тарабановская Н.А.¹, Таширева Л.А.¹,
Дерюшева И.В.¹, Перельмутер В.М.¹, Слонимская Е.М.^{1,3}, Литвяков Н.В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

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

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе рассматривается уникальный случай ВПЧ-положительной (тип 16) опухоли молочной железы. Наличие ВПЧ-инфекции в опухоли подтверждено двумя независимыми методами – полимеразной цепной реакции и иммуногистохимии. Показано, что при наличии неблагоприятных факторов прогноза, таких как лимфогенное метастазирование, высокий уровень экспрессии Ki67, хромотрипсис в опухоли и высокий уровень генетической нестабильности у пациентки с ВПЧ-положительной опухолью молочной железы, возможна более чем 8-летняя безрецидивная выживаемость, что согласуется с данными по благоприятному исходу ВПЧ-положительного рака шейки матки и гортани по сравнению с ВПЧ-негативными случаями.

Ключевые слова: рак молочной железы, вирус папилломы человека, микроматричный анализ, прогноз.

ВЕДЕНИЕ

Еще в 1990 г. было опубликовано примечательное сообщение, в котором описаны результаты исследований о взаимодействии вируса папилломы человека (ВПЧ) с эпителиальными клетками молочной железы человека. Авторами отмечено, что ВПЧ не просто обнаружен в клетках молочных желез, но при этом именно данным вирусом вызвано снижение потребности клеток в ростовых факторах [1]. В подтверждение этого исследования были опубликованы

данные по изучению гистологических срезов карциномы молочной железы и подмышечных лимфатических узлов на наличие вирусов папилломы человека, показано, что распространенность ВПЧ типа 16 в тканях молочной железы составляет 29,4% [2].

Максимальное количество исследований данного вопроса приходится на 1990-е и 2000-е гг. По данной тематике опубликовано немало противоположных данных, которые указывают на наличие или полное отсутствие связи между ВПЧ-инфицированием и возникновением и (или) развитием рака молочной железы (РМЖ) у женщин (таблица).

✉ Ибрагимова Марина Константиновна, e-mail: Imk1805@yandex.ru.

Т а б л и ц а

Частота наличия вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска в опухолях молочной железы, доброкачественных новообразованиях и контрольной группе здоровых женщин в исследованиях «случай – контроль»				
Исследование	Страна	Количество случаев (%)		Наиболее распространенные типы ВПЧ
		ВПЧ + РМЖ/РМЖ	ВПЧ в контрольной группе	
[3]	Япония/Китай	18/52 (35)	0/15 (0)	18, 33
[4]	Бразилия	25/101 (25)	0/41 (0)	16, 18
[5]	Тайвань	8/62 (13)	2/42 (5)	–
[6]	Корея	8/123 (7)	0/31 (0)	16, 18, 58
[7]	Турция	37/50 (74)	9/16 (56)	18, 33
[8]	Китай	24/40 (60)	1/20 (5)	16
[9]	Мексика	15/41 (37)	0/43 (0)	16, 18
[10]	Австралия	8/26 (31)	3/28 (11)	16, 18
[11]	Мексика	6/60 (10)	7/60 (12)	16
[12]	Китай	4/62 (6)	0/46 (0)	16, 18
[13]	Китай	0/48 (0)	3/30 (10)	6, 11
[14]	Иран	15/43 (35)	1/40 (3)	16, 18
[15]	Италия	9/31 (29)	0/12 (0)	16, 18
[16]	Австралия	25/50 (50)	8/40 (20)	16, 18
[17]	Китай	48/224 (21)	6/37 (16)	16, 18, 33, 58
[18]	Иран	22/65 (34)	0/65 (0)	16
[19]	Ирак	60/129 (47)	3/41 (7)	16, 18, 33
[20]	Иран	0/100 (0)	0/50 (0)	–
[21]	Иран	10/55 (18)	7/51 (14)	16
[22]	Китай	2/100 (2)	0/50 (0)	18
[23]	Китай	25/169 (15)	1/83 (1)	58
[24]	Китай	3/187 (2)	0/92 (0)	6, 16, 18
[25]	Китай	0/77 (0)	0/77 (0)	–
[26]	Испания	0/76 (0)	0/2 (0)	–

Несмотря на противоречивость опубликованных данных, в целом более 80% результатов тестирования опухоли данной локализации на наличие ВПЧ за последние 25 лет свидетельствуют об ассоциации с риском развития РМЖ, что остается до сих пор спорным моментом, который многие списывают на лабораторные ошибки [11, 27–35]. Учитывая, что частота вирус-позитивных опухолей молочной железы очень низка по сравнению с раком шейки матки и раком гортани, наличие вируса папилломы человека в опухоли молочной железы является актуальным наблюдением. Поскольку идентификация ВПЧ в опухоли молочной железы остается сложной в методическом плане, каждый случай ВПЧ-позитивного РМЖ требует тщательного исследования и подтверждения наличия вируса как минимум двумя независимыми методами.

Проведено исследование, направленное на определение наличия ВПЧ высокого онкогенного риска у 30 больных раком молочной железы, которые находились на лечении в отделении общей

онкологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН. Определение проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием комплектов реагентов фирмы Amplisens® (г. Москва, Россия). ВПЧ-позитивной (тип 16) оказалась одна пациентка (частота 3,3%). Помимо определения генотипа ВПЧ было проведено и определение физического статуса вируса. В результате данного анализа показано, что в опухоли присутствует ВПЧ 16 типа со смешанным физическим статусом (одновременно присутствуют эписомальные и интегрированные формы вируса).

Клинический пример. Пациентка К., 44 года, поступила в отделение общей онкологии НИИ онкологии ТНИМЦ РАН 2 апреля 2008 г. Из анамнеза: в марте 2008 г. самостоятельно обнаружила объемное уплотнение в левой молочной железе. При осмотре: молочные железы симметричные, на границе наружных квадрантов левой молочной железы определяется объемное образование диаметром до 1,5 см, плотной консистенции с относительно четкими контурами, смещае-

мое, безболезненное, регионарные лимфоузлы не увеличены. Выполнена трепанбиопсия опухоли, верифицирован инвазивный протоковый рак неспецифического типа II степени злокачественности. При иммуногистохимическом исследовании (ИГХИ) установлен люминальный В подтип РМЖ: экспрессия ER+(74%), PR+(67%), HER-2-статус отрицательный, высокий уровень экспрессии белка Ki67 (35%).

В предоперационном периоде проведено три курса неoadъювантной химиотерапии (НХТ) по схеме FАС (адриамицин 85 мг, циклофосфан 850 мг, 5-фторурацил 850 мг, эмесет 16 мг внутривенно). По данным ультразвукового исследования и маммографии, эффект НХТ составил 98% (частичная регрессия). Принято решение о проведении органосохраняющей операции. 18 июня 2008 г. выполнены секторальная резекция, интраоперационная лучевая терапия (ИОЛТ) 10 Гр и аксиллярная лимфаденэктомия. Гистологическое заключение по операционному материалу: инвазивный протоковый рак неспецифического типа II степени злокачественности с инфильтративным компонентом (1,5 см) на фоне фиброзно-кистозной болезни, с участками мазоплазии, метастазами в двух аксиллярных лимфоузлах из 10. По результатам морфологического исследования окончательная стадия заболевания оценена как T1N1M0, IIA.

Послеоперационный период протекал удовлетворительно. 4 августа 2008 г. проведен один курс НХТ по схеме FАС. С 22 сентября 2008 г. проведены курс дистанционной лучевой терапии (ДЛТ) на оставшуюся часть молочной железы и

зоны регионарного лимфооттока СОД 59 и 40 Гр соответственно. В дальнейшем пациентка получила гормонотерапию тамоксифеном в течение 5 лет. Общий срок наблюдения за больной составил 99 мес (8 лет и 3 мес). При контрольном обследовании 12 ноября 2016 г. данных о наличии рецидива заболевания или гематогенных метастазов не выявлено.

Опухолевый материал пациентки до лечения подвергался иммуногистохимическому и молекулярно-генетическому исследованиям, операционный материал опухоли и прилежащей ткани подвергался ИГХИ. Иммуногистохимическое окрашивание ткани на ВПЧ проводилось по стандартной методике с применением моноклональных антител к Е6-позднему белку ВПЧ (клон К1Н8, рабочее разведение 1 : 20, DCS Immunoline, Германия). Установлена экспрессия белка Е6 в операционном материале прилежащей и опухолевой тканей больной К., что свидетельствует о наличии ВПЧ в клетках этих тканей (рис. 1).

Таким образом, наличие ВПЧ было подтверждено двумя независимыми методами – ПЦР в режиме реального времени и иммуногистохимическим методом. Методом иммуногистохимии также показано наличие ВПЧ в прилежащей неопухолевой ткани пациентки (рис. 1).

Далее для данной пациентки проведен микроматричный анализ ДНК опухоли на платформе высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США), который позволяет с чувствительностью 5% увидеть Copy Number Aberration (CNA) – генетический ландшафт опухоли

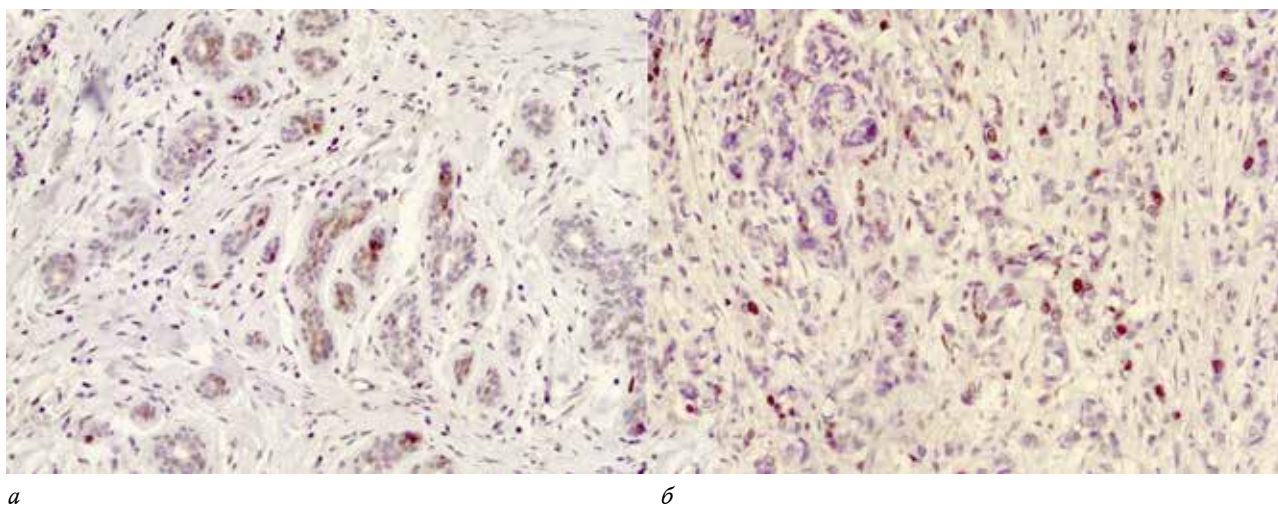


Рис. 1. Экспрессия позднего вирусного белка Е6 ВПЧ в прилежащей неопухолевой (а) и опухолевой ткани (б) молочной железы. ×200

Fig. 1. Expression of the E6 late HPV viral protein in the adjacent non-neoplastic (a) and neoplastic tissue (b) of the breast. ×200

(рис. 2). Отмечается высокая частота несбалансированных хромосомных аномалий (делеций и амплификаций), при этом частота делеций в 3,6 раза выше, чем частота дупликаций. CNA затрагивают 61% генома, что говорит о высокой степени генетической нестабильности, свидетельствующей о высокой скорости клональной эволюции, которая является неблагоприятным прогностическим фактором [36]. Кроме этого, для некоторых хромосом было показано явление хромотрипсиса (хромосомы 4, 11, 12, 17, 20 и X). Данный термин введен в 2011 г. группой ученых во главе с Филиппом Стефенсом (Philip Stephens)

[37]. С использованием метода секвенирования следующего поколения авторы охарактеризовали явление (хромотрипсис от лат. *chroma* – цвет; *thripsis* – раздробить на куски), в результате которого десятки и сотни геномных перестроек происходят в одномоментном клеточном кризисе. Для картины хромотрипсиса характерны множественные (чередующиеся) делеции и дупликации в одной хромосоме. По данным некоторых авторов, явление хромотрипсиса ассоциировано с плохим прогнозом при нейроblastоме, остром миелолейкозе, меланоме и множественной миеломе [38, 39].

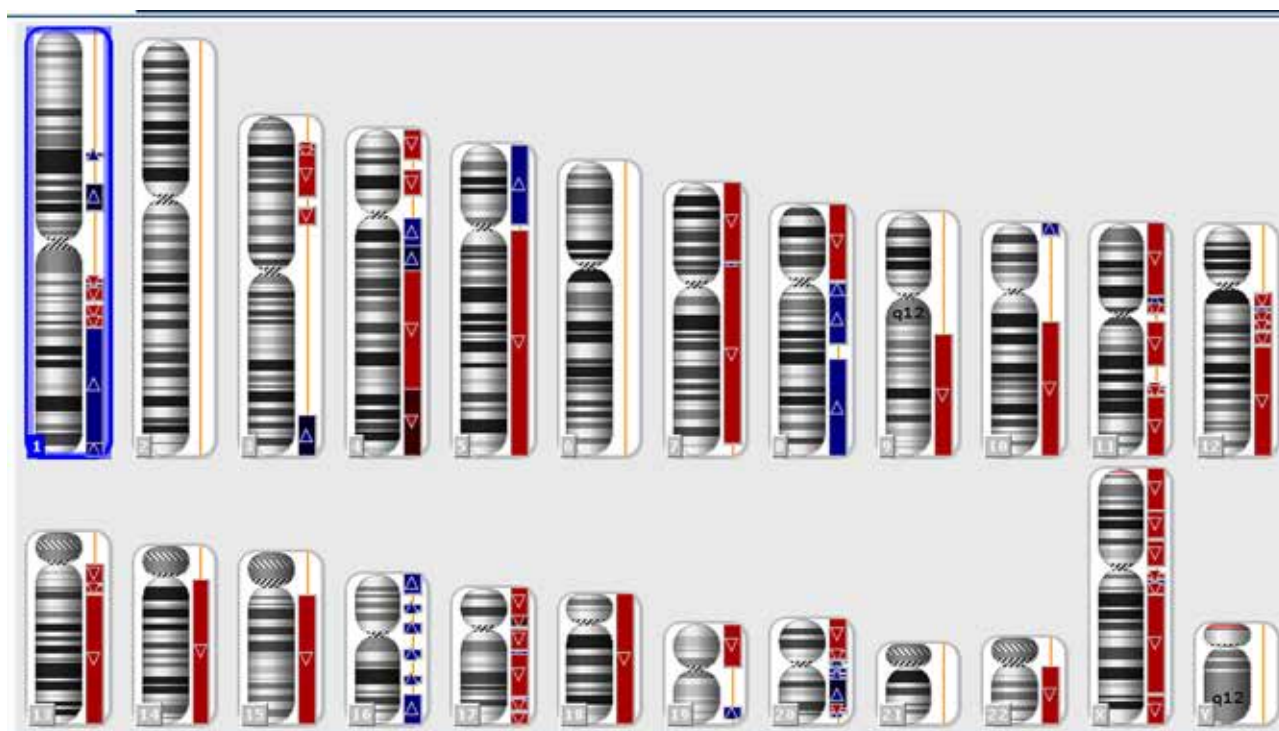


Рис. 2. CNA-генетический ландшафт опухоли молочной железы больной К. до лечения: моносомия хромосом 7, 13, 14, 15, 18 и 22, сегментальные делеции (1q, 3p, 4q, 4p, 5q, 8p, 9q, 10q, 11q, 11p, 12q, 17p, 17q, 19p, 20p, 21p, Xp, Xq), сегментальные амплификации (1q, 1p, 3q, 4q, 5p, 8q, 10p, 16p, 16q, 18q, 20q), хромотрипсис в хромосомах 4, 11, 12, 17, 20 и X

Fig. 2. CNA-genetic landscape of a breast tumor in patient K before treatment: monosomy in chromosomes 7, 13, 14, 15, 18, and 22, segmental deletions (1q, 3p, 4q, 4p, 5q, 8p, 9q, 10q, 11q, 11p, 12q, 17p, 17q, 19p, 20p, 21p, Xp, Xq), segmental amplifications (1q, 1p, 3q, 4q, 5p, 8q, 10p, 16p, 16q, 18q, 20q), chromotripsis in chromosomes 4, 11, 12, 17, 20 and X

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у данной пациентки имеется несколько неблагоприятных факторов прогноза, таких как лимфогенное метастазирование, высокий уровень экспрессии Ki67, наличие хромотрипсиса в опухоли, высокий уровень генетической нестабильности. Тем не менее пациентка положительно отреагировала на предопераци-

онную химиотерапию (98% уменьшение объема опухоли), и более 8 лет у нее наблюдается безрецидивная выживаемость. Стоит отметить, что существует ряд работ, в которых высказано предположение о том, что онкогенные свойства ВПЧ для рака молочной железы очень похожи на канцерогенез ВПЧ-ассоциированной опухоли других локализаций (шейка матки и гортань) [10, 11]. Было показано, что ВПЧ-позитивные

больные раком шейки матки и раком гортани имеют лучший прогноз и чувствительность к химиотерапии по сравнению с ВПЧ-негативными больными [40, 41]. Кроме того, есть данные о том, что при интегрированном физическом статусе ВПЧ выживаемость больных раком шейки матки значительно хуже, чем при смешанном (как в данном случае) и эпизодическом статусе вируса [42, 43].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Ибрагимова М.К. – разработка концепции и дизайна статьи, анализ и интерпретация данных. Цыганов М.М. – анализ и интерпретация данных. Тарабановская Н.А., Таширева А.А. – проведение лабораторного исследования. Дерюшева И.В. – анализ и интерпретация экспериментальных данных. Бычков В.А. – анализ и интерпретация клинических данных. Перельмутер В.М. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Слонимская Е.М. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Литвяков Н.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-15-01203.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Band V., Zajchowski D. et al. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990; 87: 463–467.
2. Di Lonardo A., Venuti A. et al. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1992; 21: 95–100.
3. Yu Y., Morimoto T. et al. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Research*. 1998; 19: 5057–5061.
4. Damin A., Karam R. et al. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004; 84: 131–137.
5. Tsai J., Tsai C. et al. Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *J. of Medical Virology*. 2005; 75: 276–281.
6. Choi Y.-L., Cho E.Y. et al. Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinomas of Korean women. *Tumor Biology*. 2008; 28: 327–332.
7. Gumus M., Yumuk P. et al. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. *J. of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*. 2006; 25: 515–521.
8. He Q., Zhang S.-Q. et al. The correlations between HPV16 infection and expressions of c-erbB-2 and bcl-2 in breast carcinoma. *Molecular Biology Reports*. 2009; 36: 807–812.
9. De Leyn D.C., Montiel D.P. et al. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC cancer*. 2009; 9: 1.
10. Heng B., Glenn W. et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. *British j. of Cancer*. 2009; 101: 1345–1350.
11. Herrera-Romano L., Fernández-Tamayo N. et al. Absence of human papillomavirus sequences in epithelial breast cancer in a Mexican female population. *Medical Oncology*. 2012; 29: 1515–1517.
12. Mou X., Chen L. et al. Low prevalence of human papillomavirus (HPV) in Chinese patients with breast cancer. *J. of International Medical Research*. 2011; 39: 1636–1644.
13. Chang P., Wang T. et al. Absence of human papillomavirus in patients with breast cancer in north-west China. *Medical Oncology*. 2012; 29: 521–525.
14. Sigaroodi A., Nadji S.A. et al. Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of Iran. *The Scientific World J*. 2012.
15. Frega A., Lorenzon L. et al. Evaluation of E6 and E7 mRNA expression in HPV DNA positive breast cancer. *European J. of Gynaecological Oncology*. 2011; 33: 164–167.
16. Glenn W.K., Heng B. et al. Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. *PLoS One*. 2012; 7: e48788.
17. Liang W., Wang J. et al. Detection of high-risk human papillomaviruses in fresh breast cancer samples using the hybrid capture 2 assay. *J. of Medical Virology*. 2013; 85: 2087–2092.
18. Ahangar-Oskouee M., Shahmahmoodi S. et al. No detection of 'high-risk' human papillomaviruses in a group of Iranian women with breast cancer. *Asian. Pac. J. Cancer Prev*. 2014; 15: 4061–4065.
19. Ali S., Al-Alwan N. et al. Detection and genotyping of human papillomavirus in breast cancer tissues from Iraqi patients. *Eastern Mediterranean Health J*. 2014; 20: 372.
20. Eslamifar A., Ramezani A. et al. Assessment of the Association between Human Papillomavirus Infection and Breast Carcinoma. *Iranian J. of Pathology*. 2015; 10: 41.
21. Manzouri L., Salehi R. et al. Prevalence of human papilloma virus among women with breast cancer since 2005–2009 in Isfahan. *Advanced Biomedical Research*. 2014; 3: 75.
22. Peng J., Wang T. et al. Multiplex PCR/mass spectrometry screening of biological carcinogenic agents in human mammary tumors. *J. of Clinical Virology*. 2014; 61: 255–259.

23. Fu L., Wang D. et al. Association of human papillomavirus type 58 with breast cancer in Shaanxi province of China. *J. of Medical Virology*. 2015; 87: 1034–1040.
24. Li J., Ding J. et al. Detection of human papillomavirus DNA in patients with breast tumor in China. *PLoS One*. 2015; 10: e0136050.
25. Zhou Y., Li J. et al. Inconclusive role of human papillomavirus infection in breast cancer. *Infectious Agents and Cancer*. 2015; 10: 1.
26. Vernet-Tomas M., Mena M. et al. Human papillomavirus and breast cancer: no evidence of association in a Spanish set of cases. *Anticancer research*. 2015; 35: 851–856.
27. Ong K., Koay E.S.-C. et al. Detection of cutaneous HPV types 4 and 24 DNA sequences in breast carcinoma in Singaporean women of Asian ancestry. *Pathology*. 2009; 41: 436–442.
28. Akil N., Yasmeen A. et al. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *British J. of Cancer*. 2008; 99: 404–407.
29. Kroupis C., Markou A. et al. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clinical Biochemistry*. 2006; 39: 727–731.
30. Simxes P.W., Medeiros L.R. et al. Prevalence of human papillomavirus in breast cancer: a systematic review. *International J. of Gynecological Cancer*. 2012; 22: 343–347.
31. Haghshenas M.R., Mousavi T. et al. Human papillomavirus and breast cancer in Iran: a meta-analysis. *Iranian J. of Basic Medical Sciences*. 2016; 19: 231.
32. Lawson J.S., Glenn W.K. et al. Human papilloma virus identification in breast cancer patients with previous cervical neoplasia. *Frontiers in Oncology*. 2015; 5.
33. Ohba K., Ichiyama K. et al. *In vivo* and *in vitro* studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. *PLoS One*. 2014; 9: e97787.
34. Sugaard M., Farkas D.K. et al. Conisation as a marker of persistent human papilloma virus infection and risk of breast cancer. *British J. of Cancer*. 2016.
35. Bae J.-M., Kim E.H. Human papillomavirus infection and risk of breast cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Infectious Agents and Cancer*. 2016; 11: 1.
36. Landau D.A., Tausch E. et al. Quantitative clonal dynamics define mechanisms of CLL evolution in response to combination chemotherapy. *Blood*. 2015; 126: 362–362.
37. Stephens P.J., Greenman C.D. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 2011; 144: 27–40.
38. Fontana M.C., Marconi G. et al. Chromothripsis in Acute Myeloid Leukemia Is Strongly Associated with Poor Prognosis and TP53 Alterations. *Am. Soc. Hematology*. 2016.
39. Kloosterman W.P., Koster J. et al. Prevalence and clinical implications of chromothripsis in cancer genomes. *Current Opinion in Oncology*. 2014; 26: 64–72.
40. Bychkov V., Ibragimova M. et al. Comprehensive meta-analytical summary on human papillomavirus association with head and neck cancer. *Experimental Oncology*. 2016; 38: 68–72.
41. Holm R., Kraus I. et al. HPV DNA and e6/e7 mRNA status in relation to survival of patients treated for cervical squamous cell carcinoma. *The Open Virology J*. 2008; 2.
42. Shin H.-J., Joo J. et al. Physical status of human papillomavirus integration in cervical cancer is associated with treatment outcome of the patients treated with radiotherapy. *PLoS One*. 2014; 9: e78995.
43. Ибрагимова М.К., Цыганов М.М. и др. Интегративная и эписомальная формы 16 генотипа вируса папилломы человека при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61: 270–274. [Ibragimova M.K., Tsyganov M.M. et al. Integrative and episomal forms of genotype 16 of human papillomavirus in patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Problems of Virology*. 2016; 61: 270–274 (in Russ.)].

Поступила в редакцию 20.03.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Ибрагимова Марина Константиновна, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН; НИ ТГУ, г. Томск.

Цыганов Матвей Михайлович, канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Тарабановская Наталья Анатольевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Таширева Любовь Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение патологической анатомии и цитологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Дерюшева Ирина Валерьевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Перельмутер Владимир Михайлович, д-р мед. наук, профессор, зав. отделением патологической анатомии и цитологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Слонимская Елена Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. отделением общей онкологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН; СибГМУ, г. Томск.

Литвяков Николай Васильевич, д-р биол. наук, зав. лабораторией онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН; НИ ТГУ, г. Томск.

(✉) Ибрагимова Марина Константиновна, e-mail: Imk1805@yandex.ru.

УДК 618.19-006.5-07

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-232-238

For citation: Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Tarabanovskaya N.A., Tashireva L.A., Deryusheva I.V., Perelmuter V.M., Slonimskaya E.M., Litviakov N.V. The clinical observation of human papillomavirus positive breast tumor. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 232–238.

The clinical observation of human papillomavirus positive breast tumor

**Ibragimova M.K.^{1,2}, Tsyganov M.M.¹, Tarabanovskaya N.A.¹, Tashireva L.A.¹,
deryusheva I.V.¹, Perelmuter V.M.¹, Slonimskaya E.M.^{1,3}, Litviakov N.V.^{1,2}**

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) of Russian Academy of Sciences (RAS)
5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk State University (NR TSU)
36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moskovsky Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

In this manuscript, a unique case of HPV16-positive breast cancer is examined. The presence of HPV infection in the tumor is confirmed by two independent methods (PCR and immunohistochemistry). It is shown that in the presence of adverse factors of prognosis (lymphogenous metastasis, high level of Ki67 expression, presence of chromotrypsis in the tumor, and high level of genetic instability), a patient with a HPV-positive breast tumor has more than 8-year disease-free survival.

Key words: breast cancer, human papillomavirus, micromatrix analysis, prognosis.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The work is supported by a grant from the Russian Science Foundation on No 17-15-01203.

Received 20.03.2017

Accepted 06.02.2018

Ibragimova Marina K., Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS; NR TSU, Tomsk, Russian Federation.

Tsyganov Matvey M., PhD, Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Tarabanovskaya Natalia A., PhD, Researcher, Department of General Oncology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Tashireva Lubov A., PhD, Senior Researcher, Department of Pathological Anatomy and Cytology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Deryusheva Irina V., Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Perelmuter Vladimir M., DM, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy and Cytology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Slonimskaya Elena M., DM, Professor, Head of the Department of General Oncology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS; SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Litviakov Nikolai V., DBSc, Head of the Laboratory Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS; NR TSU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Ibragimova Marina K., e-mail: Imk1805@yandex.ru.

УДК 616.831-005.1(574.1)

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-239–242

Для цитирования: Кабдрахманова Г.Б., Утепкалиева А.П., Саркулова Ж.Н., Дарин Д.Б. Современное состояние проблемы мозгового инсульта в Западном регионе Казахстана. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 239–242.

Современное состояние проблемы мозгового инсульта в Западном регионе Казахстана

Кабдрахманова Г.Б., Утепкалиева А.П., Саркулова Ж.Н., Дарин Д.Б.

Западно-Казахстанский государственный медицинский университет (ЗКГМУ) имени Марата Оспанова
Казахстан, 030019, г. Актобе, ул. Маресьева, 68

РЕЗЮМЕ

С учетом сохраняющейся высокой заболеваемости мозговыми инсультами в Казахстане приказом Министерства здравоохранения Республики Казахстан была принята государственная противоинсультная программа, рассчитанная на период 2016–2020 гг. С июля 2012 г. в г. Актобе на базе больницы скорой медицинской помощи (БСМП) функционирует региональный инсультный центр из расчета 30 коек на 250 тыс. населения. В данной статье представлен анализ основных показателей работы инсультного центра г. Актобе за прошедший период времени, приведены данные по использованию инновационных методов лечения мозговых инсультов, таких как тромболитическая терапия, хирургические и эндоваскулярные методы лечения.

Ключевые слова: ишемический инсульт, геморрагический инсульт, субарахноидальное кровоизлияние, региональный инсультный центр, тромболитическая терапия, церебральная ангиография, тромбэктомия, стентирование, эмболизация аневризм.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в странах СНГ, включая Казахстан, проблема мозговых инсультов по-прежнему сохраняет свою актуальность и является одной из важных медико-социальных проблем, что обусловлено высокими показателями заболеваемости, смертности и инвалидизации [1–4]. В Казахстане в общей структуре неврологических заболеваний на долю мозговых инсультов приходится 52%, при этом каждый третий больной трудоспособного возраста. По данным казахстанской статистики, показатели заболеваемости мозговым инсультом в различных регионах страны составляют от 2,5 до 3,7 случаев на 1 тыс. населения, показатели смертности – 21,5% [5–7].

С учетом сложившейся ситуации в Казахстане была принята Государственная программа развития здравоохранения «Здоровый Казахстан» на период 2011–2015 гг., в рамках которой был издан Приказ Министерства здравоохранения РК №382 от 09.06.2011 г. об открытии в городах областного значения республики региональных инсультных центров. В 2016 г. в Казахстане была принята новая государственная противоинсультная программа, которая завершится в 2020 г. С июля 2012 г. в г. Актобе на базе больницы скорой медицинской помощи (БСМП) функционирует региональный инсультный центр из расчета 30 коек на 250 тыс. населения, при этом численность населения города составляет около 500 тыс. человек. В ноябре 2016 г. в г. Актобе на базе областной больницы был открыт второй инсультный центр на 30 коек. В данной статье представлен анализ основных показателей работы инсультного центра БСМП г. Актобе за прошедший период времени.

✉ Утепкалиева Айгуль Пазылбековна, e-mail: aiguler72@mail.ru.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период 2012–2016 гг. количество инсультных больных, поступивших в БСМП, составило 4 709, из них с ишемическим инсультом 2 596 (55,1%), геморрагическим 774 (16,4%), переходящим нарушением мозгового кровообращения 1 166 (24,8%), субарахноидальным кровоизлиянием 173 (3,7%).

При поступлении больных в инсультный центр неврологический статус оценивался с помощью шкалы инсульта Национального института здоровья США (NIHSS) и шкалы комы Глазго. На уровне приемного покоя всем больным проводились компьютерная томография головного мозга для дифференцировки типа инсульта, а также необходимые лабораторные исследования согласно клиническим протоколам.

Среди высокоспециализированных методов лечения ишемического инсульта используется тромболитическая терапия (ТАТ) в условиях блока интенсивной терапии инсультного центра. В качестве тромболитика применяется препарат «Актилизе» в дозе 0,9 мг/кг массы тела. Медикаментозный внутривенный тромболизис проводится в пределах 3–4,5 ч от начала заболевания согласно рекомендациям Европейской организации инсульта от 2008 г. [8]. При геморрагическом инсульте в случаях показаний проводится хирургическое лечение. С 2014 г. внедрены интервенционные методы диагностики и лечения: церебральная ангиография, тромбэктомия, стентирование внутренних сонных и позвоночных артерий, эмболизация аневризм сосудов головного мозга в соответствии с клиническими протоколами, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Казахстан.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тромболитическая терапия при ишемическом инсульте была внедрена в БСМП г. Актобе еще в 2010 г. до официального открытия инсультного центра. За прошедший период в инсультном центре ТАТ проведена 49 больным, что составляет 1,88% от общего количества больных с ишемическим инсультом. Низкая доля использования ТАТ объясняется поздним обращением больных за медицинской помощью (позже 3–4,5 ч от начала заболевания).

По подтипам ишемического инсульта на долю атеротромботического варианта приходилось 71,8%, кардиоэмболического – 19,1%, лакунарного – 9,1%. У больных, которым была проведена ТАТ, временной период от начала заболевания

до поступления в стационар составлял до 1,5 ч. При поступлении в приемный покой у больных неврологические расстройства по шкале NIHSS соответствовали 11–22 баллам, по шкале комы Глазго – в пределах 14–15 баллов. На фоне ТАТ в течение 1-х сут наблюдался значительный регресс неврологических расстройств в 73,5% случаев, а в 26,5% случаев – полное восстановление. Как показывает опыт работы, полный регресс неврологических расстройств наблюдается при кардиоэмболическом инсульте на фоне ишемической болезни сердца с фибрилляцией предсердий.

Хирургическое лечение геморрагических инсультов проводилось с использованием кранеотомии при обширных внутримозговых кровоизлияниях с применением локального фибринолиза, вентрикулярного дренирования при внутрижелудочковых кровоизлияниях. За прошедший период прооперированы 186 больных, эффективность лечения составляет до 75–80%.

С 2014 г. активно используются интервенционные методы диагностики и лечения мозговых инсультов. Церебральная ангиография проводится больным с выявленными при ультразвуковой доплерографии гемодинамически значимыми атеросклеротическими стенозами (до 50–70% просвета сосуда) в магистральных артериях каротидного и вертебробазилярного бассейнов с последующим решением вопроса о проведении тромбэктомии или стентирования. Проведены шесть тромбэктомий и пять стентирований внутренних сонных артерий.

Больным с субарахноидальным кровоизлиянием при стабилизации состояния также проводится церебральная ангиография. При выявлении аневризм сосудов головного мозга больные направляются в сосудистые центры городов Астана и Алматы для проведения эмболизации выявленных аневризм. За прошедший период количество больных, которым была проведена эмболизация аневризм, составило 64.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение тромболитической терапии в остром периоде ишемического инсульта позволяет добиться значительного, а в некоторых случаях полного восстановления неврологического дефицита с последующим возвратом больных к труду и полноценной жизни. Невысокая доля применения ТАТ при ишемическом инсульте обусловлена поздним обращением больных за медицинской помощью, что свидетельствует о низкой информированности населения о первых призна-

ках инсульта и нацеливает на дальнейшую активизацию работы по распространению доступной информации о мозговых инсультах через средства массовой информации.

Эндоваскулярные методы лечения мозговых инсультов, такие как тромбэктомия, стентирование, позволяют добиться значительного снижения риска развития повторного ишемического инсульта, а эмболизация аневризм сосудов головного мозга – избежать риска развития повторного субарахноидального кровоизлияния.

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 / REFERENCES

1. Скворцова В.И. Основы ранней реабилитации больных с острым нарушением мозгового кровообращения: учеб.-метод. пособие по неврологии для студентов медицинских вузов; под ред. В.И. Скворцовой. М.: Литтерра, 2006: 104. [Skvortsova V.I. Basics of early rehabilitation of patients with acute impairment of cerebral circulation: educational-methodical manual on neurology for students of medical schools under the editorship of V.I. Skvortsova. M.: Litterra Publ., 2006: 104 (in Russ.)].
2. Ульянова О.В. К вопросу о кардиогенных факторах риска возникновения ишемического инсульта у лиц молодого возраста. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2015; 1 (15): 62–63. [Ul'yanova O.V. On the issue of cardiogenic risk factors for ischemic stroke in young people. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika – Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2015; 1 (15): 62–63 (in Russ.)].
3. Kolokolov O.V., Kolokolova A.M., Lukina E.V. Транзиторная ишемическая атака: тактика ведения больных и антитромбоцитарная терапия с целью профилактики инфаркта мозга. *РМЖ*. 2013; 10: 532–536. [Kolokolov O.V., Kolokolova A.M., Lukina Ye. V. Transient ischemic attack: management tactics and antiplatelet therapy for the prevention of cerebral infarction. *RMZH–RMJ*. 2013; 10: 532–536 (in Russ.)].
4. Жусупова А.С. Инсульт – глобальная проблема отечественной неврологии. *Человек и лекарство – Казахстан*. 2011; 3 (3): 6–9. [Zhusupova A.S. Stroke - a global problem of domestic neurology. *Chelovek I Lekarstvo – Kazabstan*. 2011; 3 (3): 6–9 (in Russ.)].
5. Кабдрахманова Г.Б., Ермагамбетова А.П., Сулейманова С.Ю. Опыт работы инсультного центра в Западном регионе Казахстана. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2014; 2 (3): 60–62. [Kabdrakhmanova G.B., Yermagambetova A.P., Suleymanova S.Yu. The experience of the stroke center in the Western region of Kazakhstan. *Zburnal neurologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2014; 2 (3): 60–62 (in Russ.)].
6. Kondybayeva A., Kamenova S., Kuzhibayeva K., Zhanuzakov M., Sharapkhanova. A. Stroke in Kazakhstan. *European Stroke Journal*. 2016; 1: 59–60.
7. Нурманова Ш.А. Проблемы нейрореабилитации в Казахстане. *Клиническая медицина Казахстана*. 2012; 26 (4): 92–94. [Nurmanova Sh. A. Problems of neurorehabilitation in Kazakhstan. *Klinicheskaya medicina Kazabstana – Journal of Clinical Medicine of Kazakhstan*. 2012; 26 (4): 92–94 (in Russ.)].
8. Hacke W., Kaste M., Bluhmki E. et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4,5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 1317–1329. DOI: 10.1056/NEJMoa0804656.

Поступила в редакцию 18.04.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Кабдрахманова Гульнар Баяновна, д-р. мед. наук, профессор, руководитель кафедры неврологии, ЗКГМУ им. М. Оспанова, г. Актобе, Казахстан.

Утепкалиева Айгуль Пазылбековна, канд. мед. наук, и.о. доцента кафедры неврологии, ЗКГМУ им. М. Оспанова, г. Актобе, Казахстан.

Саркулова Жанслу Нукиновна, д-р. мед. наук, профессор, руководитель кафедры скорой и неотложной помощи, анестезиологии и реаниматологии с нейрохирургией, ЗКГМУ им. М. Оспанова, г. Актобе, Казахстан.

Дарин Даурен Бакузакович, магистр медицинских наук, ассистент, кафедра неврологии, ЗКГМУ им. М. Оспанова, г. Актобе, Казахстан.

(✉) Утепкалиева Айгуль Пазылбековна, e-mail: aiguler72@mail.ru.

УДК 616.831-005.1(574.1)

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-239–242

For citation: Kabdrakhmanova G.B., Utepaliyeva A.P., Sarkulova Zh.N., Darin D.B. Current state of brain stroke problem in the West Kazakhstan Region. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 239–242.

Current state of brain stroke problem in the West Kazakhstan Region

Kabdrakhmanova G.B., Utepaliyeva A.P., Sarkulova Zh.N., Darin D.B.

*West Kazakhstan Marat Ospanov State Medical University
68, Maresyev Str., Actobe, 030019, Kazakhstan*

ABSTRACT

Having taken into consideration still remaining high rate of cerebral stroke in the Republic of Kazakhstan Ministry of Health developed the State anti-stroke programme for the period of 2016–2020 years. The regional brain stroke centre with 30 beds per 250.000 people has been working at the premises of The Hospital of Emergency Medical Service (HEMS) since July 2012. Main results of Aktobe stroke centre work are submitted in this article. There are some databases of the brain stroke innovative methods of treatment use, such as thrombolytic therapy, surgical and endovascular methods of treatment.

Key words: ischemic stroke, hemorrhagic stroke, subarachnoid hemorrhage, regional stroke centre, thrombolytic therapy, cerebral angiography, thrombectomy, stenting, embolization of aneurisms.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

Received 18.04.2017

Accepted 06.02.2018

Kabdrakhmanova Gulnar B., DM, Professor, Head of the Department of Neurology, West Kazakhstan Marat Ospanov State Medical University, Actobe, Kazakhstan.

Utepaliyeva Aigul P., PhD, Associate Professor, Department of Neurology, West Kazakhstan Marat Ospanov State Medical University, Actobe, Kazakhstan.

Sarkulova Zhanslu N., DM, Professor, Head of the Department of Emergency Care, Anesthesiology and Reanimatology with Neurosurgery, West Kazakhstan Marat Ospanov State Medical University, Actobe, Kazakhstan.

Dauren Darin B., Master of Medical Sciences, Assistant, Department of Neurology, West Kazakhstan Marat Ospanov State Medical University, Actobe, Kazakhstan.

(✉) **Utepaliyeva Aigul P.**, e-mail: aiguler72@mail.ru.

УДК 577.217.34:575.117.2:616-056.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-243–253

Для цитирования: Колесникова И.С., Тулупов А.А., Дольский А.А., Лемская Н.А., Савелов А.А., Петровский Е.Д., Антонов А.А., Максимова Ю.В., Шорина А.Р., Сергеева И.Г., Телепова А.С., Графодатский А.С., Юдкин Д.В. Повышенная экспрессия рРНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью и семейным случаем хромосомы 13p+. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 243–253.

Повышенная экспрессия рРНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью и семейным случаем хромосомы 13p+

Колесникова И.С.¹, Тулупов А.А.^{2,3}, Дольский А.А.^{1,3}, Лемская Н.А.¹, Савелов А.А.², Петровский Е.Д.², Антонов А.А.³, Максимова Ю.В.^{4,5}, Шорина А.Р.⁵, Сергеева И.Г.³, Телепова А.С.^{1,3}, Графодатский А.С.¹, Юдкин Д.В.^{1,3}.

¹Институт молекулярной и клеточной биологии (ИМКБ)
Сибирского отделения (СО) Российской академии наук (РАН)
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2

²Международный томографический центр (МТЦ) СО РАН
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (ННИГУ)
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

⁴Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

⁵Городская клиническая больница № 1
Россия, 630047, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6

РЕЗЮМЕ

Данное молекулярно-цитогенетическое исследование пациента с интеллектуальной недостаточностью и признаками аутизма выявило наличие у него аномальной хромосомы 13 с увеличенным р-плечом, амплификацией рибосомной ДНК (рДНК) и очень активным ядрышкообразующим районом. Методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени обнаружен повышенный в шесть раз уровень 18S, 28S и 5.8S рибосомной РНК (рРНК) в образцах крови пациента. Также с помощью функциональной магнитно-резонансной томографии показаны функциональные изменения в головном мозге, в частности в структуре крючковидных пучков. Отец пациента, носитель аналогичной хромосомы с амплифицированной рДНК, здоров и имеет нормальный уровень экспрессии рРНК.

Ключевые слова: интеллектуальная недостаточность, рибосомная ДНК (рДНК), рибосомная РНК (рРНК); ядрышкообразующий район (ЯОР), функциональная МРТ, тракты головного мозга.

ВВЕДЕНИЕ

Интеллектуальная недостаточность у людей может быть вызвана различными факторами окружающей среды и генетическими причина-

ми, и их идентификация является важной проблемой медицинской генетики. Интеллектуальная недостаточность широко распространена и диагностируется приблизительно у 1% популяции. Генетические причины данной патологии могут быть связаны с изменением количества хромосом, структурными хромосомными

✉ Юдкин Дмитрий Владимирович, e-mail: dim@mcb.nsc.ru.

перестройками и мутациями более чем в 700 генах [1].

Полиморфизм и гетероморфизм длины р-плечей акроцентрических хромосом, содержащих ядрышкообразующие районы (ЯОР), были описаны ранее. О семейном случае гетероморфизма 13p+ сообщалось в 1976 г. [2]. Четыре члена описываемой семьи имели хромосому 13p+, при этом у двух наблюдалась интеллектуальная недостаточность. Увеличенные р-плечи хромосом 13 и 15 описаны еще в нескольких работах, что может сопровождаться задержкой умственного развития или никак не проявляться [3]. В атласе хромосом человека при этом сказано, что некоторый гетероморфизм р-плеч хромосом 13, 14, 15, 21 и 22 является нормой [4].

Гены рибосомной РНК (рРНК) располагаются в р-плечах акроцентрических хромосом человека (хромосомы 13–15, 21 и 22). Они представляют собой tandemные повторы, количество единиц в которых значительно варьирует между индивидами. Кроме того, по данным секвенирования, даже соотношение количества 18S, 28S и 5.8S рРНК может отличаться между собой, несмотря на то что они являются одной транскрипционной единицей [5]. Случаи существенной амплификации этих генов редки, хотя повышенная экспрессия рРНК и усиленный биогенез рибосом встречаются во многих случаях и часто наблюдаются при различных онкологических патологиях [6–8].

В данной статье описывается сверхэкспрессия рРНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью и признаками аутизма, у которого обнаружен гетероморфизм хромосомы 13. Одна из его хромосом 13 имеет большой блок гетерохроматина и амплификацию рибосомной ДНК (рДНК) на коротком плече.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические исследования и магнитно-резонансная томография (МРТ). Клинические исследования включали в себя консультации специалистов-медиков, в частности клинического психолога, невролога и логопеда. Все МРТ-исследования проводились на аппарате 1.5T Philips Achieva Nova Dual (Япония). Функциональная МРТ была сделана с помощью последовательности эхо-планарной визуализации на матрице 64 × 64, 35 аксиальных срезов, 4 × 4 × 4 мм³ изотропный воксель и TR/TE=3500/50 мс. Процедуры сканирования проводили с использованием 16-канальной нейроваскулярной катушки. Сеансы длились 7 мин, во время которых записывали 120

объемов, после чего их обрабатывали оффлайн с использованием ПО DPARSFA (<http://rfmri.org/DPARSF>). Проводили стандартные процедуры предварительной обработки данных, включавшие коррекцию движения, пространственное сглаживание с помощью Гауссовой функции при ПШПВ 8 мм, временную фильтрацию с порогом отсечения 100 с и удаление посторонних сигналов. Параметры уравнений регрессии для устранения шумовых сигналов включали параметры движения и их производные, временные серии интенсивности белого вещества и ликвора и линейные тенденции. Корреляции спонтанной активности были посчитаны для каждой пары областей, как это определено в атласе ААМ мозга [9].

Приготовление и окрашивание препаратов метафазных хромосом. Клетки крови культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco, США) с 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (Gibco, США) в течение 72 ч. Затем в течение 3 ч их инкубировали в присутствии 0,03%-го раствора колцемида КагуоМах (Gibco) и 2,5 мкг/мл бромистого этидия, после чего проводили гипотоническую обработку с течением 25 мин и фиксацию в смеси метанола и уксусной кислоты (3 : 1). Препараты готовили путем раскапывания суспензии клеток на предметные стекла.

Для G-окрашивания [10] препараты обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина в течение 1 мин и окрашивали красителем Романовского – Гимза в течение 1–2 мин.

Окрашивание раствором нитрата серебра проводили по методу, описанному ранее [11]. Препараты обрабатывали смесью 2%-го желатина и 1%-й муравьиной кислоты и 50%-м раствором нитрата серебра (AgNO₃) в течение 10 мин при 65 °С.

Анализ препаратов осуществляли на микроскопе Olympus BX-53 (Япония) при общем увеличении ×1 000. Для получения и анализа изображений использовали программное обеспечение ВидеоТест Карио 3.1. В каждом случае анализировали не менее 80 метафазных пластинок.

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH). Плазмиду pHr13, содержащую гены 18S, 28S и 5.8S рРНК [12], метили с помощью системы ник-трансляции BioNick (Thermo Fisher Scientific, США). Перед постановкой FISH препараты предварительно обрабатывали 100 мкг/мл раствором РНКазы в течение 1 ч при 40 °С и 0,005%-м раствором пепсина в 10 мМ соляной кислоте в течение 10 мин при 37 °С. FISH проводили с 0,06 нг меченного зонда в 50%-м формамиде при 40 °С в течение ночи. Детекцию осуществляли с помощью конъюгата

Алеха-555-стрептавидин. Окрашивание хромосом проводили с помощью DAPI (0,08 мкг/мл).

Препараты анализировали на микроскопе Olympus BX-53 при общем увеличении $\times 1\,000$. Для получения и анализа изображений использовали программное обеспечение ВидеоТест FISH 2.0.

Выделение РНК, получение комплементарной ДНК (кДНК) и количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Тотальную РНК выделяли из цельной крови или из плазмы крови с использованием набора Aurum Total RNA Mini Kit (BioRad, США), затем проводили обратную транскрипцию с помощью набора для синтеза кДНК iScript Select (BioRad). ПЦР в реальном времени проводили с использованием смеси SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) в амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler с системой CFX 96 (BioRad).

Праймеры для ПЦР в реальном времени подбирали с использованием ref. seq NR_003286.2, NR_003287.2 и NR_003285.2 для 18S, 28S и 5,8S рРНК соответственно. Для нормализации в качестве гена домашнего хозяйства использовали β -актин (ref.seq. NM_001101.3 для подбора праймеров). Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1. В качестве контроля для оценки уровня рРНК служил материал, полученный от здорового донора мужского пола с нормальным кариотипом (CPG57 в базе данных ИМКБ СО РАН). Для каждого варианта реакции делали три технических повтора и подсчитывали среднее значение со стандартной ошибкой среднего. Статистическую оценку и сравнение результатов количественной ПЦР в реальном времени проводили методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с использованием программного обеспечения GraphPad (t-критерий Стьюдента). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Таблица 1

Праймеры, использованные при оценке уровней рРНК с помощью количественной ПЦР в реальном времени		
Мишень	Прямой праймер	Обратный праймер
18S рРНК	5'- GAGAAACGGCTACCACATCCAA -3'	5'- CCAATTACAGGGCCTCGAAAGA -3'
28S рРНК	5'- GGGTGGTAAACTCCATCTAAGG -3'	5'- GCCCTCTTGAACCTCTCTCTTC -3'
5,8S рРНК	5'- GGTGGATCACTCGGCTCGT -3'	5'- CCGCAAGTGCCTTCGAAGTG -3'
β -актин	5'- CACGGCATCGTCACCAACTG -3'	5'- GCAACGTACATGGCTGGGG -3'

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты клинических и психологических исследований. Пациент мужского пола (CPG22 в базе данных ИМКБ СО РАН) является первым ребенком; родился в 2010 г. после 39 нед беременности. Оба родителя были здоровы и не имели каких-либо установленных наследственных моногенных заболеваний и не состояли в близком кровном родстве. Беременность была осложнена угрозой невынашивания в I (11 нед) и III (30 нед) триместре. Пациент был выписан из роддома с диагнозами: доношенность, зрелость, 3-кратное обвитие пуповины вокруг шеи и церебральная ишемия 1-й степени. На момент исследования пациенту было 4 года, его отцу (CPG72 в базе данных ИМКБ СО РАН) – 31 год, матери (CPG73 в базе данных ИМКБ СО РАН) – 31 год.

У пациента наблюдается высокий, широкий лоб, эпикант, клинодактилия мизинцев наряду с интеллектуальной недостаточностью легкой степени (F70.1 согласно МКБ-10), значительной задержкой речевого развития и аутичным поведением с крайней расторможенностью, отсутствием

фразовой речи (до 10 простых слов). Пациент не идет на контакт и не всегда понимает обращенную к нему речь. Физиологическое развитие средне гармоничное, развитие моторики не нарушено.

Магнитно-резонансная томография. Для участия в исследовании были приглашены контрольная группа (шесть здоровых участников), возраст (24 ± 2) года; пациент (CPG22) и его отец (CPG72). Рассмотрены функциональные корреляции (ФК) между верхними (ППЛ 83, 84), средними (ППЛ 87, 88) и поперечными извилинами, фронтальными/затылочными и верхними/нижними/средними извилинами в пределах одного полушария, результаты представлены в табл. 2.

В то время как средние коэффициенты ФК для контрольной группы были выше 0,5 для всех пар упомянутых регионов, наблюдалось существенное сокращение топологии нейронов (коннективности) у пациента CPG22 и в некоторых случаях у его отца, включая изменение направленности корреляции.

С помощью диффузионно-тензорной трактографии исследовали морфологическую структуру трактов белого вещества, которая может соответ-

ствовать генетическим нарушениям и способствовать развитию врожденных патологий. У СРG22 обнаружены значительные изменения структуры обоих крючковидных пучков, особенно в левом тракте (рис. 1). Большая часть левого крючковидного тракта переломлена в точке вхождения во фронтальную долю. Правый крючковидный тракт

менее изменен, но часть его не достигает фронтальной доли (см. рис. 1). Хотя изменения в крючковидных пучках наиболее заметны, наблюдаются изменения в других регионах белого вещества; большинство из них имеют асимметричные тракты, добавочные проводящие пути волокон белого вещества и нарушение структуры трактов.

Т а б л и ц а 2

Междольные корреляции фМРТ в состоянии покоя у пациентов с хромосомой 13p+				
Связь	СРG72 лев.	СРG72 прав.	СРG22 лев.	СРG22 прав.
Верхняя височная – верхняя передняя	R*	R***	R*	R**
Средняя височная – средняя передняя	N	N	R*	R***
Средняя височная – нижняя передняя	N	N	R**	R***
Средняя височная – нижняя затылочная	R***	R***	R***	N
Средняя височная – средняя затылочная	N	R*	R***	R***
Средняя височная – верхняя затылочная	N	N	R***	R***
Верхняя височная – средняя затылочная	N	N	R***	R***
Верхняя височная – верхняя затылочная	R***	R*	R***	R***

П р и м е ч а н и е. N – статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой отсутствуют. R* – сниженная функциональная связность, $p < 0,054$; R** – сниженная функциональная связность, $p < 0,001$; R*** – коэффициент корреляции близок к 0 или отрицательный.

Кариотипирование. У пациента описан кариотип 46, XY, 13p+. G-окрашивание выявило у него гетероморфизм пары хромосом 13, одна из которых имела увеличенное p-плечо (рис. 2, а, б). Увеличение произошло за счет удлинения сегмента p12 и крупного блока гетерохроматина в сегменте p13. Обнаруженный гетероморфизм присутствовал в 100% клеток. Анализ хромосом родителей пациента выявил нормальный кариотип (46, XX) у матери (рис. 2, с), а у отца – 46, XY, 13p+ (рис. 2, d). Таким образом, у отца была обнаружена аналогичная гетероморфная пара хромосом 13, и это означает, что пробанд унаследовал аномальную хромосому от отца. У здорового контрольного донора был выявлен нормальный кариотип 46, XY.

FISH и исследование ЯОР. Хромосомный район 13p12 несет ядрышковый организатор, в котором расположены tandemные повторы рибосомной ДНК. Каждая повторяющаяся единица содержит гены 18S, 5,8S и 28S рРНК [12]. Чтобы проверить, как изменения размера p-плеча повлияли на кластер рДНК, провели FISH и локализовали плазмиду pHr13, содержащую полную

последовательность гена трех рРНК: 18S, 28S и 5,8S [9] на хромосомах обоих носителей аномальной хромосомы 13p+ (отца СРG72 и сына СРG22). В обоих случаях сигналы, локализовавшиеся в районе 13p12, на аномальных хромосомах были значительно крупнее, чем сигналы на других акроцентрических хромосомах с ЯОР и гомологах (рис. 3, а, с, е). Это указывает на амплификацию последовательностей рДНК на аномальной хромосоме 13 как отца, так и сына.

Для оценки активности ЯОР у обоих носителей 13p+ проводили окрашивание нитратом серебра тех же метафазных пластинок СРG22 и СРG72, на которых определяли локализацию pHr13 (рис. 3, б, d, е). На аномальной хромосоме 13 СРG22 обнаружена повышенная активность ЯОР по сравнению с нормальными акроцентрическими хромосомами на обеих хроматидах по всей длине увеличенного p-плеча (включая гетерохроматиновый регион в p13). Интересно, что данный активный ЯОР представлял собой, по-видимому, единый целостный регион, в то время как более ранние сообщения описывали до четыре окраши-

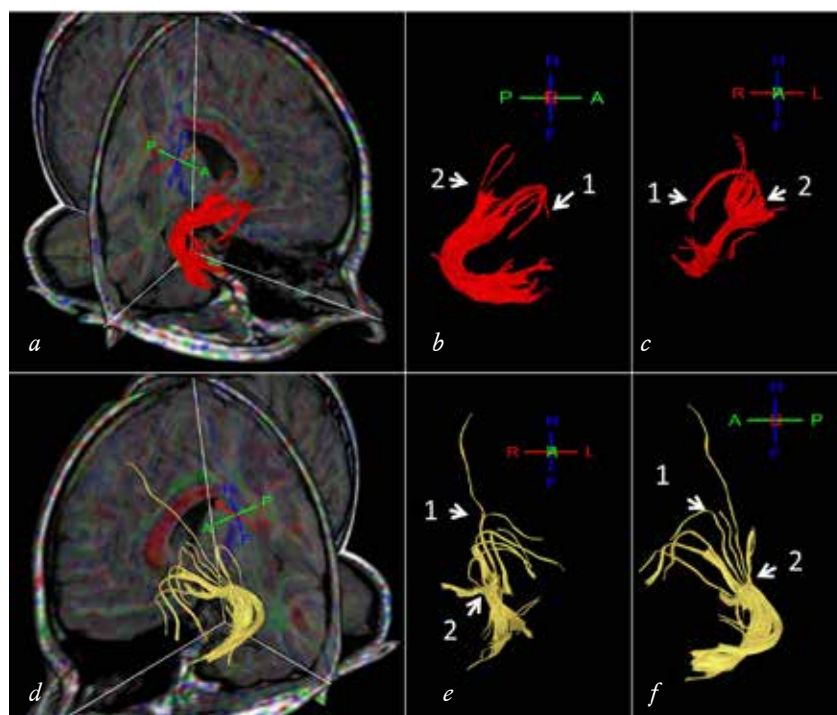


Рис. 1. Морфологические изменения левого и правого крючковидных пучков белого вещества у пациента CPG22 при диффузионно-тензорной трактографии: *a* – общий снимок правого крючковидного пучка; *b* – латеральный снимок правого крючковидного пучка; *c* – фронтальный снимок правого крючковидного пучка; *d* – общий снимок левого крючковидного пучка; *e* – латеральный снимок левого крючковидного пучка; *f* – фронтальный снимок левого крючковидного пучка. Стрелками, отмеченными 1, указаны изменения направления волокон в тракте. Стрелками, отмеченными 2, указаны разрывы трактов

Fig. 1. Morphological changes in the left and right hook-shaped beams of white matter in the patient CPG22 for diffuse-tensor tractography: *a* – the general picture of the right hook-shaped fascicle; *b* – lateral image of the right hook-shaped fascicle; *c* – front image of the right hook-shaped fascicle; *d* – general picture of the left hook-shaped fascicle; *e* – lateral image of the left hook-shaped fascicle; *f* – a front image of the left hook-shaped fascicle. The arrows marked with 1 indicate the changes in the direction of the fibers in the tract. The arrows marked with 2 indicate discontinuities of the paths

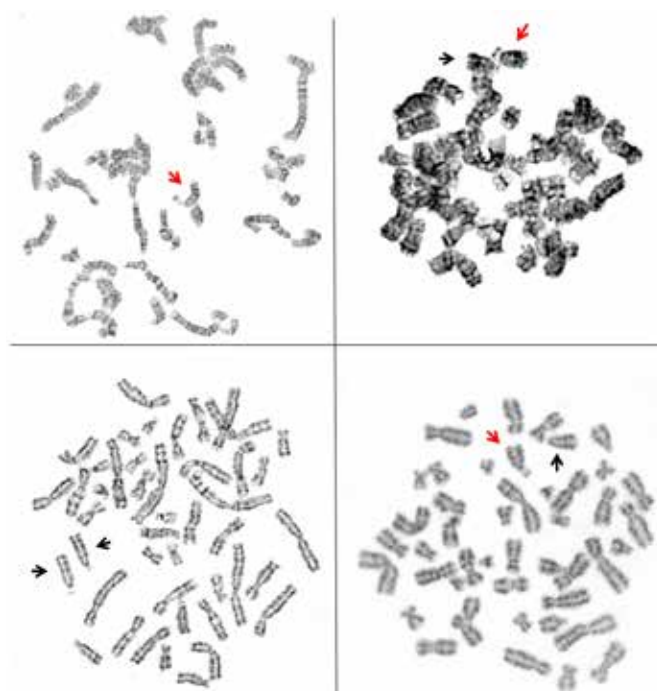


Рис. 2. G-окрашивание хромосом пациента CPG22 (*a*, *b*), его матери CPG73 (*c*) и отца CPG72 (*d*). Красные стрелки показывают аномальную хромосому 13, черные стрелки – нормальную хромосому 13

Fig. 2. G-chromosome staining of patient CPG22 (*a*, *b*), his mother CPG73 (*c*) and father CPG72 (*d*). Red arrows show an abnormal chromosome 13, black arrows indicate a normal chromosome 13

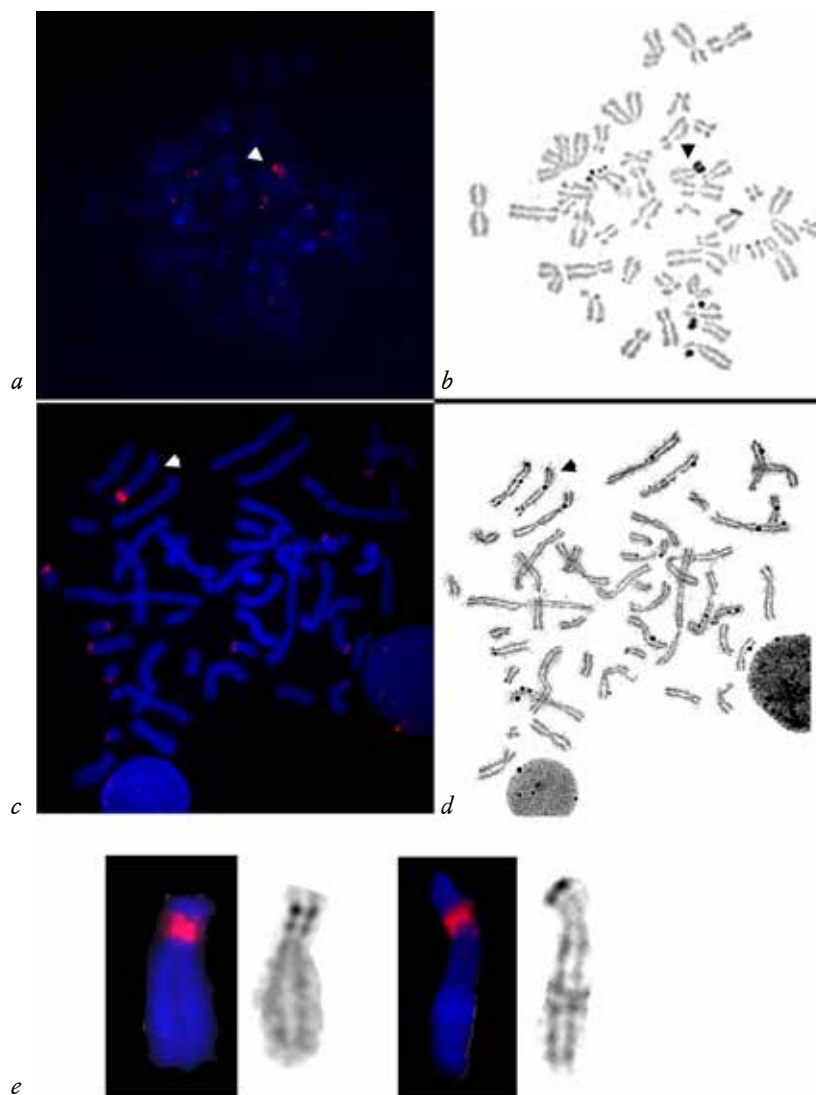


Рис. 3. Исследование ЯОР хромосом пациента CPG22 (*a, b*) и его отца CPG72 (*c, d, e*). Локализация рДНК (*a, c*) и окрашивание нитратом серебра (*b, d*). Сравнение двух типов окрашивания нитратом серебра на аномальных хромосомах 13 CPG72 (*e*). Стрелки указывают аномальную хромосому 13p+

Fig. 3. Study of the chromosome nucleolus organizer region of patient CPG22 (*a, b*) and his father CPG72 (*c, d, e*). Localization of rDNA (*a, c*) and staining with silver nitrate (*b, d*). Comparison of two types of staining with silver nitrate on abnormal chromosomes 13 CPG72 (*e*). The arrows indicate an abnormal 13p + chromosome

ваемых серебром ЯОР на увеличенных р-плечах акроцентрических хромосом [13–15].

В отличие от этого у CPG72 наблюдали один активный ЯОР на аномальной хромосоме 13, сравнимый по размеру с ЯОР на нормальных акроцентрических хромосомах в 57% клеток. В остальных 43% клеток на аномальной хромосоме 13 выявлены два различных ЯОР, из которых дистальный окрашивался ярче, т. е. был более активным (рис. 3, *e*).

Определение уровней рРНК. Яркое окрашивание серебром короткого плеча аномальной хромосомы 13 пациента с интеллектуальной недостаточностью указывало на высокую активность

ЯОР на этой хромосоме, в то время как у его отца картина была совершенно другая. Поэтому измерялись уровни экспрессии рРНК у всех обследованных членов семьи. FISH с зондами, содержащими последовательности 18S, 28S и 5,8S рРНК, выявил амплификацию, по крайней мере, некоторых из этих последовательностей. Высокая активность ЯОР по всей длине амплифицированной рДНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью могла указывать на высокий уровень экспрессии генов рРНК.

С помощью ПЦР в режиме реального времени проведена оценка количества этих трех рРНК. Для нормализации использовали мате-

риал от здорового контрольного донора с нормальным кариотипом. Было обнаружено, что у обоих здоровых родителей пациента уровни всех трех рРНК сопоставимы с нормальным контролем, за исключением уровня 18S рРНК у матери, который был достоверно ниже (рис. 4). Эти результаты согласуются с картиной, полученной при окрашивании нитратом серебра. Напротив, у их сына с интеллектуальной недостаточностью уровни экспрессии всех трех рРНК были приблизительно в шесть раз выше, чем у контрольного донора (см. рис. 4), что также согласуется с результатами окрашивания нитратом серебра.

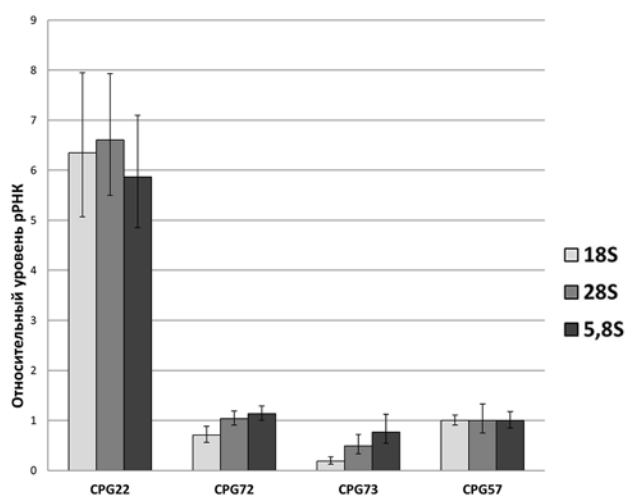


Рис. 4. Уровни экспрессии рРНК у пациента (CPG22), его родителей (CPG72 и CPG73) и здорового контрольного донора (CPG57). Результаты нормализованы относительно уровня экспрессии β -актина и уровней рРНК CPG57

Fig. 4. Levels of rRNA expression in the patient (CPG22), its parents (CPG72 and CPG73) and healthy control donor (CPG57). The results are normalized relatively to the level of β -actin expression and CPG57 rRNA levels

Отмечено, что у отца и сына присутствует одинаковая аномальная хромосома 13 с амплифицированными генами рРНК, но различается уровень их активности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Случай, описываемый в данной статье, очень похож на семейный случай, описанный ранее. С. Stoll и соавт. сообщали о четырех членах семьи (отец и три сына) – носителях аномальной хромосомы 13p+, при этом у двух сыновей наблюдались интеллектуальная недостаточность и дисморфизм, в то время как третий сын и их отец были здоровы. К сожалению, в этой работе не были проведены окрашивание нитратом серебра

и исследование рДНК, равно как и оценка уровня экспрессии рРНК [2].

В представленном исследовании FISH позволила выявить амплификацию рДНК у обоих носителей хромосомы 13p+. Чтобы изучить функциональный эффект обнаруженной амплификации, был проведен анализ уровней экспрессии рРНК в образцах крови всех членов семьи. У родителей не наблюдалось существенной разницы по сравнению с нормальным контролем (за исключением сниженного уровня 5.8S рРНК у матери), в то время как у ребенка отмечалось значительное увеличение уровня экспрессии всех трех рРНК. И отец, и сын являются носителями одинаковой хромосомы 13p+ с амплифицированной рДНК, но только у сына была обнаружена сверхэкспрессия рРНК, и она сопровождалась интеллектуальной недостаточностью и изменениями в проводящих трактах головного мозга. Однако механизм развития интеллектуальной недостаточности в данном случае не ясен.

Некоторые публикации описывали случаи аномального увеличения р-плеч акроцентрических хромосом, которые не являлись результатами транслокаций, но многие из таких случаев почти не сопровождалось нарушением здоровья [3, 13–15]. Например, D. Soudek в 1979 г. описал аномальную хромосому 13 при G-окраске, очень похожую на выявленную в представленной работе, но имевшую нормальный размер ЯОР после окрашивания нитратом серебра, такой же, как показан у CPG72 [15]. Эта аномальная хромосома передавалась по женской линии в течение трех поколений без каких-либо негативных проявлений. К сожалению, окраску серебром хромосом матери и бабушки, носительниц той же хромосомы, не проводили, равно как и исследования рДНК и экспрессии рРНК [15]. М. Schmid и соавт. сообщали о маркерной хромосоме 14p+ с амплификацией генов 18S и 28S рРНК на коротком плече. Как и у CPG72, окрашивание серебром в этом случае выявило функциональный мозаицизм маркерной хромосомы 14p+, 59% клеток имели на ней один ЯОР, 41% два ЯОР, при этом во втором случае дистальные ЯОР были более активны, как у CPG72. У носителя данной хромосомы наблюдались минорные врожденные нарушения, в то время как его отец и бабушка, носители такой же хромосомы, были здоровы [16].

D.A. Miller и соавт. ранее описали похожую хромосому 14p+ с функциональным мозаицизмом и более активными дистальными ЯОР при окрашивании серебром, которая присутствовала в трех поколениях нормальных здоровых инди-

видуумов [14]. К сожалению, большинство работ, касающихся гетероморфных пар акроцентрических хромосом, были опубликованы более 30 лет назад, и исследования описанных случаев неполные. Многие из таких работ не содержат анализа возможной амплификации рДНК, и ни одно из ранее опубликованных сообщений не включало в себя измерение экспрессии рРНК. Однако в экспериментах было показано, что правильное функционирование рибосомного аппарата, в частности сборка рибосом, крайне важно для нормального развития нервной системы [17]. Судя по результатам исследования, описываемого в данной статье, связь между амплификацией рДНК и развитием интеллектуальной недостаточности может заключаться в сверхэкспрессии рРНК с амплифицированного участка из-за возможных нарушений регуляции. Данное предположение согласуется с наличием изменений активности рибосомного аппарата при заболеваниях, связанных с нейродегенерацией, например при болезни Паркинсона [18, 19] или наследственных полиглутаминовых заболеваниях [20, 21]. Кроме того, в нестимулированных лимфоцитах периферической крови детей с синдромом Дауна также была показана повышенная активность ядрышек по сравнению со здоровым контролем [22].

Таким образом, аномальные акроцентрические хромосомы с увеличенными р-плечами могут вызывать задержку умственного развития либо не иметь каких-либо проявлений, и сложно определить, от чего это зависит. Данная статья является первым исследованием, показавшим повышенную экспрессию рРНК у пациента с интеллектуальной недостаточностью. Отмечена возможная связь между кариотипом, функционированием рДНК, функциональными изменениями в головном мозге и интеллектуальной недостаточностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы показано, что наличие гетероморфизма р-плеч акроцентрических хромосом приводит к амплификации генов рРНК и само по себе не имеет фенотипического проявления. Тем не менее активация дополнительных копий генов рРНК и их оверэкспрессия могут быть связаны с интеллектуальной недостаточностью.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Колесникова И.С. – проведение всех молекулярно-генетических работ, анализ результатов. Тулупов А.А. – анализ данных МРТ. Дольский А.А. – дизайн экспериментов с применением ПЦР в реальном времени, подбор праймеров. Лемская Н.А. – дизайн и проведение части цитогенетических работ. Савелов А.А., Петровский Е.Д., Антонов А.А. – непосредственное проведение МРТ, настройка томографа, статистическая обработка результатов МРТ. Максимова Ю.В., Шорина А.Р., Сергеева И.Г. – непосредственное клиническое обследование пациентов. Телепова А.С. – подготовка контрольных образцов. Графодатский А.С. – автор концепции о связи нарушений в рибосомном аппарате с интеллектуальной недостаточностью, дизайн всей работы. Юдкин Д.В. – общее руководство проектом, написание рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 15-15-10001.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vissers L.E., Gilissen C., Veltman J.A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nature Reviews Genetics*. 2016; 17 (1): 9–18. DOI: 10.1038/nrg3999.
2. Stoll C., Rohmer A., Korn R., Heumann G. Familial 13p+ chromosome with mental retardation and dysmorphic features of two children. *Human Genetics*. 1976; 34 (1): 81–84. DOI: 10.1007/bf00284441.
3. Starke H., Mrasek K., Liehr T. Three cases with enlarged acrocentric p-arms and two cases with cryptic partial trisomies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2005; 53 (3): 359–360. DOI: 10.1369/jhc.4B6407.2005.
4. Wyandt H.E., Tonk V.S. Atlas of human chromosome heteromorphisms. Springer Science + Business Media Dordrecht; 2011: 216.
5. Gibbons J.G., Branco A.T., Yu S., Lemos B. Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat. Commun.* 2014; 5: 4850. DOI: 10.1038/ncomms5850.
6. Uemura M., Zheng Q., Koh C.M., Nelson W.G., Yegnabramanian S., De Marzo A.M. Overexpression of ribosomal RNA in prostate cancer is common but not linked to rDNA promoter hypomethylation. *Oncogene*. 2012; 31 (10): 1254–1263. DOI: 10.1038/nc.2011.319.
7. Zhou H., Wang Y., Lv Q., Zhang J., Wang Q., Gao F., Hou H., Zhang H., Zhang W., Li L. Overexpression of ribosomal RNA in the development of human cervical cancer is associated with rDNA promoter hypomethylation. *PLoS One*. 2016; 11 (10): e0163340. DOI: 10.1371/journal.pone.0163340.
8. Nguyen le X.T., Raval A., Garcia J.S., Mitchell B.S. Regulation of ribosomal gene expression in cancer. *J. Cell Physiol.* 2015; 230: 1181–1188. DOI: 10.1002/jcp.24854.
9. Tzourio-Mazoyer N., Landeau B., Papathanassiou D., Crivello F., Etard O., Delcroix N., Mazoyer B., Joliot M.

- Automated anatomical labeling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *NeuroImage*. 2002; 15 (1): 273–289. DOI: 10.1006/nimg.2001.0978.
10. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971; 2 (7731): 971–972. DOI: 10.1016/s0140-6736(71)90287-x.
 11. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980; 36 (8): 1014–1015. DOI: 10.1007/bf01953855.
 12. Maden B.E., Dent C.L., Farrell T.E., Garde J., McCallum F.S., Wakeman J.A. Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18S-rRNA and 28S-rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones. *Biochem. J.* 1987; 246 (2): 519–527. DOI: 10.1042/bj2460519.
 13. Lau Y.F., Wertelecki W., Pfeiffer R.A., Arrighi F.E. Cytological analyses of a 14p+ variant by means of N-banding and combinations of silver staining and chromosome bandings. *Human Genetics*. 1979; 46 (1): 75–82. DOI: 10.1007/bf00278904.
 14. Miller D.A., Breg W.R., Warburton D., Dev V.G., Miller O.J. Regulation of rRNA gene expression in a human familial 14p+ marker chromosome. *Human Genetics*. 1978; 43 (3): 289–297. DOI: 10.1007/bf00278836.
 15. Soudek D. Prenatal diagnosis of a 13p+ karyotype. *Human Genetics*. 1979; 51 (3): 339–341. DOI: 10.1007/bf00283406.
 16. Schmid M., Nanda I., Steinlein C., Epplen J.T. Amplification of (GACA)_n simple repeats in an exceptional 14p+ marker chromosome. *Human Genetics*. 1994; 93 (4): 375–382. DOI: 10.1007/bf00201661.
 17. Slomnicki L.P., Pietrzak M., Vashishta A., Jones J., Lynch N., Elliot S., Poulos E., Malicote D., Morris B.E., Hallgren J., Hetman M. Requirement of neuronal ribosome synthesis for growth and maintenance of the dendritic tree. *J. Biol. Chem.* 2016; 291 (11): 5721–5739. DOI: 10.1074/jbc.M115.682161.
 18. Hetmann M., Pietrzak M. Emerging roles of neuronal nucleolus. *Trends Neurosci.* 2012; 35 (5): 305–314. DOI: 10.1016/j.tins.2012.01.002.
 19. Parlato R., Liss B. How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1842 (6): 791–797. DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.12.014.
 20. Tsio H., Lau T. C.-K., Tsang S.-Y., Lau K.-F., Chan H.Y.E. CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012; 109 (33): 13428–13433. DOI: 10.1073/pnas.1204089109.
 21. Tsoi H., Chan H.Y. Expression of expanded CAG transcripts triggers nucleolar stress in Huntington's disease. *Cerebellum*. 2013; 12 (3): 310–312. DOI: 10.1007/s12311-012-0447-6.
 22. Imamoglu N., Eroz R., Canatan H., Demitras H., Saatci C. Nuclear AgNOR enhancement in nucleoplasm of peripheral blood lymphocytes of babies/children with Down Syndrome. *Microsc. Res. Tech.* 2016. 79 (3): 133–139. DOI: 10.1002/jemt.22613.

Поступила в редакцию 28.07.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Колесникова Ирина Станиславовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, сектор хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Тулунов Андрей Александрович, д-р мед. наук, профессор РАН, зав. лабораторией МРТ технологии, МТЦ СО РАН; ННИГУ, г. Новосибирск.

Дольский Александр Алексеевич, мл. науч. сотрудник, сектор хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Лемская Наталья Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, сектор хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Савелов Андрей Александрович, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник, лаб. МРТ технологии, МТЦ СО РАН, г. Новосибирск.

Петровский Евгений Дмитриевич, лаборант, лаборатория магнитно-резонансной микротомографии, МТЦ СО РАН, г. Новосибирск.

Антонов Александр Алексеевич, студент, ННИГУ, г. Новосибирск.

Максимова Юлия Владимировна, д-р мед. наук, зав. кафедрой медицинской генетики и биологии, НГМУ; Городская клиническая больница № 1, г. Новосибирск.

Шорина Асия Ринатовна, врач-генетик, ГКБ № 1, г. Новосибирск.

Сергеева Ирина Геннадьевна, д-р мед. наук, ННИГУ, г. Новосибирск.

Телепова Алена Сергеевна, ст. лаборант, сектор хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Графодатский Александр Сергеевич, д-р биол. наук, зав. отделом разнообразия и эволюции геномов, ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.

Юдкин Дмитрий Владимирович, канд. биол. наук, зав. сектором хромосомных патологий, ИМКБ СО РАН; ННИГУ, г. Новосибирск.

(✉) Юдкин Дмитрий Владимирович, e-mail: dim@mcb.nsc.ru.

УДК 577.217.34:575.117.2:616-056.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-243–253

For citation: Kolesnikova I.S., Tulupov A.A., Dol'skiy A.A., Lemskaya N.A., Savelov A.A., Petrovsky E.D., Antonov A.A., Maksimova Yu.V., Shorina A.R., Sergeeva I.G., Telepova A.S., Graphodatsky A.S., Yudkin D.V. Overexpression of rRNA genes in a patient with intellectual disability and familial 13p+ chromosome. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 243–253.

Overexpression of rRNA genes in a patient with intellectual disability and familial 13p+ chromosome

Kolesnikova I.S.¹, Tulupov A.A.^{2,3}, Dol'skiy A.A.^{1,3}, Lemskaya N.A.¹, Savelov A.A.², Petrovsky E.D.², Antonov A.A.³, Maksimova Yu.V.^{4,5}, Shorina A.R.⁵, Sergeeva I.G.³, Telepova A.S.^{1,3}, Graphodatsky A.S.¹, Yudkin D.V.^{1,3}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology (IMCB) SB RAS
8/2, Lavrentieva Av., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

² International Tomography Center (ITC) SB RAS
3a, Institutskaya Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

³ Novosibirsk State University
2, Pirogov Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

⁴ Novosibirsk State Medical University
52, Krasny Str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

⁵ Novosibirsk City Clinical Hospital No 1
6, Zaleskiy Str., Novosibirsk, 630047, Russian Federation

ABSTRACT

A study of a child with intellectual disability revealed an enlarged p-arm in chromosome 13 and amplified rDNA. qRT-PCR showed an approximately 6-fold increased level of rRNA in the patient's blood samples. fMRI study revealed changes in uncinate fasciculus. His father is a carrier of the same chromosome, healthy and has a normal level of rRNA.

Key words: intellectual disability, ribosomal DNA – rDNA, ribosomal RNA – rRNA, nucleolus organizer region – NOR; chromosome 13, fMRI, brain tracts.

CONFLICT OF INTEREST

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

SOURCE OF FINANCING

The work is supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 15-15-10001.

Received 28.07.2017

Accepted 06.02.2018

Kolesnikova Irina S., PhD, Senior Researcher, Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Tulupov Andrey A., DM, Professor, Head of the MRI Technology Laboratory, ITC SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Dol'skiy Alexander A., Junior Researcher, Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Lemskaya Natalya A., PhD, Researcher, Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Savelov Andrey A., PhD, Senior Researcher, MRI Technology Laboratory, ITC SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Petrovsky Evgeniy D., Technician, Laboratory of Microtomography, ITC SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Antonov Alexander A., Student, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation.

Maksimova Yulia V., DM, Head of the Department of Medical Genetics and Biology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation.

Shorina Asia R., Clinical Geneticist, Novosibirsk City Clinical Hospital No 1, Novosibirsk, Russian Federation.

Sergeeva Irina G., DM, Director of Center of Medical Postgraduate Education, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation.

Telepova Alena S., Technician, Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

Graphodatsky Alexander S., DBSc, Head of the Department of the Diversity and Evolution of Genomes, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

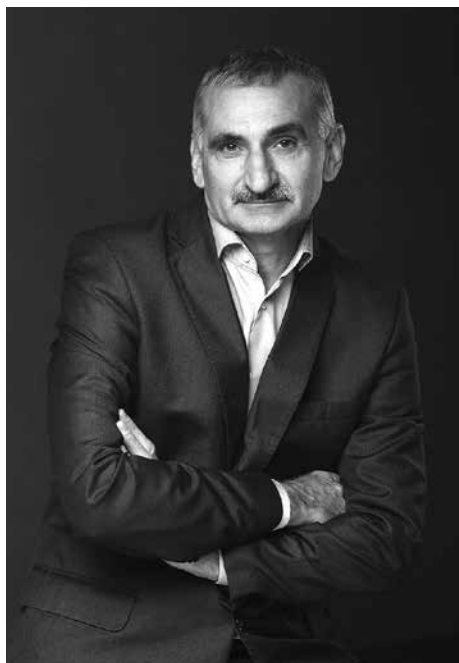
Yudkin Dmitry V., PhD, Head of the Chromosome Pathology Group, IMCB SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Yudkin Dmitry V.**, e-mail: dim@mcb.nsc.ru.

УДК 617(092)

**Григорий Владимирович
Слизовский
(К 60-летию со дня рождения)**

**Grigory Vladimirovich
Slizovsky
(To 60th birthday)**



Пятого января 2018 г. исполнилось 60 лет доктору медицинских наук, доценту, заведующему кафедрой детских хирургических болезней Сибирского государственного медицинского университета Григорию Владимировичу Слизовскому.

Григорий Владимирович – один из выдающихся сотрудников СибГМУ. Такие качества, как энергичность, активная жизненная позиция, принципиальность и твердость, с одной стороны, мудрость и лояльность – с другой, воплощают в этом человеке образ истинного врача. Благодаря большому опыту и высокой квалификации в

хирургии, Григорий Владимирович всегда готов бескорыстно прийти на помощь своим коллегам в трудной клинической ситуации.

Г.В. Слизовский родился 5 января 1958 г. в с. Старожиловка Кустанайской области Казахской ССР. После окончания средней школы в 1975 г. поступил на педиатрический факультет Томского медицинского института. В 1981 г. после окончания института был принят на должность детского хирурга ЦМСЧ № 81 г. Северска, где под руководством С.С. Сигаило и М.Р. Хотько занимался лечением детей с различной хирургической патологией. Под руководством профессора Г.К. Жерлова работал в экспериментальной операционной г. Северска. После обучения в ординатуре по специальности «детская хирургия» в 1989 г. Григорий Владимирович был принят на должность ассистента кафедры детских хирургических болезней, где трудился в лучших традициях научно-практической школы профессора И.С. Венгеровского и его преемников: профессора В.И. Москвина, профессора Ю.К. Землякова, доцента В.Н. Семёнова, профессора А.Д. Ли, доцента В.М. Масликова. В 2001 г. Григорий Владимирович был избран на должность доцента кафедры. С 2011 г. по настоящее время он является заведующим кафедрой детских хирургических болезней СибГМУ.

Практическая деятельность Г.В. Слизовского не ограничивается детской хирургией. В его компетенцию входят такие дисциплины, как урология и андрология, травматология, ортопедия и торакальная хирургия. Область научных интересов Григория Владимировича – изучение междисциплинарных проблем прикладной и экспериментальной медицины, морфологии, патофизиологии и фармакологии. Совместно с директором центра клинических исследований СибГМУ профессором Ю.Г. Самойловой им ведется клиническая апробация новых лекарственных препаратов и способов лечения. Экспериментальная и практическая деятельность Григория Владимировича неразрывно связана с работой НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы. Совместно с директором института профессором В.Э. Гюнтером им были усовершенствованы и использованы импланты из никелида титана в детской костнопластической хирургии.

Клиническая база кафедры детских хирургических болезней СибГМУ – Детская городская

больница № 4 – стала второй *alma mater* для Григория Владимировича. Здесь под руководством ряда ведущих специалистов – А.С. Чернова, А.Н. Евстафьева, В.Б. Богоряда, В.Г. Осипкина, Н.М. Морозова – он совершенствовал свои навыки. Большая часть исследований Григория Владимировича посвящена изучению патологии тазобедренного сустава, грудной клетки и других ортопедических заболеваний костей и суставов у детей. Им внесен значительный вклад в развитие и усовершенствование торакопластических операций на грудной клетке при различных видах ее деформации. Благодаря разработке авторской методики коррекции воронкообразной деформации грудной клетки, Григорию Владимировичу удалось снизить продолжительность операции с 3 часов до 25 минут. Высокая квалификация Григория Владимировича позволяет оперировать детей любого возраста, а также взрослых с различной хирургической патологией.

В 2000 г. под руководством академика В.В. Новицкого и члена-корреспондента Г.Ц. Дамбаева Григорий Владимирович в совете СибГМУ защитил кандидатскую диссертацию по теме «Роль нарушений регионарного кровообращения в патогенезе ишемического синдрома при повреждениях коленного сустава и их коррекция». В 2016 г. в совете Омского государственного медицинского университета под руководством профессора Л.А. Ситко защитил докторскую диссертацию по теме «Хирургическое лечение ортопедических заболеваний костей у детей с применением усовершенствованных композиционных материалов из никелида титана».

Григорий Владимирович – талантливый ученый и педагог (стаж научно-педагогической деятельности составляет 29 лет) – пользуется неизменным авторитетом у врачей. Каждый детский хирург в Томской области в той или иной степени является учеником Григория Владимировича. Им опубликовано более 300 работ, в том числе 11 монографий, шесть учебных пособий, он обладатель 15 патентов РФ и авторских свидетельств на изобретения. Григорию Владимировичу принадлежит ряд методических рекомендаций, которые и сегодня успешно используются в практике различных лечебно-профилактических учреждений Томской области. Под его руководством подготовлено две диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (И.И. Кужеливский, М.А. Фёдоров).

Григорий Владимирович внес значительный вклад в развитие хирургии и ортопедии детского возраста в регионах Томской области. В долж-

ности зам. директора СИБФНКЦ ФМБА России регулярно совершал командировки в отдаленные районы Томской области, обследуя детей с различной хирургической патологией. Международная деятельность Г.В. Слизовского заключается в регулярном сотрудничестве с центральными госпиталями Испании и Южной Кореи, где совместно с ведущими специалистами Григорий Владимирович обменивается опытом в области травматологии и ортопедии.

С 2011 г. по настоящее время Г.В. Слизовский возглавляет Томское областное научно-практическое общество детских хирургов, является членом комиссии Департамента здравоохранения Томской области по аттестации специалистов направления «детская хирургия». В 2011–2015 гг. Григорий Владимирович был главным внештатным детским хирургом Томской области. Ежедневно Григорий Владимирович принимает сдачу дежурств по скорой помощи в ОГАУЗ БСМП № 2, входит в состав медицинских консилиумов, участвует в клинических разборах по ведению тяжелых больных города и области, является председателем патологоанатомических конференций.

Григорий Владимирович – член Ассоциации детских хирургов России, ежегодно присутствует на таких форумах, как симпозиум и съезд по детской хирургии, в качестве модератора секции «Травматология и ортопедия». Общение с известными учеными – профессорами А.Ю. Разумовским, В.М. Крестьяшиным, А.В. Пискаловым, В.А. Кожевниковым, В.Н. Стальмаховичем – кардинально повлияли на его научную творческую деятельность. Г.В. Слизовский возглавляет студенческий научный кружок, члены которого выступают на всероссийских конференциях по детской хирургии, занимая призовые места.

В 2014 г. Г.В. Слизовский награжден почетной грамотой Департамента здравоохранения Томской области, в 2017 г. – почетной грамотой Министерства здравоохранения Российской Федерации за заслуги в здравоохранении и многолетний добросовестный труд. Григорий Владимирович удивительно позитивный, вместе с тем стойкий и невероятно энергичный человек. Его рабочий день может начаться в 7.00 в операционной СИБФНКЦ ФМБА г. Северска, в 10.00 продолжиться в операционной ОГАУЗ БСМП № 2 г. Томска, в 13.00 – чтением лекции для студентов педиатрического факультета и закончиться глубоким вечером на амбулаторном приеме. На кафедре работают ученики Григория Владимировича – коллеги, аспи-

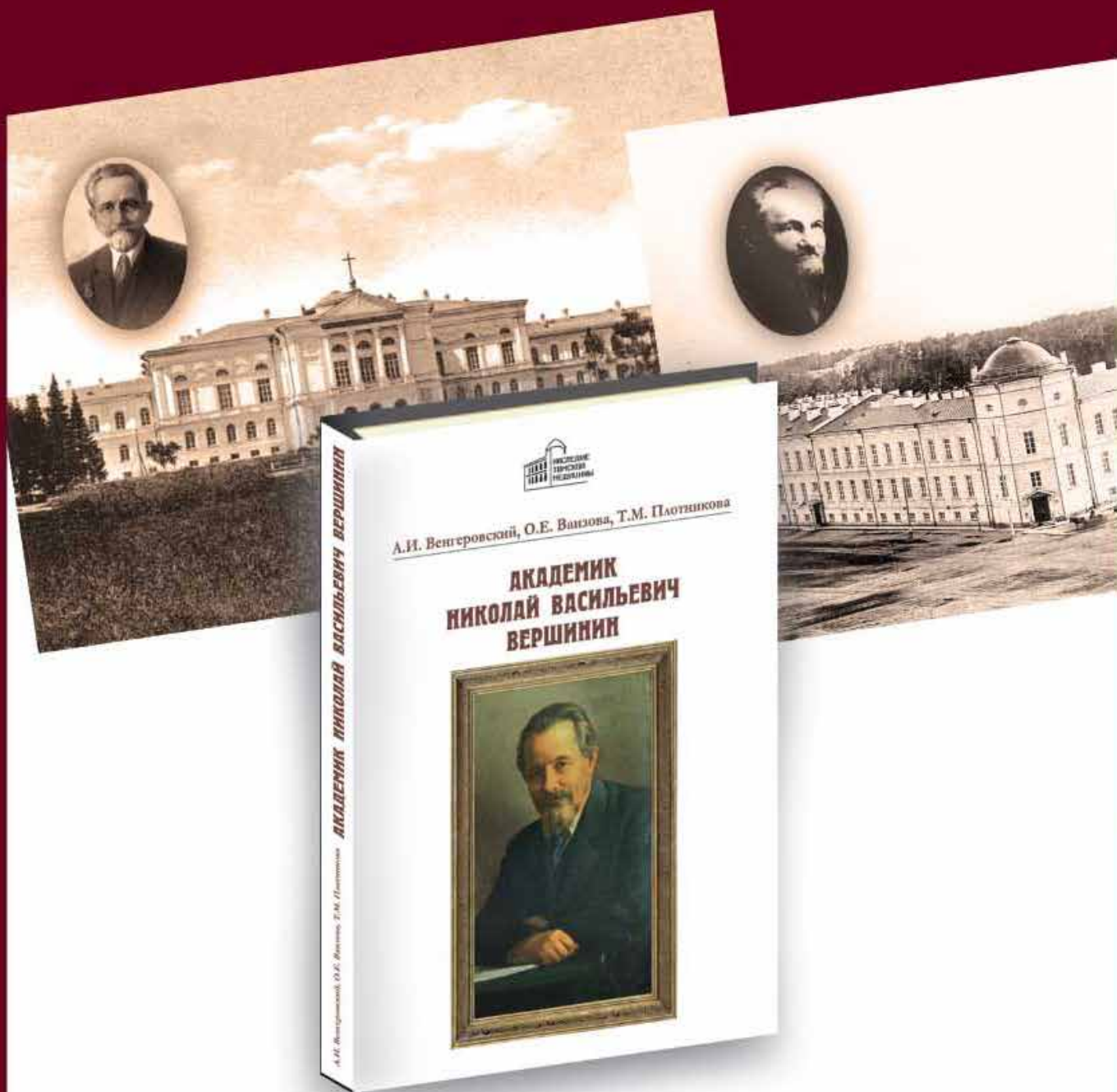
ранты, докторанты, соискатели. Они активно продолжают свои исследования в рамках созданных им научных направлений, и многие диссертационные работы имеют важное социальное и практическое значение.

Всю свою жизнь Григорий Владимирович увлекается спортом и боевыми видами восточных единоборств. Пожалуй, это единственный в России доктор медицинских наук, в рабочем кабинете которого есть макивара и нунчаки.

Коллектив кафедры детских хирургических болезней Сибирского государственного медицинского университета сердечно поздравляет Григория Владимировича Слизовского, желает ему здоровья, долгих лет профессиональной и творческой жизни.

Дорогой Григорий Владимирович, пусть Ваш бесценный опыт и неиссякаемая жизненная энергия передаются Вашим близким и коллегам!

150 лет со дня рождения академика Николая Васильевича Вершинина



К юбилею выдающегося отечественного фармаколога в издательстве СибГМУ вышла в свет книга «Академик Николай Васильевич Вершинин».

В книге представлены биография и обзор научной, педагогической и общественной деятельности выдающегося фармаколога, академика АМН СССР, заслуженного деятеля науки РСФСР, лауреата Сталинской (Государственной) премии Николая Васильевича Вершинина (1867–1951).

Для врачей, студентов, ученых, всех интересующихся историей медицины.

bulletin.tomsk.ru



ISSN 1682-0363 (print)

ISSN 1819-3684 (on-line)

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

2018. Т. 17. № 1. 1–254

Подписной индекс 46319