

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

БСМ

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

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

BSM



Том 18

№ 2. 2019

## СибГМУ 1888–2019 гг.



На первый курс медицинского факультета осенью 1888 г. были зачислены 72 студента, из них 30 человек были выпускниками гимназий, двое перешли из других университетов, 40 окончили духовные семинарии.

**В 1893 г. первый выпуск медицинского факультета составил 34 студента, из них 31 выпускник держали испытания в государственной комиссии и были удостоены степени лекаря и лекаря с отличием.**

Среди выпускников были будущие профессора Томского университета П.В. Бутягин, И.М. Левашев и С.М. Тимашев. С 1893 г. по 1916 г. в испытательной медицинской комиссии Томского университета выдержали экзамены и были удостоены степени лекаря 1389 студентов, 568 из них получили дипломы с отличием.



На медицинском факультете осуществлялась подготовка не только лекарей, но также зубных врачей, дантистов, провизоров, аптекарских помощников и повивальных бабок.



# БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал  
Выходит 4 раза в год

Том 18, № 2, 2019

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:  
Scopus

Web of Science (WoS (ESCI))

РИНЦ (Science Index)

RSCI

Ulrich's International Periodicals Directory

Cyberleninka

DOAS

Редакция:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107.

Тел.: (382-2)-51-41-53.

<http://bulletin.tomsk.ru>

E-mail: [bulletin@bulletin.tomsk.ru](mailto:bulletin@bulletin.tomsk.ru)

Оригинал-макет:

Издательство СибГМУ.

634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

Редакторы: Е.Е. Степанова, Ю.П. Готфрид

Перевод: М.Е. Орлова, Дж. Палацца

Электронная верстка, дизайн обложки

А.Д. Кривцова

Отпечатано в ООО «Литбюро»,

634055, г. Томск, ул. Королёва, 4.

Подписано в печать 20.06.2019 г.

Формат 60 × 84/8. Печать офсетная.

Бумага мелованная. Гарнитура «Мысль».

Печ. л. 38. Усл. печ. л. 36,5.

Тираж 500 экз. Заказ 74.

Цена – свободная.

Дата выхода в свет 26.06.2019.

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, 2019

## 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. Макария, *член-корреспондент РАН* (Москва)

Л.С. Намазова-Баранова, *академик РАН* (Москва)

С.А. Некрылов, *профессор, д-р ист. наук* (Томск)

В.П. Пузырев, *академик РАН* (Томск)

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

В.И. Стародубов, *академик РАН* (Москва)

Е.А. Степанова, *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)

A. Antsaklis, *профессор* (Греция)

F. Chervenak, *профессор* (США)

C. Dadak, *профессор* (Австрия)

Y. Dekhtyar, *профессор* (Латвия)

M. Eppe, *профессор* (Германия)

D. Gailani, *профессор* (США)

P. Odermatt (Швейцария)

J. Odland (Норвегия)

S. Orlov, *профессор* (Канада)

M. Poyurovsky, *профессор* (Израиль)

V. Zhdankin, *профессор* (США)

# BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

Peer-reviewed scientific-practical journal  
Issued quarterly

## Volume 18, No. 2, 2019

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:

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

Editorial Board Office:

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

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

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

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

Signed to print 20.06.2019  
Format 60 × 84/8. Offset print.  
Coated paper. Mysl' font.  
P.l. 38. C.p.l. 36,5.  
500 copies. Odder no. 74.

The price – free.  
Date of publication 26.06.2019.

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

© Siberian State Medical University, 2019

### EDITOR-IN-CHIEF

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

### DEPUTY-EDITORS-IN-CHIEF:

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

### SCIENCE EDITOR

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

### EDITORIAL BOARD:

V.M. Alifirova, *Professor (Tomsk)*  
L.I. Aftanas, *Academician of RAS (Novosibirsk)*  
A.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)*  
V.I. Kiselyov, *Corresponding Member of RAS (Barnaul)*  
A.N. Kornetov, *Professor (Tomsk)*  
S.V. Logvinov, *Professor (Tomsk)*  
A.D. Makatsaria, *Corresponding Member of RAS (Moscow)*  
L.S. Namazova-Baranova, *Academician of RAS (Moscow)*  
S.A. Nekrylov, *Professor (Tomsk)*  
V.P. 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)*  
P. Odermatt (Switzerland)  
J. Odland (Norway)  
S. Orlov, *Professor (Canada)*  
M. Poyurovsky, *Professor (Israel)*  
V. Zhdankin, *Professor (USA)*



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	ORIGINAL ARTICLES
Агаркова Л.А., Бухарина И.Ю., Белова Н.Г., Ульянич А.А., Вершкова Е.М., Толмачев И.В., Мурзина Е.Г. Факторы риска и математическая модель осложненного течения беременности на основании интегративного анализа	Agarkova L.A., Bukharina I.Yu., Belova N.G., Uliyanich A.L., Vershkova E.M., Tolmachev I.V., Murzina E.G. Risk factors and mathematical model of complicated pregnancy using integrative analysis
Андреева Е.А., Хонина Н.А., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Пасман Н.М., Козлов В.А., Черных Е.Р. Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными показателями овариальной функции	Andreeva E.A., Khonina N.A., Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Pasman N.M., Kozlov V.A., Chernykh E.R. Cell-free DNA in follicular fluid of women with different parameters of ovarian function
Бунятян Н.Д., Власова Т.И., Мышкина Н.А., Власов А.П., Полозова Э.И., Лещанкина Н.Ю., Прокофьев А.Б., Гуревич К.Г. Ключевые звенья патогенеза токсической миокардио- патии	Bunyatyanyan N.D., Vlasova T.I., Mysbkina N.A., Vlasov A.P., Polozova E.I., Leshchankina N.Yu., Prokofiev A.B., Gurevich K.G. Key elements of toxic myocardiopathy pathogenesis
Васильев А.Ю., Петрова Е.Б., Федорова М.В., Ефимова С.Б., Кордастов П.Н. Результаты стандартной эхокардиографии и использо- вания технологии Velocity Vector Imaging в отдаленные сроки после хирургической реваскуляризации у пациен- тов с ишемической болезнью сердца	Vasiliev A.Yu., Petrova E.B., Fedorova M.V., Efimova S.B., Kordatov P.N. The results of standard echocardiography and use of Velocity Vector Imaging technology after surgical revascularization in patients with coronary artery disease
Васильева И.В., Григорьев П.Е. Изменения в эмоциональном состоянии и представлении об образе своего тела у пациентов с дорсопатиями после курса медицинского массажа	Vasilieva I.V., Grigoriev P.E. Changes in emotional state and the perception of body image in patients with dorsopathies after a course of medical massage
Гребенюк О.В., Алифиров В.М., Светлик М.В., Левко А.Н., Катаева Н.Г. Частотно-временные характеристики веретен сна при идиопатической генерализованной эпилепсии с вари- бельным фенотипом у взрослых	Grebenyuk O.V., Alifirova V.M., Svetlik M.V., Levko A.N., Kataeva N.G. Frequency-temporal characteristics of sleep spindles in IGE with variable phenotypes in adults
Григорьян А.Ю., Бежин А.И., Панкрушева Т.А., Суковатых Б.С., Чекамарева М.С., Жилева Л.В. Применение многокомпонентной пленки в лечении ран в эксперименте	Grigoryan A.Yu., Bezbin A.I., Pankrusheva T.A., Sukovatykh B.S., Chekmareva M.S., Zbilyaeva L.V. Experimental usage of a multicomponent film in treatment of wounds
Ди Мартино А., Власов С.С., Гурьев А.М., Юсубов М.С., Постников П.С., Белоусов М.В. Разработка и свойства нового носителя доxorубина на основе поверхностно-модифицированных микро- частиц ноль-валентного железа с высокой эффектив- ностью инкапсуляции и возможностью его контролируе- мого высвобождения	Di Martino A., Vlasov S.S., Guryev A.M., Yusubov M.S., Postnikov P.S., Belousov M.V. Development and properties of a new doxorubicin carrier based on surface-modified iron zero-valent microparticles with high encapsulation efficiency and the possibility of its controlled release
Зюзьков Г.Н., Удут Е.В., Мирошниченко Л.А., Полякова Т.Ю., Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Агафонов В.И., Жданов В.В. Нейропротективные свойства ингибитора C-Jun N-terminal kinase (JNK) при гипоксической гипоксии	Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Poljakova T.Yu., Simanina E.V., Stavrova L.A., Agafonov V.I., Zhdanov V.V. Neuroprotective properties of the C-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor in hypoxic hypoxia

Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Москвитина Н.С., Кривошеина Е.И., Кузнецов А.И., Романенко В.Н., Боляшкова Н.П., Терновой В.А., Локтев В.Б.

Обнаружение и генотипирование *Anaplasma phagocytophilum* в клещах *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, собранных в г. Томске в 2015–2016 годах

89

Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В., Носарев А.В., Смаглий Л.В., Петрова И.В., Рыдченко В.С., Лещева А.А., Медведев М.А., Суханова Г.А., Васильев В.Н.

Роль ЦАМФ-зависимой сигнальной системы в регуляции электрических и сократительных свойств гладких мышц мочеоточника морской свинки при гипоксии

99

Корнетов А.Н., Корнетова Е.Г., Голенкова А.В., Козлова С.М., Аржаник М.Б., Самойленко Ж.А., Бойко А.С., Семке А.В.

Нейрокогнитивный дефицит в клиническом полиморфизме шизофрении: типология, выраженность и синдромальные перекрытия

107

Маркова Е.В., Савкин И.В., Аникеева О.С., Козлов В.А. Пролiferация и апоптоз лимфоцитов у экспериментальных животных после многократной трансплантации клеток иммунной системы, проведенной в ювенильный период развития

119

Мурик С.Э.

О возможности омегаэлектроэнцефалографии в оценке функционального и метаболического состояния нервной ткани головного мозга при гипервентиляции

127

Русских А.Н., Шабоха А.Д.

Способ рентгенологического исследования морфометрических показателей сосудов порто-кавальной системы прямой кишки трупов мужчин

146

Филиппова Е.О., Кривошеина О.И., Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Дзюман А.Н., Зайцев К.В.

Интрастромальная имплантация трековых мембран с пренатальными стромальными клетками человека при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте

157

Цветкова А.С., Крандычева В.В., Харин С.Н.

Электрофизиологическое ремоделирование правого желудочка при экспериментальной сердечной недостаточности различной этиологии

165

#### ДЕКЛАРАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Деев И.А., Барановская С.В., Бойков В.А., Грахов В.Н., Кравченко А.П., Кобыкова О.С., Малахова С.В., Таранов А.А., Шибалков И.П.

Декларация о пациент-ориентированном здравоохранении Томской области

175

Kartashev M.Yu., Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Krivosheina E.I., Kuznetsov A.I., Romanenko V.N., Bol'shakova N.P., Ternovoi V.A., Loktev V.B.

Detection and genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* in *I. persulcatus* and *D. reticulatus* ticks collected in Tomsk (Western Siberia) in 2015–2016

Kovalev I.V., Birulina J.G., Gusakova S.V., Nosarev A.V., Smaglyi L.V., Petrova I.V., Rydchenko V.S., Leshcheva A.A., Medvedev M.A., Subanova G.A., Vasiliyev V.N.

The role of CAMP-dependent signaling systems in regulation of electrical and contractile properties of smooth muscles of the ureter in hypoxia in guinea pigs

Kornetov A.N., Kornetova E.G., Golenkova A.V., Kozlova S.M., Arzhanik M.B., Samoylenko Zb.A., Boiko A.S., Semke A.V.

Neurocognitive deficits in clinical polymorphism of schizophrenia: typology, expression and syndromal overlaps

Markova E.V., Anikeeva O.S., Savkin I.V., Kozlov V.A.

Proliferation and apoptosis of experimental animal's lymphocytes after multiple transplantation of immune cells from opposite behavioral types of donors carried out in the juvenile period

Murik S.E.

About the use of omega-electroencephalography to estimate functional and metabolic state of nervous tissue of the brain during hyperventilation

Russkikh A.N., Shabokha A.D.

X-ray examination methods of veins of the human rectum

Filippova E.O., Krivosheina O.I., Khlusov I.A., Pichugin V.F., Dzyuman A.N., Zaitsev K.V.

Intrastromal implantation of track-etched membranes overlaid by prenatal stromal cells for bullous keratopathy in the experiment

Tsvetkova A.S., Krandycheva V.V., Kharin S.N.

Electrophysiological remodeling of the right ventricle in experimental heart failure of different etiologies

#### HEALTH DECLARATION OF TOMSK REGION

Deev I.A., Baranovskaya S.V., Boykov V.A., Grakhov V.N., Kravchenko A.P., Kobaykova O.S., Malakhova S.V., Taranov A.A., Shibalkov I.P.

Declaration on patient-oriented healthcare of the Tomsk region

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ	REVIEWS AND LECTURES
Зверев Я.Ф. Противоопухолевая активность флавоноидов	181 Zverev Y.F. Antitumor activity of flavonoids
Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе	195 Zenkov N.K., Chebushkov A.V., Kozhin P.M., Martinovich G.G., Kandalintseva N.V., Menshchikova E.B. Autophagy as a protective mechanism in oxidative stress
Зулькарнаев А.Б. Особенности анализа выживаемости на примере пациентов в «листе ожидания» трансплантации почки	215 Zulkarnaev A.B. Features of survival analysis on patients on the «waiting list» for kidney transplantation
Королева Е.С., Алифирова В.М., Латыпова А.В., Чебан С.В., Отт В.А., Бразовский К.С., Толмачев И.В., Бразовская Н.Г., Сёмкина А.А., Катаева Н.Г. Принципы и опыт применения роботизированных реа- билитационных технологий у пациентов после инсульта	223 Koroleva E.S., Alifirova V.M., Latypova A.V., Cheban S.V., Ott V.A., Brazovskiy K.S., Tolmachev I.V., Brazovskaya N.G., Semkina A.A., Kataeva N.G. Principles and global experience of applying robotic rehabilitation technologies in patients after stroke
Орлов С.Н. Мембранная теория патогенеза артериальной гипертен- зии: что мы знаем об этом полвека спустя?	234 Orlov S.N. Membrane theory of the pathogenesis of arterial hypertension: What do we know about this, half a century later?
Страшеникова Н.С., Мартынова Г.П., Салмина А.Б., Оловянная Р.Я., Кутяков В.А., Тохидпур А. Возможности применения протеомного анализа в ин- фектологии	248 Strashnikova N.S., Martynova G.P., Salmina A.B., Olovyanikova R.Ya., Kutakov V.A., Tobidpur A. Possibilities of using proteomic analysis in infectiology
Тюфиллин Д.С., Деев И.А., Кобякова О.С., Куликов Е.С., Табакаев Н.А., Винокурова Д.А., Кириллова Н.А. Контроль аллергического ринита: современные инстру- менты оценки	262 Tyufilin D.S., Deev I.A., Kobyakova O.S., Kulikov E.S., Tabakaev N.A., Vinokurova D.A., Kirillova N.A. Allergic rhinitis control: contemporary approaches to evaluation
Хлусов И.А., Митриченко Д.В., Просолов А.Б., Николаева О.О., Слепченко Г.Б., Шаркеев Ю.П. Краткий обзор биомедицинских свойств и применения магниевых сплавов для биоинженерии костной ткани	274 Khlusov I.A., Mitrichenko D.V., Prosolov A.B., Nikolaeva O.O., Slepchenko G.B., Sharkeev Yu.P. Short review of the biomedical properties and application of magnesium alloys for bone tissue bioengineering
Klimov A.V., Isaev P.Yu., Klimov V.V., Sviridova V.S. Endotypes of allergic rhinitis and asthma accompanying food allergy	287 Klimov A.V., Isaev P.Yu., Klimov V.V., Sviridova V.S. Endotypes of allergic rhinitis and asthma accompanying food allergy
СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ	CASE CLINICAL PRACTICE
Гарганеева Н.П., Белокрылова М.Ф., Костин А.К., Кошель А.П., Епанчинцева Е.М., Лебедева В.Ф., Аксенов М.М., Перчаткина О.Э., Карташова И.Г., Рудницкий В.А., Горбачевич Ю.Н., Цыбульская Е.В., Алексеев В.А. Коморбидность ахалазии пищевода, смешанной тре- вожной и депрессивной реакции у пациентки молодого возраста: проблемы диагностики и лечения	290 Garganeeva N.P., Belokrylova M.F., Kostin A.K., Koshel A.P., Epanchintseva E.M., Lebedeva V.F., Aksenov M.M., Perchatkina O.E., Kartashova I.G., Rudnitsky V.A., Gorbachevich Yu.N., Tsybul'skaya E.V., Alekseev V.A. Comorbidity of esophageal achalasia, mixed anxiety and depressive reaction in a young female patient: problems of diagnosis and treatment
Чернышова А.А., Коломиец Л.А., Кишкина А.Ю., Очиров М.О. Редкий случай сочетания рака шейки матки с односто- ронней полной аплазией придатков	299 Chernyshova A.A., Kolomiets L.A., Kishkina A.Yu., Ochirov M.O. Combination of cervical cancer and unilateral complete aplasia of the adnexa: a case report

УДК 618.3-06-036-071

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-6-15>

## Факторы риска и математическая модель осложненного течения беременности на основании интегративного анализа

Агаркова Л.А.<sup>1</sup>, Бухарина И.Ю.<sup>1</sup>, Белова Н.Г.<sup>1</sup>, Ульянич А.Л.<sup>2</sup>,  
Вершкова Е.М.<sup>3</sup>, Толмачев И.В.<sup>1,4</sup>, Мурзина Е.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и перинатологии (НИИАГП), Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Сибирского отделения (СО) Российской академии наук (РАН)

Россия, 634039, г. Томск, ул. Сергея Лазо, 4

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

<sup>4</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)

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

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы:** выявить дополнительные факторы риска осложненного течения беременности и разработать математическую модель прогнозирования течения гестационного процесса на основании комплексного подхода.

**Материалы и методы.** Проведено простое проспективное исследование в параллельных группах 240 женщин низкой степени перинатального риска в I и II триместрах беременности. Для исследования психоэмоционального состояния и личностных особенностей беременных женщин использовали опросник «Качество жизни» SF-36, Семантический дифференциал Ч. Осгуд, методику «Самооценка психических состояний» Г. Айзенка, Пятифакторный личностный опросник (Big five) Р. МакКрае и П. Коста. Для оценки влияния окружающей среды использовали анкету изучения степени удовлетворенности городской средой Ю.В. Катаевой.

**Результаты.** Установлены дополнительные критерии для прогнозирования течения гестационного процесса. Для I триместра такими факторами оказались: наличие ограничений в выполнении повседневных ролевых функций вследствие болезненных проявлений и признаков раннего токсикоза, плохое самочувствие, пониженное настроение, высокая тревожность, трудность к гибкому поведению в новых жизненных условиях и тенденция к использованию агрессивных способов реагирования. Для II триместра: наличие ощущений болезненного состояния, склонность к быстрой смене настроения, предпочтение уединения близким отношениям и неудовлетворенность качеством городской среды.

**Заключение.** Изучение взаимосвязи и установление наиболее важных факторов, влияющих на процессы нормального течения беременности, родов и состояние новорожденного, позволяет разрабатывать дополнительные критерии для формирования групп повышенного акушерского и перинатального риска и прогнозировать течение беременности. Разработана математическая модель прогнозирования течения гестационного процесса, учитывающая выявленные дополнительные критерии.

**Ключевые слова:** акушерский риск, психоэмоциональное состояние беременной, прогноз беременности, психологические факторы.

---

✉ Мурзина Елена Георгиевна, e-mail: Eleuskova@yandex.ru.



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

**Источник финансирования.** Исследование поддержано грантом РГНФ 15-06-10666а «Оценка влияния психоэмоционального состояния, уровня качества жизни и городской среды на физиологическое протекание беременности, родов у женщины и состояние новорожденного».

**Соответствие принципам этики.** Все участницы исследования подписывали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИАГП, Томский НИМЦ СО РАН (протокол № 4 от 18.09.2017).

**Для цитирования:** Агаркова Л.А., Бухарина И.Ю., Белова Н.Г., Ульянич А.А., Вершкова Е.М., Толмачев И.В., Мурзина Е.Г. Факторы риска и математическая модель осложненного течения беременности на основании интегративного анализа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 6–15. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-6-15>.

УДК 618.3-06-036-071

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-6-15>

## Risk factors and mathematical model of complicated pregnancy using integrative analysis

Agarkova L.A.<sup>1</sup>, Bukharina I.Yu.<sup>1</sup>, Belova N.G.<sup>1</sup>, Uliyanich A.L.<sup>2</sup>,  
Vershkhova E.M.<sup>3</sup>, Tolmachev I.V.<sup>1,4</sup>, Murzina E.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tomsk Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Perinatology (RIOGP)  
4, S. Lazo Str., Tomsk, 634039, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Tomsk State University (NR TSU)  
34a, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>3</sup> National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)  
30, Lenin Av., Tomsk, 634034, Russian Federation

<sup>4</sup> Siberian State Medical University (SSMU)  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

### ABSTRACT

**Objective:** To identify additional risk factors of complicated pregnancy and to develop a mathematical model for prognosing the course of gestation using integrative analysis.

**Materials and methods.** We carried out a prospective parallel group study of 240 women with low perinatal risk in the first and second trimesters of pregnancy. To study the psycho-emotional state and personality characteristics of pregnant women, we used the SF-36 questionnaire, Osgood's Semantic differential, G. Eysenck's self-assessment personality test and the Big five questionnaire proposed by R. McCrae and P. Costa. To assess the impact of the environment on pregnancy, a questionnaire "Degree of satisfaction with the urban environment" composed by Yu.Kataeva was used.

**Results.** We established additional criteria for predicting the course of gestation. In the first trimester they were restrictions of everyday functions due to painful manifestations and signs of early toxicosis, poor health, bad mood, high levels of anxiety, difficulty in being flexible in new life conditions and a tendency to react aggressively. In the second trimester they experienced painful conditions, mood swings, preferring seclusion to relationships and lack of satisfaction with the quality of the urban environment. During the interpretation of the study results we identified additional prognostic factors of the unfavorable course of pregnancy, which allow us to develop targeted programs for medical and psychological support during pregnancy.

**Conclusion.** We investigated the interrelations between the most important factors affecting the normal course of pregnancy, childbirth and the condition of the newborn. This study will allow us to predict the

course of pregnancy and elicit additional criteria to form groups with increased obstetric and perinatal risks. We also designed a mathematical model for prognosing the course of gestation that takes into account the identified additional criteria.

**Key words:** obstetric risk, psycho-emotional state of a pregnant woman, pregnancy prognosis, psychological factor.

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

**Source of financing.** The study was supported by the grant of the Russian Humanitarian Research Foundation 15-06-10666a "Assessing the impact of the psychoemotional state, the quality of life and the environment on the physiological course of pregnancy and labor and the condition of a newborn".

**Conformity with the principles of ethics.** All pregnant women that participated in the study signed an informed consent. The study was approved by the local ethics committee at Tomsk RIOGP (Protocol No. 4 of 18.09.2017).

**For citation:** Agarkova L.A., Bukharina I.Yu., Belova N.G., Uliyanich A.L., Vershkova E.M., Tolmachev I.V., Murzina E.G. Risk factors and mathematical model of complicated pregnancy using integrative analysis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 6–15. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-6-15>.

## ВВЕДЕНИЕ

Демографическая ситуация в России обуславливает необходимость проведения социологических, психологических и клинико-медицинских исследований причин низкой рождаемости, осложнений беременности, в частности угрозы ее прерывания [1, 2]. Вклад медицинских факторов в течение гестационного процесса и состояние новорожденного часто не являются определяющими в течении и исходе беременности, что диктует необходимость более детального изучения факторов риска осложненного течения беременности и родов в смежных областях [3, 4]. Большинство современных исследований посвящено изучению влияния психоэмоциональных и индивидуально-характерологических особенностей женщин на течение гестационного процесса [5–7]. Выявлено, что позитивное отношение к себе, отсутствие тревожности, высокая самооценка положительно влияют на течение беременности и минимизацию угрозы преждевременных родов. Выявлена закономерность между хроническим стрессом, психосоматическим состоянием и вероятностью недонашивания беременности [2, 8–12].

Мы предполагаем, что можно выделить три группы факторов, влияющих на нормальное течение беременности, на течение родов у женщины и состояние новорожденного ребенка: внутренние (психоэмоциональное состояние и личностные особенности женщины), мезофакторы (качество жизни женщины) и макрофакторы (качество го-

родской среды). Качество жизни в данном случае определяется как интегральная характеристика физического, психологического и социального функционирования человека, основанная на его субъективном восприятии, и сочетает в себе условия жизнеобеспечения и состояния здоровья, позволяющие достичь физического, психологического и социального благополучия и самореализации [5, 13]. Под качеством городской среды подразумевается оценка женщинами способности городской среды удовлетворять их потребности и запросы [5].

Таким образом, изучение взаимосвязи и установление наиболее важных факторов, влияющих на процессы нормального физиологического течения беременности, родов и состояния новорожденного, позволит прогнозировать течение беременности и разработать дополнительные критерии для формирования групп повышенного акушерского и перинатального риска.

Цель исследования: выявить дополнительные факторы риска осложненного течения беременности и разработать математическую модель прогнозирования течения гестационного процесса на основании комплексного подхода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено простое проспективное исследование в параллельных группах. Все беременные женщины были обследованы согласно приказу 572н МЗРФ от 01.11.2012 г., проведен расчет степени риска перинатальной патологии по шка-

ле В.Е. Радзинского, С.А. Князева, И.Н. Костина. На первом этапе проводилось исследование беременных в I триместре ( $n = 138$ ), вставших на учет в женскую консультацию. Критериями включения в исследование являлись: срок гестации 6–8 нед, низкая степень акушерского и перинатального риска, информированное согласие на участие в исследовании. На втором этапе обследованы беременные, вставшие на учет в женскую консультацию во II триместре беременности ( $n = 102$ ). Критериями включения в исследование являлись: срок гестации 12–14 нед, низкая степень акушерского и перинатального риска (менее 15 баллов), информированное согласие на участие в исследовании.

В течение I и II триместра беременности все женщины получали комплекс лечебно-диагностических мероприятий, соответствующих их соматическому и акушерскому статусу. В конце I триместра беременности на всей выборке женщин проведена переоценка факторов акушерского и перинатального риска, по результатам которой они были разделены на две группы. Первую группу ( $n = 78$ ) составили беременные женщины с состоянием, соответствующим низкой степени риска по шкале перинатальной патологии ( $10 \pm 2$  балла). Вторую группу ( $n = 60$ ) составили беременные женщины со средней степенью риска ( $16 \pm 2$  балла). В конце II триместра беременности при переоценке факторов акушерского и перинатального риска, беременные были также разделены на две группы. Первую группу ( $n = 55$ ) составили беременные женщины с состоянием, соответствующим низкой степени риска по шкале перинатальной патологии ( $11 \pm 2$  балла). Вторую группу ( $n = 47$ ) составили женщины средней степени риска ( $17 \pm 1$  балла). Далее, в случае если показатели состояния женщины соответствовали низкой степени риска (менее 15 баллов), ей предлагался комплекс психологических методик исследования и шкала удовлетворенности условиями окружающей среды.

Для исследования психоэмоционального состояния и личностных особенностей женщин I триместра беременности использовали опросник «Качество жизни» SF-36, Семантический дифференциал Ч. Осгуд, методику «Самооценка психических состояний» Г. Айзенка. Опросник «Качество жизни» SF-36 адаптирован Институтом клинко-фармакологических исследований (г. Санкт-Петербург) и представлен шкалами: «Физическое функционирование», «Роль в функционировании, обусловленное физическим состоянием», «Интенсивность боли» и «Об-

щее состояние здоровья», «Психическое здоровье», «Роль в функционировании, обусловленное эмоциональным состоянием», «Социальное функционирование» и «Жизненная активность».

Показатели каждой шкалы варьируются между 0 и 100 баллами. Оценка выше 60 баллов указывает на высокий уровень качества жизни, менее 30 баллов соответствует низкому уровню, 30–60 баллов определяют как среднее значение. Методика Г. Айзенка «Самооценка психических состояний» позволяет изучить уровень выраженности психических состояний через содержание шкал «Тревожность», «Агрессивность», «Фрустрация» и «Ригидность». Для каждого психического состояния определены уровневые показатели: 0–7 баллов – низкий уровень, 8–14 – допустимый, 15–20 баллов – высокий. Методика «Семантический дифференциал» Ч. Осгуд служит для построения субъективных семантических пространств, относится к методам шкалирования с целью получения количественных, а также качественных показателей для оценки отношения к определенным объектам: «Я сама», «Моя беременность», «Мой ребенок», «Мое будущее» с помощью показателей «активность», «сила», «оценка». Макрофакторы (качество городской среды) изучались с помощью анкеты изучения степени удовлетворенности городской средой Ю.В. Катаевой. Оценка осуществлялась в баллах от 1 до 5, которые показывают степень удовлетворенности инфраструктурой и экологическим состоянием района.

Беременным женщинам, вставшим на учет во II триместре беременности, кроме вышеперечисленных методик был предложен Пятифакторный личностный опросник (Big five) Р. МакКрае и П. Коста, который позволяет оценить степень выраженности каждого из исследуемых пяти факторов (экстраверсия – интроверсия; привязанность – обособленность; самоконтроль – импульсивность; эмоциональная неустойчивость – эмоциональная устойчивость; экспрессивность – практичность).

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с помощью методов описательной статистики, частотного анализа, в качестве критерия достоверности различий использовался Хи-квадрат Пирсона. При построении решающих правил использовали логистическую регрессию. Статистическую обработку данных производили с использованием пакета стандартных международных прикладных программ Statistica for Windows (V. 6.0). Разницу сравниваемых показателей считали достоверной при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура показателей по исследованию беременных женщин в I триместре беременности распределилась следующим образом. Демографические показатели: возраст 19–25 лет – 33% беременных, 26–33 лет – 48, 34–43 года – 19%. Зарегистрированный брак имел место в 57% случаев, гражданский – в 43. Большинство беременных имели высшее образование (58%), остальные – средне-специальное и среднее (28 и 14% соответственно). Статистически достоверных различий между сравниваемыми группами по данным показателям не выявлено. В акушерском статусе имели место достоверные различия по двум факторам. Так, у женщин второй группы (со средней степенью риска) достоверно чаще в анамнезе встречались два и более медицинских аборт, беременность чаще протекала с симптомами раннего токсикоза.

При исследовании беременных во II триместре демографические показатели выборки исследования распределились следующим образом: возраст 19–25 лет – 32%, 26–33 лет – 49, 34–43 года – 19% беременных. Зарегистрированный брак имел место в 51% случаев, гражданский – в 49. Большинство беременных имели высшее образование (52%), остальные – средне-специальное и среднее (27 и 21% соответственно). На первом этапе исследования были установлены особенности психоэмоционального состояния и личностных характеристик у беременных женщин I триместра в каждой из выделенных групп. Выявлено, что большинство женщин обеих групп находились в благоприятном психоэмоциональном состоянии: для них характерно положительное отношение к себе, своей беременности, своему ребенку и своему будущему. Выявленные достоверные различия говорят о том, что беременные первой группы больше ощущали и воспринимали активность собственного ребенка и старались регулировать собственное поведение для того, чтобы ему было более комфортно. Они в большей степени готовы к восприятию проявлений своего развивающегося ребенка, формированию его самостоятельной ценности и протраиванию благоприятной временной перспективы будущего.

Анализ результатов описательной статистики и достоверных различий показателей, полученных по шкалам методики «Качество жизни», свидетельствует о том, что большинство женщин первой и второй группы во время I триместра беременности по основным характеристикам схожи между собой. Они характеризуются положительной оценкой ресурсов своего здоровья,

готовностью к преодолению болезненных симптомов, связанных с беременностью, высоким уровнем жизненной энергии и активной реализацией социальных ролей.

При оценке степени удовлетворенности состоянием окружающей среды установлено, что большинство женщин I триместра «плохо» оценивают экологическую обстановку города (61 из 100% возможных), «хорошо» – инфраструктуру городской среды для беременных (46 из 100% возможных) и «плохо» – инфраструктуру городской среды для молодых мам с детьми (39 из 100% возможных).

На следующем этапе были установлены особенности психоэмоционального состояния и личностных характеристик у беременных женщин II триместра в каждой из выделенных групп. Отмечено, что большинство женщин первой и второй группы II триместра беременности также по основным критериям сопоставимы между собой: для них характерен повышенный фон настроения, сниженный уровень тревоги. Они более уверены в себе и готовы видеть разнообразные способы решения возможных трудностей, позитивно оценивают свое будущее и ощущают силу проявлений ребенка и его активность.

Качество жизни женщин во II триместре беременности определяется следующими характеристиками: большинство женщин в большей степени чувствуют свою внутреннюю энергию, жизненную силу и активность, чем женщины в начале беременности. Для большинства беременных характерно благополучное эмоциональное состояние, высокий уровень жизненной активности, отсутствие ограничений в выполнении ежедневных физических нагрузок (самообслуживание, ходьба, подъем по лестнице и т.п.) и реализации ролевой деятельности. Также установлено, что большинство женщин данной группы общительны, склонны иметь большой круг знакомых, при этом сдержанны, уверены в себе, обладают ровным фоном настроения, в действиях ориентируются на внутренние опоры, склонны ощущать потребность к формированию близких эмоциональных контактов, при этом достаточно самостоятельны и склонны отдавать собственным потребностям и интересам приоритетное значение. Женщины второй группы в большей степени склонны к педантичности, в отличие от женщин первой группы, они крайне исполнительны, ответственные, стремятся к идеалу, на который готовы потратить много собственных ресурсов.

Выявлено разное качество оценки экологической обстановкой у женщин на II триместре



беременности первой и второй групп. Женщины первой группы в большей степени удовлетворены экологической обстановкой города (52 из 100% возможных), чем женщины второй группы, большинство из которых ставят «плохую» оценку (59 из 100% возможных). Инфраструктуру для беременных и молодых мам с детьми большинство

женщин с нормальным и осложненным течением беременности II триместра оценивают как «хорошую».

На следующем этапе исследования были разработаны математические модели прогнозирования течения беременности для женщин I и II триместров беременности (табл. 1–4).

Таблица 1

Table 1

Структура математической модели прогноза течения беременности для I триместра The structure of the mathematical model for prognosing the course of pregnancy in the first trimester		
Индекс признака Index of the criterion	Название признака Name of the criterion	Значение весового коэффициента признака Weight coefficient of the criterion
C	Свободное слагаемое Free summand	0
A1	Физическое функционирование Physical functioning	0,021
A2	Интенсивность боли Pain intensity	–0,24
A3	Психическое здоровье Mental health	0,24
A4	Ценность ребенка Importance of a child	0,242
A5	Тревожность Anxiety	–0,127
B1	Наличие раннего токсикоза беременных Early toxycosis	«Нет» – 1,009 “No” – 1.009
		«Есть» – 0 “Yes” – 0
B2	Оценка экологии городской среды Assessment of the ecology in the urban environment	«Отличная» – 4,151 “Excellent” – 4.151
		«Очень хорошая» – 21,142 “Very good” – 21.142
		«Хорошая» – 19,818 “Good” – 19.818
		«Посредственная» – 18,814 “Ordinary” – 18.814
B3	Отягощенный акушерский анамнез Complicated past obstetric history	«Нет» – 0,317 “No” – 0.317
		«Есть» – 0 “Yes” – 0

Таблица 2

Table 2

Качество классификации для первого I триместра беременности Quality of the classification for the first trimester of pregnancy			
Характеристика Criterion	Предсказанные значения Predicted values		
	1,0	2,0	Корректное предсказание, % Correct prediction, %
1.0 Специфичность Specificity	32	4	88,9
2.0 Чувствительность Sensitivity	7	12	63,2
Доля правильной классификации, % Share of correct classification, %	70,9	29,1	80,0

Таблица 3  
Table 3

Структура математической модели прогноза течения беременности для II триместра беременности The structure of the mathematical model for prognosing the course of pregnancy in the second trimester		
Индекс признака Index of the criterion	Название признака Name of the criterion	Значение весового коэффициента признака Weight coefficient of the criterion
C	Свободное слагаемое Free summand	-1,010
A1	Психическое здоровье Mental health	0,111
A2	Интенсивность боли Pain intensity	-0,014
A3	Эмоциональная неустойчивость – эмоциональная устойчивость Mood swings – emotional stability	0,287
A4	Привязанность – обособленность Bonding – isolation	-0,309
B1	Оценка экологии городской среды Assessment of the ecology in the urban environment	«Отличная» – 24,339 “Excellent” – 24.339
		«Очень хорошая» – 5,062 “Very good” – 5.062
		«Хорошая» – 4,568 “Good” – 4.568
		«Посредственная» – 5,605 “Ordinary” – 5.605

Таблица 4  
Table 4

Качество классификации для II триместра беременности Quality of classification for the second trimester of pregnancy			
Характеристика Criterion	Предсказанные значения Predicted values		
	1.0	2.0	Корректное предсказание, % Correct prediction, %
1,0 Специфичность 1.0 Specificity	15	6	71,4
2,0 Чувствительность 2.0 Sensitivity	5	24	82,8
Доля правильной классификации, % Share of correct classification, %	40,0	60,0	78,0

На основании статистической обработки полученных результатов дополнительного исследования были выявлены факторы, имеющие статистически достоверные различия в сравниваемых группах низкого и среднего акушерского и перинатального риска женщин I триместра беременности. Для построения решающих правил в качестве независимых переменных были выбраны наиболее часто регистрируемые признаки в I триместре беременности: отягощенный акушерский анамнез, ранний токсикоз, высокая тревожность, низкая ценность ребенка, высокая интенсивность боли, средний уровень показателей психического здоровья, все параметры удовлетворенности

экологией городской среды и инфраструктуры района. Параметры «Тревожность», «Ценность ребенка» («Мой ребенок» по шкале «Оценка»), «Интенсивность боли», «Психическое здоровье», «Физическое функционирование» вычисляются в баллах согласно соответствующим опросникам. Наличие или отсутствие качественных признаков «Отягощенный акушерский анамнез», «Ранний токсикоз», «Удовлетворенность экологией городской среды» присваивают числовое значение коэффициента регрессии.

Для построения решающих правил в качестве независимых переменных для II триместра беременности были выбраны наиболее часто ре-

гистрируемые признаки: средний уровень показателей психического здоровья, высокая интенсивность боли, эмоциональная неустойчивость (эмоциональная устойчивость), привязанность (обособленность), все параметры удовлетворенности экологией городской среды и инфраструктуры района. Для определения переменных логистической регрессии использовался алгоритм последовательного включения параметров, в качестве критерия оптимальности был выбрано количество (%) правильного распознавания объектов для обучающей выборки. С целью прогнозирования осложненного течения беременности рассчитывали значение дискриминантной функции  $f$

$$f(x) = \sum A_j * x_j + \sum B_j + C \quad (1),$$

где  $A_j$  – суммарное значение количественного весового признака в баллах,  $x_j$  – числовое значение коэффициента регрессии количественного весового признака,  $B_j$  – числовое значение коэффициента регрессии качественного весового признака. Для I триместра: при  $i = [1; 5]$  и  $j = [1; 3]$ . Для II триместра: при  $i = [1; 4]$  и  $j = 1$ .

Затем определяли значение вероятности  $P$  по формуле:  $P = e^f / (1 + e^f)$ , где  $e$  – математическая константа, равная 2,72. При подстановке вычисленного значения  $f = f(x)$  (из формулы 1) в формулу находится  $P$ . Вероятность развития осложненного течения гестационного процесса оценивали следующим образом: при значении  $p < 0,5$  определяли высокую, а при  $p > 0,5$  или  $p = 0,5$  – низкую вероятность осложненного течения беременности.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанная математическая модель позволяет с высокой степенью вероятности прогнозировать течение беременности в период I триместра по оценке выстроенных показателей. Для I триместра показатель специфичности равен 88,9%, чувствительности – 63,2%. Таким образом, беременные женщины с хорошим физическим состоянием, отсутствием болезненных проявлений, низкой тревожностью, готовые пренебречь порядком ради удовольствия, с высоким уровнем удовлетворенности качеством городской среды, отсутствием абортотоксикоза в анамнезе с высокой долей вероятности будут иметь более спокойное физиологическое течение беременности в I триместре.

Беременные женщины, ощущающие болезненные состояния, отмечающие у себя наличие тревожных и депрессивных расстройств, с большим стремлением к порядку, скрупулезностью,

склонностью к сомнениям и частым самопроверкам, не удовлетворенные качеством городской среды и имеющие в анамнезе больше трех абортотоксикозов, с большей степенью вероятности будут иметь осложнения. Для II триместра показатель специфичности равен 71,4%, чувствительности – 82,8%. Таким образом, беременные женщины с удовлетворительным психическим состоянием, отсутствием болезненных проявлений, эмоционально устойчивые и удовлетворенные качеством городской среды с высокой долей вероятности будут иметь более спокойное физиологическое течение беременности во II триместре. Беременные женщины, ощущающие болезненные состояния, склонные к быстрой смене настроения и неудовлетворенные качеством городской среды, в период II триместра беременности с большей степенью вероятности будут иметь осложнения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в I триместре беременности дополнительными факторами риска осложненного течения беременности являются наличие ограничений в выполнении повседневных ролевых функций вследствие болезненных проявлений и признаков раннего токсикоза, плохое самочувствие, пониженное настроение, высокая тревожность, трудность к гибкому поведению в новых жизненных условиях и тенденция к использованию агрессивных способов реагирования. Во II триместре – наличие ощущений болезненного состояния, склонность к быстрой смене настроения, предпочтение уединения близким отношениям и неудовлетворенность качеством городской среды. Обосновано, что раннее выявление прогностических факторов неблагоприятного течения беременности позволит разработать целенаправленные программы медико-психологического сопровождения процесса вынашивания беременности. Реализация данных программ будет способствовать профилактике развития патологии беременности, решению важной демографической задачи, а также снижению экономических затрат на этапе клинического лечения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Горина Е.А., Бурдяк А.Я. Взгляд на качество жизни населения сквозь призму городской среды. *Социология города*. 2015; 2: 11–31. [Gorina E.A., Burdjak A.Ja. A glance at the quality of life of the population through the prism of the urban environment. *Sociology of City*. 2015; 2: 11–31 (in Russ.)].
2. Филиппова Г.Г. Нарушение репродуктивной функции и ее связь с нарушениями в формировании материн-

- ской сферы. *Перинатальная психология и психология родительства*. 2003; 4–5: 145–149. [Filippova G.G. Reproductive dysfunction and its association with disorders in the formation of the maternal sphere. *Perinatal Psychology and Psychology of Parenthood*. 2003; 4–5: 145–149 (in Russ.)]. DOI: 10.18565/aig.2017.10.78–83.
3. Gul B., Riaz M.A., Batool N., Yasmin H., Riaz M.N. Social support and health related quality of life among pregnant women. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 2018; 68 (6): 872–875.
  4. Tan A., Lowe S., Henry A. Nausea and vomiting of pregnancy: Effects on quality of life and day-to-day function. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2018; 58 (3): 278–290. DOI: 10.1111/ajog.12714.
  5. Панкратов В.В., Ягудаева И.П., Давыдов А.И. Качество жизни, связанное со здоровьем: терминология, методология, особенности оценки в акушерско-гинекологической практике. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2012; 11 (2): 22–33. [Pankratov V.V., Yagudaeva I.P., Davydov A.I. Health-related quality of life: terminology, methods, specificities of evaluation in obstetric and gynecological practice. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology Journal*. 2012; 11 (2): 22–33 (in Russ.)].
  6. Saadati F., Sehhatiei Shafaei F., Mirghafourvand M. Sleep quality and its relationship with quality of life among high-risk pregnant women (gestational diabetes and hypertension). *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2018; 31 (2): 150–157. DOI: 10.1080/14767058.2016.1277704.
  7. Maharlouei Najm. The importance of social support during pregnancy. *Women's Health Bulletin*. 2016; 3 (1): e34991. DOI: 10.17795/whb-34991.
  8. Амвросова М.А., Кондратенко Е.А., Ожигина С.Н., Тетерина Е.В. Влияние беременности на психоэмоциональное состояние женщины. *Научно-методический электронный журнал «Концепт»*. 2017; 2: 257–261. [Amvrosova M.A., Kondratenko E.A., Ozhigina S.N., Teterina E.V. Action of pregnancy on the psychoemotional state of a woman. *Scientific and Methodical Electronic Journal "Concept"*. 2017; 2: 257–261 (in Russ.)]. URL: <http://e-koncept.ru/2017/570053.htm>.
  9. Гацаева Л.Т., Торчинов А.М., Филиппова Г.Г., Цахилова С.Г. Особенности течения беременности, родов и послеродового периода у женщин на фоне смешанных тревожных и депрессивных расстройств в условиях социально-экономической нестабильности. *Репродуктивное здоровье детей и подростков*. 2011; 3: 66–73. [Gatsaeva L.T., Torchinov A.M., Filippova G.G., Tsahilova S.G. Pregnancy, labor and postpartum course peculiarities in women with anxiety and depressive disorders in the conditions of social and economic insecurity. *Pediatric and Adolescent Reproductive Health*. 2011; 3: 66–73 (in Russ.)].
  10. Козлова Н.С., Панов В.А. Изучение специфики состояния беременности при помощи факторного анализа. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2016; 5–4: 124–128. [Kozlova N.S., Panov V.A. A study of the specificity of the state of pregnancy using factor analysis. *Actual Problems of the Humanities and Natural Sciences*. 2016; 5–4: 124–128 (in Russ.)].
  11. Фекличева И.В., Чипеева Н.А., Воронина И.Д., Солдатова Е.А., Масленникова Е.П., Шабаловская М.В., Агаркова Л.А., Малых С.Б., Ковас Ю.В. Взаимосвязь между отношением к будущему ребенку и отношениями между родителями в семьях со спонтанной и индуцированной беременностью. *Акушерство и гинекология*. 2017; 10: 78–83. [Feklicheva I.V., Chipeeva N.A., Voronina I.D., Soldatova E.L., Maslennikova E.P., Shabalovskaja M.V., Agarkova L.A., Malykh S.B., Kovas Ju.V. Correlation between the attitude to the future child and the relations between parents in families with spontaneous and induced pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 2017; 10: 78–83 (in Russ.)].
  12. Salazar-Pousada D., Astudillo C., Gonzaga M., Hidalgo L., Pírez-Lypez F.R., Chedraui P. Intimate partner violence and psychoemotional disturbance among pregnant women admitted to hospital with prenatal complications. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*. 2012; Sept. 118 (3): 194–197. DOI: 10.1016/j.ijgo.2012.03.043. Epub 2012 June 22. PMID: 22727412.
  13. Calou C.G. et al. Maternal predictors related to quality of life in pregnant women in the Northeast of Brazil. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2018; 16: 109. DOI: 10.1186/s12955-018-0917-8.

## Вклад авторов

Агаркова Л.А., Белова Н.Г. – разработка концепции и дизайна исследования. Бухарина И.Ю., Ульянич А.А., Вершкова Е.М. – сбор и обработка материала. Толмачев И.В. – статистическая обработка. Мурзина Е.Г. – написание текста. Агаркова Л.А., Белова Н.Г., Бухарина И.Ю., Ульянич А.А., Толмачев И.Н. – редактирование статьи.

## Authors contribution

Agarkova L.A., Belova N.G. – conception and design of the study. Bukharina I.Yu., Ulianich A.L., Vershkovva E.M. – collection and processing of the material. Tolmachev I.V. – statistical processing. Murzina E.G. – drafting of the manuscript. Agarkova L.A., Belova N.G., Bukharina I.Yu., Ulianich A.L., Tolmachev I.V. – editing of the manuscript.



## Сведения об авторах

**Агаркова Любовь Аглямовна**, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, руководитель отдела перинатологии, НИИАГП, Томский НИМЦ СО РАН, г. Томск.

**Бухарина Ирина Юрьевна**, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, ученый секретарь, НИИАГП, Томский НИМЦ РАН, г. Томск.

**Белова Наталия Геннадьевна**, канд. мед. наук, директор НИИАГП, Томский НИМЦ СО РАН, г. Томск.

**Ульянич Анна Леонидовна**, канд. психол. наук, доцент, кафедра психотерапии и психологического консультирования, НИ ТГУ, г. Томск.

**Вершкова Елена Михайловна**, ассистент, кафедра экономики и природных ресурсов, НИ ТПУ, г. Томск.

**Толмачев Иван Владиславович**, канд. мед. наук, доцент, кафедра медицинской и биологической кибернетики с курсом медицинской информатики, СибГМУ; науч. сотрудник, НИИАГП, Томский НИМЦ РАН, г. Томск.

**Мурзина Елена Георгиевна**, врач акушер-гинеколог женской консультации, Родильный дом № 4, г. Томск.

(✉) **Мурзина Елена Георгиевна**, e-mail: Eleuskova@yandex.ru.

Поступила в редакцию 08.01.2018

Подписана в печать 14.12.2018

## Authors information

**Agarkova Liubov A.**, DM, Professor, Chief Researcher, Head of the Perinatology Department, Tomsk Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Perinatology (RIOGP), Tomsk, Russian Federation.

**Bukharina Irina Yu.**, PhD, Scientific Secretary, Tomsk Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Perinatology (RIOGP), Tomsk, Russian Federation.

**Belova Natalia G.**, PhD, Director, Tomsk Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Perinatology (RIOGP), Tomsk, Russian Federation.

**Uliyanich Anna L.**, PhD, Associate Professor, Department of Psychotherapy and Psychological Counseling, NR TSU, Tomsk, Russian Federation.

**Vershkova Elena M.**, Assistant, Department of Economics and Natural Resources, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

**Tolmachev Ivan V.**, PhD, Associate Professor, Department of Medical and Biological Cybernetics, SSMU; Researcher, Tomsk, Russian Federation. Federal State Budgetary Scientific Institution "Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences"

**Murzina Elena G.**, Obstetrician-gynecologist, Maternity Hospital № 4, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Murzina Elena G.**, e-mail: Eleuskova@yandex.ru.

Received 08.01.2018

Accepted 14.12.2018

## Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными показателями овариальной функции

Андреева Е.А.<sup>1</sup>, Хонина Н.А.<sup>1,2</sup>, Демченко Е.Н.<sup>1</sup>, Гаврилова Е.Д.<sup>1</sup>,  
Пасман Н.М.<sup>2</sup>, Козлов В.А.<sup>1</sup>, Черных Е.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)  
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (НГУ)  
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

### РЕЗЮМЕ

**Целью** работы явились исследование свободной ДНК (свДНК) в фолликулярной жидкости (ФЖ) женщин, проходящих лечение по программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), и анализ взаимосвязи уровня свДНК с различными клиническими параметрами, а также показателями овариального резерва, фолликуло- и оогенеза.

**Материалы и методы.** В исследование были отобраны 53 женщины, у 49 из которых ооциты получали при стимуляции овуляции гонадотропинами, у 4 – в естественном цикле. Концентрация свободной ДНК оценивалась флуориметрическим методом с использованием прибора QuantiFluor™ Handheld Fluorometers (BioSilica, Россия).

**Результаты.** Образцы ФЖ содержали детектируемые концентрации свДНК, уровень которой у женщин со стимулированной овуляцией был значимо выше, чем у женщин в естественном цикле. Различий в содержании свДНК у женщин с бесплодием и доноров ооцитов не отмечалось. В то же время у женщин с более длительным периодом бесплодия (>5 лет) концентрация свДНК была выше, чем в оппозитной группе. Женщины с повышенным уровнем антимюллерового гормона, характеризовались более высоким содержанием свДНК, при этом между уровнем антимюллерового гормона и концентрацией свДНК выявлялась умеренная, но достоверная корреляционная зависимость. Наиболее высокое содержание свДНК выявлялось также в группе женщин с более высоким количеством овуляторных фолликулов. В то же время концентрация свДНК не коррелировала с количеством ооцитов.

**Заключение.** Уровень свДНК в ФЖ женщин может рассматриваться как дополнительный критерий эффективности ответа яичников на стимуляцию овуляции.

**Ключевые слова:** свободная ДНК, фолликулярная жидкость, экстракорпоральное оплодотворение, овариальный резерв, бесплодие.

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

**Источники финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

**Соответствие принципам этики.** Все участницы исследования подписывали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ.

**Для цитирования:** Андреева Е.А., Хонина Н.А., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Пасман Н.М., Козлов В.А., Черных Е.Р. Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными показателями овариальной функции. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 16–23. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-16-23>.

УДК 618.11-008.6:612.621:577.218

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-16-23>

## Cell-free DNA in follicular fluid of women with different parameters of ovarian function

Andreeva E.A.<sup>1</sup>, Khonina N.A.<sup>1,2</sup>, Demchenko E.N.<sup>1</sup>, Gavrilova E.D.<sup>1</sup>,  
Pasman N.M.<sup>2</sup>, Kozlov V.A.<sup>1</sup>, Chernykh E.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)  
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

<sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University (NSU)  
2, Pirovog Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

### ABSTRACT

**The aim of the study** was to evaluate cell-free DNA (cfDNA) in the follicular fluid (FF) of women undergoing IVF treatment and to analyze the relationship between cfDNA levels and the parameters of folliculogenesis and oogenesis as well as the quality of embryos.

**Materials and methods.** The study included 53 women aged 20 to 45 years. In 49 patients, oocytes were obtained by stimulating ovulation with gonadotropins, and 4 patients underwent natural cycle IVF without hormonal stimulation. Measurement of cfDNA was carried out by fluorimetry using QuantiFluor™ Handheld Fluorometers (BioSilica, Russian Federation).

**Results.** The FF of women with ovulation stimulation revealed a higher level of cfDNA as opposed to FF of women in the natural cycle. There were no differences in the cfDNA levels in women with infertility and oocyte donors. Women with infertility lasting for more than 5 years had a higher level of cfDNA. Women with the elevated anti-Müllerian hormone (AMH) levels were characterized by the high FF cfDNA concentration and a large number of follicles. Likewise, correlation analysis showed that FF cfDNA was significantly and positively correlated with the AMH level. The obtained data revealed the participation of cfDNA in different stages of oogenesis.

**Conclusions.** The level of FF cfDNA in women may serve as an additional biomarker of the effectiveness of ovulation induction.

**Key words:** cell free DNA, follicular fluid, IVF, ovarian reserve, infertility.

**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 women who were included in the study signed an informed consent. The study was approved by the local ethics committee RIFCI.

**For citation:** Andreeva E.A., Khonina N.A., Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Pasman N.M., Kozlov V.A., Chernykh E.R. Cell-free dna in follicular fluid of women with different parameters of ovarian function. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 16–23. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-16-23>.

## ВВЕДЕНИЕ

Среди различных биомаркеров патологических процессов свободная внеклеточная ДНК (свДНК) в последнее время привлекает большое внимание [1]. Несвязанная с клетками ДНК является в различных биологических жидкостях организма [2–4], ее концентрация возрастает при

целом ряде заболеваний (онкологические, ауто-иммунные, посттравматический синдром) [5–9], включая акушерско-гинекологическую патологию [10], что обуславливает интерес к исследованию диагностической и прогностической значимости свДНК [11–14].

Наличие свДНК в фолликулярной жидкости (ФЖ) связано с апоптозом и некрозом клеток,

окужающих растущий ооцит по мере интенсивного роста фолликула [15]. В этом аспекте концентрация свДНК в ФЖ может являться дополнительным показателем влияния стимуляции гонадотропинами на процесс фолликулогенеза и оогенеза. Оценка овариального резерва женщины является обязательным условием для подбора оптимального протокола стимуляции овуляции в программе вспомогательных репродуктивных технологий. Для этого перед вступлением в программу экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у женщины определяют уровень антимюллерового гормона (АМГ) и число антральных фолликулов (АФ) [16–18]. Однако определение этих показателей не во всех случаях позволяет правильно подобрать оптимальную дозу гонадотропинов для стимуляции овуляции, что чревато развитием опасного синдрома гиперстимуляции яичников. Поэтому уровень свДНК в ФЖ может представлять интерес в качестве дополнительного маркера эффективности ответа яичников на стимуляцию. Еще одним важным параметром, определяющим успешное развитие эмбриона и наступления беременности, является качество ооцитов, во многом определяющее исходы ЭКО. Однако значение свДНК как показателя овариального резерва и биомаркера эффективности стимуляции овуляции остается недостаточно исследованным. Таким образом, целью работы явились оценка уровня свДНК в образцах ФЖ жен-

щин, находящихся в программе ЭКО, и анализ взаимосвязи свДНК с клиническими параметрами и показателями овариальной функции, фолликуло- и оогенеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 53 женщины, из них 49 проводили стимуляцию овуляции гонадотропинами, четырем пациенткам процедуру ЭКО осуществляли в естественном цикле. Отдельную группу составили 5 фертильных женщин – доноры ооцитов, у которых для стимуляции овуляции также использовали гонадотропины. Забор материала осуществляли на базе ООО «Клиника профессора Пасман» (г. Новосибирск), последующая обработка ФЖ и исследование содержания свДНК в ФЖ проводили в лаборатории НИИФКИ (г. Новосибирск). Возраст женщин с бесплодием варьировал от 20 до 45 лет (медиана 33,2), из них женщины раннего репродуктивного возраста (<35 лет) составили 56,6%, позднего (≥35 лет) – 43,4%; длительность бесплодия – от 1 года до 18 лет (медиана 7,1). Первичное бесплодие было диагностировано у 52% женщин, вторичное – у 48 (таблица). Причиной бесплодия в 13% случаев был мужской фактор, в 87% случаев – женское бесплодие. Причиной женского бесплодия в 45% случаев являлся трубно-перитонеальный фактор, 5% – эндокринный фактор, 50% – сочетанное бесплодие.

Таблица  
Table

Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными клиническими параметрами, нг/мл Cell free DNA in the follicular fluid in women with different clinical parameters, ng/ml				
Параметр Parameter	Кол-во, % Number, %	$Me (LQ-UQ)$	$Min-Max$	$p_u$ $p_u$
Бесплодие: Infertility:				
– мужское (a) – male (a)	13	40,9 (29,3–45,2)	20,9–47,6	–
– женское (b) – female (b)	87	39,2 (31,1–52,2)	19,8–65,9	$p_{ab} = 0,6$
Трубно-перитонеальный фактор (c) Tubal and peritoneal factor (c)	45	39,7 (31,6–50,7)	19,9–65,9	$p_{ac} = 0,6$
Эндокринный фактор (d) Endocrine factor (d)	5	35,5 (31,1–40,0)	31,0–40,2	$p_{ad} = 0,8$
Сочетанное бесплодие (e) Concomitant infertility (e)	50	36,7 (26,9–53,1)	19,8–60,9	$p_{ac} = 0,8$
Бесплодие: Infertility:				0,95
– первичное (a) – primary (a)	52	40,0 (19,8–60,9)	29,3–52,2	–
– вторичное (b) – secondary (b)	48	41,1 (19,9–65,9)	33,8–50,9	–



Окончание табл.  
End of table

Параметр Parameter	Кол-во, % Number, %	$Me (LQ-UQ)$	$Min-Max$	$p_u$ $p_u$
Женщины с бесплодием ( $n = 44$ ) Women with infertility ( $n = 44$ )	90	40,3 (30,7 ± 50,8)	19,8–65,9	0,44
Доноры ооцитов ( $n = 5$ ) Oocyte donors ( $n = 5$ )	10	43,8 (33,9–53,6)	32,8–57,9	–

\* $p$  – достоверность различий по  $U$ -критерию Манна – Уитни.\* $p$  – statistical significance of the differences using Mann – Whitney test.

Гормональный статус определяли на 2–3-й день менструального цикла у каждой пациентки. Средний уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона и простагландина Е2 в указанные сроки составлял, соответственно,  $8,4 \pm 4,7$  МЕ/л;  $6,2 \pm 5,6$  МЕ/л и  $178 \pm 175,2$  пмоль/л. Процедура ЭКО (инсеминация *in vitro*) была проведена у 47% женщин, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI, ИКСИ) – у 53%. Выбор протокола стимуляции опирался на анамнез и овариальный резерв женщины: 44 из них стимулировали по протоколу антагонистов (короткий протокол), 5 женщин – по протоколу агонистов ГнРг (длинный протокол). Стимуляция яичников проводилась препаратами рекомбинантного или менопаузального ФСГ. Ответ яичников на стимуляцию контролировали путем ультразвуковой оценки роста фолликулов и эндометрия.

Третью группу составили 4 женщины в естественном цикле без введения препаратов ФСГ. Стимуляция овуляции у всех пациенток индуцировалась инъекцией 250 мкг человеческого хорионического гонадотропина, когда один доминирующий фолликул (естественный цикл) или три и более фолликула (стимулированный цикл) достигали диаметра 18 мм при ультразвуковом исследовании. Через 36 ч с момента введения триггера овуляции проводили извлечение ооцитов с помощью трансвагинальной ультразвуковой аспирации. В этот момент осуществлялся сбор образцов ФЖ из доминантных фолликулов. В случае видимой контаминации образцов ФЖ кровью исследование не проводили. Образцы ФЖ центрифугировали при 2 000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость собирали, замораживали и хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$ . Концентрацию ДНК оценивали флуориметрическим методом с использованием прибора QuantiFluor™ Handheld Fluorometers и коммерческих наборов Blood DNA Isolation Kit фирмы BioSilica Ltd. (г. Новосибирск) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали критерий Манна – Уитни ( $U$ ) для непарных выборок. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмана ( $r$ ). Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона  $Me (LQ-UQ)$ , минимальных и максимальных значений  $Min-Max$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования выявили наличие в ФЖ женщин со стимуляцией овуляции наличие свДНК, уровень которой варьировал в пределах 19,8–65,9 нг/мл (медиана  $Me$  40,3 нг/мл). Характерно, что образцы ФЖ, полученные в естественном цикле (без введения гонадотропинов), содержали достоверно меньшие концентрации свДНК, чем ФЖ женщин со стимулированной овуляцией (26,8 vs 40,3 нг/мл;  $p_u = 0,03$ ) (рис. 1, а). То есть стимуляция овуляции ассоциировалась с более высоким содержанием в ФЖ свДНК, чем овуляция в естественном цикле. При этом в циклах стимулированной овуляции женщины с бесплодием не отличались по уровню свДНК от женщин-доноров ооцитов (40,3 vs 43,8 нг/мл;  $p_u = 0,44$ ), на основании чего эти группы были объединены при последующем анализе.

Учитывая исходную клиническую гетерогенность исследуемой группы, первоначально было проанализировано, влияют ли такие факторы, как возраст, длительность бесплодия, а также форма и причина бесплодия на уровень свДНК. Анализ образцов ФЖ женщин раннего (<35 лет) и позднего ( $\geq 35$  лет) репродуктивного возраста не выявил достоверных различий в уровне свДНК (рис. 1, б). В то же время умеренно выраженные, но статистически достоверные различия в концентрации свДНК были выявлены в группах с различной продолжительностью бесплодия. Так, в ФЖ женщин с бесплодием более 5 лет уровень свДНК был выше, чем в группе с длительностью

бесплодия  $\leq 5$  лет (36,6 vs 40,9 нг/мл;  $p_u = 0,03$ ) (рис. 1, с). Уровень свДНК в группах женщин с первичным и вторичным бесплодием (40,0 vs 41,1 нг/мл), мужским и женским факторами бесплодия (40,9 vs 39,2 нг/мл), а также с различными факторами женского бесплодия (трубно-перитонеальным, эндокринным, сочетанным) значимо не различались (см. таблицу). Учитывая отсутствие сопряженности свДНК с большинством клинических параметров, изучение взаимосвязи между количеством свДНК и параметрами, характеризующими фолликуло- и оогенез, проводилось в общей группе пациенток.

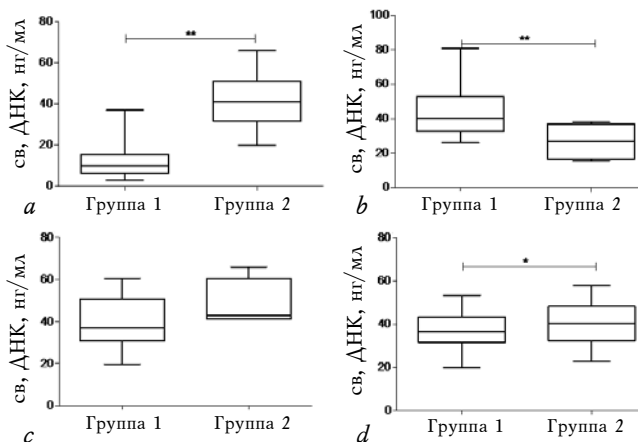


Рис. 1. Уровень свДНК в фолликулярной жидкости у бесплодных женщин с различными клиническими параметрами: а – в стимулированном (группа 1) и естественном (группа 2) циклах; б – в возрастных группах  $<35$  лет (группа 1) и  $\geq 35$  лет (группа 2); в – в группах с продолжительностью бесплодия  $\leq 5$  лет (группа 1) и  $> 5$  лет (группа 2). Здесь и в рис. 2: данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона ( $LQ-UQ$ ),  $Min-Max$ . \*  $p_u < 0,05$ ; \*\*  $p_u < 0,01$  (критерий Манна – Уитни)

Fig. 1. The level of cfDNA in follicular fluid in women with different clinical parameters: а – in stimulated (group 1) and natural (group 2) cycles; б – in the age groups  $<35$  years (group 1) and  $\geq 35$  years (group 2); в – in groups with duration of infertility  $\leq 5$  years (group 1) and  $> 5$  years (group 2). Here and in Fig. 2: data are presented as a median ( $Me$ ), interquartile range ( $LQ-UQ$ ),  $Min-Max$ . \*  $p_u < 0,05$ ; \*\*  $p_u < 0,01$  (Mann – Whitney test)

Одним из важных параметров при определении тактики ЭКО и подборе протокола стимуляции является овариальный резерв женщин, который включает оценку базального уровня АМГ и числа АФ. Поэтому на первом этапе исследовали взаимосвязь между данными показателями и содержанием свДНК в ФЖ. В зависимости от ко-

личества АФ, способных отвечать на стимуляцию суперовуляции, женщин разделили на три группы: АФ  $< 5$  (группа 1); АФ 5–14 (группа 2); и АФ  $> 14$  (группа 3). Уровень свДНК в группе 3 был в 1,3 раза выше, чем в группе 1 (47,8 vs 37,8;  $p_u = 0,04$ ) (см. рис. 2, а). Тем не менее достоверной корреляционной связи между указанными параметрами не выявили ( $r = 0,22$ ;  $p = 0,1$ ).

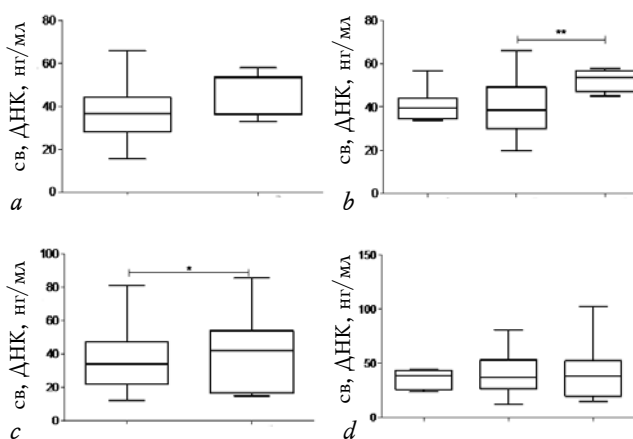


Рис. 2. Уровень свДНК в фолликулярной жидкости у бесплодных женщин в стимулированных циклах овуляции в зависимости от показателей овариального резерва, количества фолликулов и ооцитов: а – АФ  $< 5$  (группа 1), АФ 5–14 (группа 2) и АФ  $> 14$  (группа 3); б – уровень АМГ  $< 1,0$  нг/мл (группа 1), 1,0–6,0 нг/мл (группа 2),  $> 6,0$  нг/мл (группа 3); в – количество овуляторных фолликулов  $< 12$  (группа 1),  $\geq 12$  (группа 2); д – количество ооцитов  $< 4$  (группа 1), 4–8 (группа 2),  $> 8$  (группа 3)

Fig. 2. The level of cfDNA in the follicular fluid in women in stimulated ovulation cycles, depending on the parameters of the ovarian reserve and the number of follicles and oocytes. The data are presented on the content of cfDNA: а – AF  $< 5$  (group 1), AF 5–14 (group 2) and AF  $> 14$  (group 3); б – level of AMH  $< 1.0$  ng/ml (group 1), 1.0–6.0 ng/ml (group 2),  $> 6.0$  ng/ml (group 3); в – number of ovulatory follicles  $< 12$  (group 1),  $\geq 12$  (group 2); д – number of oocytes  $< 4$  (group 1), 4–8 (group 2),  $> 8$  (group 3).

В зависимости от уровня АМГ все женщины также были разделены на три группы: с низким ( $< 1,0$  нг/мл; группа 1), средним (1,0–6,0 нг/мл; группа 2) и высоким ( $> 6,0$  нг/мл; группа 3) уровнем гормона. Содержание свДНК в ФЖ у женщин группы 3 было достоверно выше, чем у женщин группы 2 (53,7 vs 38,5;  $p_u = 0,01$ ) и в виде выраженного тренда превышало аналогичный показатель в группе 1 (53,7 vs 41,0;  $p_u = 0,059$ ) (рис. 2, б). При этом между уровнем АМГ и концентрацией свДНК отмечалась умеренная прямая корреляционная взаимосвязь ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,03$ ).

Важно отметить, что ответ яичников на стимуляцию существенно различался, что проявлялось вариациями в количестве овуляторных фолликулов и полученных ооцитов. Оценка содержания свДНК с учетом данных параметров показала, что концентрация свДНК в образцах ФЖ женщин с высоким количеством овуляторных фолликулов ( $\geq 12$ ) составляла 44,2 (40,0–53,6) нг/мл и была достоверно выше, чем у женщин с меньшим ( $< 12$ ) количеством фолликулов 36,6 (29,8–47,5) нг/мл;  $p_u = 0,04$  (см. рис. 2, с). Однако значимой корреляционной связи между указанными параметрами не выявили ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,1$ ). Для анализа взаимосвязи свДНК с количеством ооцитов, получаемых при трансвагинальной пункции яичников, женщин разделили на три группы – с низким ( $< 4$ ; группа 1), средним (4–8; группа 2) и высоким ( $> 8$ ; группа 3) содержанием ооцитов. Уровень свДНК в ФЖ женщин в сформированных группах значимо не различался (см. рис. 2, d).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании продемонстрировано, что содержание свДНК в ФЖ женщин со стимулированной овуляцией значимо выше, чем в естественных циклах. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, которые выявили наличие свДНК в ФЖ женщин со стимулированной овуляцией [14, 19–21] и показали прямую взаимосвязь между концентрацией свДНК и дозой гонадотропина [14]. Данные о наличии свДНК в ФЖ женщин в естественных циклах ранее в литературе не освещались и, учитывая иммуномодулирующие свойства ДНК [5], могут послужить основой для исследования новых аспектов иммунно-эндокринных взаимодействий в регуляции фолликулогенеза и созревания ооцитов.

Анализ влияния различных клинических параметров на уровень свДНК в ФЖ (возраст, первичное или вторичное бесплодие, причина бесплодия) показал, что указанные факторы не влияли на содержание свДНК. В то же время большая длительность бесплодия ассоциировалась с более высоким уровнем свДНК, что может быть обусловлено усилением апоптотических процессов на фоне длительно протекающих воспалительных процессов и гормональных дисфункций [22, 23].

Одной из важнейших задач при подборе протокола стимуляции яичников у женщин, находящихся в программе ЭКО, является оценка овариального резерва. Выбор оптимального про-

токола позволяет получить оптимальное число фолликулов и, соответственно, достаточное число ооцитов и эмбрионов, чтобы отобрать для переноса эмбрионы высокого качества. У пациенток с нарушениями овариального резерва подобная задача становится фактически неразрешимой. Полученные нами данные показали сопряженность свДНК с уровнем сывороточного АМГ и количеством АФ, которые, по данным литературы, характеризуют овариальный резерв [16, 18]. В частности, у женщин с повышенным уровнем АМГ ( $> 6$  нг/мл) регистрировалась наиболее высокая концентрация свДНК, при этом между указанными параметрами обнаруживалась прямая корреляционная взаимосвязь. Это, по-видимому, связано со способностью АМГ (в высоких концентрациях) вызывать в клетках гранулозы оксидативный стресс и индукцию Fas/FasL-опосредованного апоптоза, что сопровождается высвобождением свДНК [15].

Высокий уровень АМГ наиболее часто выявляется при большом количестве АФ у женщин с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ) и мультифолликулярными яичниками. Так, S. Traver и соавт. выявили повышенный уровень свДНК в группе женщин с СПКЯ [14]. В настоящем исследовании продемонстрировано, что наличие большого числа АФ ( $> 14$ ) у женщин с мультифолликулярными яичниками также ассоциируется с высокой концентрацией свДНК. Интересно отметить, что S. Traver и соавт. в своих исследованиях выявили повышенный уровень свДНК (в виде тренда) не только в группе с СПКЯ, но и у женщин со сниженным овариальным резервом.

Одним из новых фактов, полученных в нашем исследовании, стали данные о сопряженности высоких концентраций свДНК с большим количеством овуляторных фолликулов. Это, по-видимому, объясняется тем, что созревание большого количества фолликулов при стимуляции гонадотропинами сопровождается выраженными процессами апоптоза клеток гранулезы [24].

По данным литературы, крупные фолликулы с ооцитами высокого качества содержат меньше свДНК, чем мелкие фолликулы с незрелыми ооцитами [21]. В наших исследованиях мы не выявили различий в концентрации свДНК в зависимости от количества ооцитов. Возможно, это связано с тем, что для исследований отбирали образцы ФЖ только из крупных фолликулов. Таким образом, уровень свДНК в ФЖ может служить дополнительным биомаркером эффективности ответа яичников на стимуляцию гонадотропинами.

# ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии. *Медицинская иммунология*. 2013; 15 (5): 399–412. [Kozlov V.A. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Medical Immunology*. 2013; 15 (5): 399–412 (in Russ.)].
2. Boissière A., Gala A., Ferrières-Hoa A., Mullet T., Baillet S., Petiton A., Torre A., Hamamah S. Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility. *Basic Clin. Androl.* 2017; 27: 7. DOI: 10.1186/s12610-017-0052-0.
3. Li H.-G., Huang S.-Y., Zhou H., Liao A.-H., Xiong C.-L. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian J. Androl.* 2009; 11 (6): 703–709. DOI: 10.1038/aja.2009.65.
4. Tzimagiorgis G., Michailidou E.Z., Kritis A., Markopoulos A.K., Koudou S. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiol.* 2011; 35 (6): 580–589. DOI: 10.1016/j.canep.2011.02.016.
5. Fűri I., Kalmár A., Wichmann B., Spisák S., Schöller A., Barták B., Tulassay Z., Molnár B. Cell free DNA of tumor origin induces a ‘metastatic’ expression profile in HT-29 cancer cell line. *PLoS One*. 2015; 10 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0131699.
6. Lam N.Y., Rainer T.H., Chan L.Y., Joynt G.M., Lo Y.M. Time course or early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.* 2003; 49 (8): 1286–1291.
7. Ralla B., Stephan C., Meller S., Dietrich D., Kristiansen G., Jung K. Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2014; 51 (4): 200–231. DOI: 10.3109/10408363.2014.914888.
8. Thierry A.R., El Messaoudi S., Gahan P.B., Anker P., Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35 (3): 347–376. DOI: 10.1007/s10555-016-9629-x.
9. Wang W., Kong P., Ma G., Li L., Zhu J., Xia T., Xie H., Zhou W., Wang S. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 2017; 8 (26): 43180–43191. DOI: 10.18632/oncotarget.17858.
10. Traver S., Assou S., Scalici E., Haouzi D., Al-Edani T., Belloc S., Hamamah S. Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy. *Hum. Reprod. Update*. 2014; 20 (6): 905–923. DOI: 10.1093/humupd/dmu031.
11. Assou S., Ant-Ahmed O., El Messaoudi S., Thierry A.R., Hamamah S. Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. *Med. Hypotheses*. 2014; 83 (4): 506–508. DOI: 10.1016/j.mehy.2014.08.019.
12. Kevin P. Daly Circulating donor-derived cell-free DNA: a true biomarker for cardiac allograft rejection? *Ann. Transl. Med.* 2015; 3 (4): 47. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.01.35.
13. Quezada M.S., Francisco C., Dumitrascu-Biris D., Nicolaides K.H., Poon L.C. Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2015; 45 (1): 101–105. DOI: 10.1002/uog.14666.
14. Traver S., Scalici E., Mullet T., Molinari N., Vincens C., Anahory T., Hamamah S. Cell-free DNA in human follicular microenvironment: new prognostic biomarker to predict *in vitro* fertilization outcomes. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0136172. DOI: 10.1371/journal.pone.0136172.
15. Guan Y., Zhang W., Wang X., Cai P., Jia Q., Zhao W. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*. 2017; 473: 213–217. DOI: 10.1016/j.cca.2016.11.023.
16. Broer S.L., Dylleman M., Opmeer B.C., Fauser B.C., Mol B.W., Broekmans F.J. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*. 2011; 17 (1): 46–54. DOI: 10.1093/humupd/dmq034.
17. Tal R., Tal O., Seifer B.J., Seifer D.B. Antimüllerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015; 103 (1): 119–130. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.041.
18. Iwase A., Nakamura T., Osuka S., Takikawa S., Goto M., Kikkawa F. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve: What have we learned, and what should we know? *Reprod. Med. Biol.* 2015; 15 (3): 127–136. DOI: 10.1007/s12522-015-0227-3.
19. Al-Saleh I., El-Doush I., Arif J., Coskun S., Jaroudi K., Al-Shahrani A., El-Din Mohamed G. Levels of DNA adducts in the blood and follicular fluid of women undergoing *in vitro* fertilization treatment and its correlation with the pregnancy outcome. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2010; 84 (1): 23–28. DOI: 10.1007/s00128-009-9889-z.
20. Dimopoulou M., Anifandis G., Messini C.I., Dafopoulos K., Kouris S., Sotiriou S., Satra M., Vamvakopoulos N., Messinis I.E. Follicular fluid oocyte/cumulus-free DNA concentrations as a potential biomolecular marker of embryo quality and IVF outcome. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 289306. DOI: 10.1155/2014/289306.
21. Scalici E., Traver S., Molinari N., Mullet T., Monforte M., Vintejoux E., Hamamah S. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (12): 2661–2669. DOI: 10.1093/humrep/deu238.
22. Czamanski-Cohen J., Sarid O., Cwikel J., Levitas E., Lunenfeld E., Douvdevani A., Har-Vardi I. Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment. *Arch. Womens Ment. Health*. 2014; 17 (3): 251–253. DOI: 10.1007/s00737-013-0407-2.



23. Lynch C.D., Sundaram R., Maisog J.M., Sweeney A.M., Buck Louis G.M. Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort study—the LIFE study. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (5): 1067–1075. DOI: 10.1093/humrep/deu032 PMID: 24664130.
24. Liu S., Feng H.L., Marchesi D., Chen Z.J., Hershlag A. Dose-dependent effects of gonadotropin on oocyte developmental competence and apoptosis. *Reprod. Fertil. Dev.* 2011; 23 (8): 990–996. DOI: 10.1071/RD11079 PMID: 22127004.

## Вклад авторов

Андреева Е.А. – отбор пациентов, сбор образцов ФЖ, пробоподготовка для оценки свДНК, анализ клинических данных, подготовка текста статьи. Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д. – пробоподготовка и анализ свДНК в образцах ФЖ. Хонина Н.А. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи. Пасман Н.М. – подготовка текста статьи. Козлов В.А., Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

## Authors contribution

Andreeva E.A. – selection of the patients, collection of the FF samples, preparation of the samples for evaluating cfDNA, analysis of the clinical data, drafting of the manuscript. Demchenko E.N., Gavrilova E.D. – preparation of the samples and analysis of cfDNA in the FF samples. Khonina N.A. – analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript. Pasman N.M. – drafting of the manuscript. Kozlov V.A., Chernykh E.R. – final approval of the manuscript for publication.

## Сведения об авторах

Андреева Евгения Александровна, аспирант, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Хонина Наталья Алексеевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ; профессор, медицинский факультет, НИГУ, г. Новосибирск.

Демченко Елена Николаевна, канд. хим. наук, науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Гаврилова Елена Давидовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Пасман Наталья Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, НИГУ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-2346-6279.

(✉) Андреева Евгения Александровна, e-mail: evga\_91@mail.ru.

## Authors information

Andreeva Evgeniya A., PhD-student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Khonina Natalia A., DM, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI; Medical Department, NSU, Novosibirsk, Russian Federation.

Demchenko Elena N., PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Gavrilova Elena D., PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Pasman Natalia M., DM, Head of Obstetrics and Gynecology Division, Medical Department, NSU, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor of RIFCI, Head of the Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

Chernykh Elena R., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2346-6279.

(✉) Andreeva Evgeniya A., e-mail: evga\_91@mail.ru.

Поступила в редакцию 06.07.2018  
Подписана в печать 14.12.2018

Received 06.07.2018  
Accepted 14.12.2018

## Ключевые звенья патогенеза токсической миокардиопатии

Бунятян Н.Д.<sup>1,3</sup>, Власова Т.И.<sup>2</sup>, Мышкина Н.А.<sup>2</sup>, Власов А.П.<sup>2</sup>,  
Полозова Э.И.<sup>2</sup>, Лещанкина Н.Ю.<sup>2</sup>, Прокофьев А.Б.<sup>1,3</sup>, Гуревич К.Г.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Первый Московский государственный медицинский университет (МГМУ) имени И.М. Сеченова  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2

<sup>2</sup> Мордовский государственный университет (МГУ) имени Н.П. Огарева  
Россия, 430000, г. Саранск, ул. Большевикская, 68

<sup>3</sup> Научный центр экспертизы средств медицинского применения (НЦЭСМП)  
Россия, 127051, г. Москва, б-р Петровский, 8/2

<sup>4</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет (МГМСУ) имени А.И. Евдокимова  
Россия, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20/1

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** Выявить ключевые звенья патогенеза токсической миокардиопатии в условиях эндогенной интоксикации при перитоните.

**Материалы и методы.** Проведены экспериментальные исследования на собаках ( $n = 24$ ). Смоделирован гнойный каловый перитонит. В динамике процесса исследовали содержание токсических продуктов в плазме крови, липидный состав, интенсивность процессов перекисного окисления липидов и активность фосфолипазы  $A_2$ , супероксиддисмутазы, показатели гипоксии ткани миокарда. Оценивали трофику и электрогенез миокарда, изменения показателей электрокардиограммы. Проводили гистологическое исследование ткани миокарда.

**Результаты.** Развитие эндотоксикоза перитонеального генеза вызывает значительные нарушения метаболизма и функции сердца с развитием миокардиопатии. Ключевую роль в развитии и прогрессировании повреждений сердца при эндотоксикозе играет нарушение целостности биомембран и расстройство процессов, реализующихся с их участием. К числу основных среди них относят количественную и качественную модификацию фосфолипидов мембран кардиоцитов.

**Заключение.** Полученные факты свидетельствуют о ключевой роли сопряженности дислипидных явлений в исследованных клеточных структурах с интенсификацией перекисного окисления липидов, увеличением активности фосфолипазы  $A_2$ , гипоксией, что подтверждает значимость данных процессов в дестабилизации фосфолипидной матрицы биомембран.

**Ключевые слова:** эндогенная интоксикация, перитонит, миокардиопатия.

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

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

**Соответствие принципам этики.** Все исследования проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Исследования одобрено этическим комитетом Медицинского института им. Н.П. Огарева (г. Саранск) (протокол № 53 от 17.04.2015).

Для цитирования: Бунятян Н.Д., Власова Т.И., Мышкина Н.А., Власов А.П., Полозова Э.И., Лещанкина Н.Ю., Прокофьев А.Б., Гуревич К.Г. Ключевые звенья патогенеза токсической миокардиопатии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 24–30. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-24-30>.

УДК 616.127-002-008-092

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-24-30>

## Key elements of toxic myocardial pathology pathogenesis

Bunyatyan N.D.<sup>1,3</sup>, Vlasova T.I.<sup>2</sup>, Myshkina N.A.<sup>2</sup>, Vlasov A.P.<sup>2</sup>,  
Polozova E.I.<sup>2</sup>, Leshchankina N.Yu.<sup>2</sup>, Prokofiev A.B.<sup>1,3</sup>, Gurevich K.G.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University  
8/2, Trubetskaya Str., Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Ogarev Mordovia State University  
68, Bolshevistskaya Str., Saransk, 430000, Russian Federation

<sup>3</sup> Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products  
8/2, Petrovsky Blv., Moscow, 127051, Russian Federation

<sup>4</sup> A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry  
20/1, Delegatskaya Str., Moscow 127473, Russian Federation

### ABSTRACT

**Goal.** To identify key links in the pathogenesis of toxic myocardial pathology in conditions of endogenous intoxication in peritonitis.

**Materials and methods.** Experimental studies were carried out on dogs ( $n = 24$ ). The model of purulent fecal peritonitis. We studied the run-time content of toxic products in blood plasma, the lipid composition, the intensity of lipid peroxidation, the activity of phospholipase A2 and superoxide dismutase, and hypoxia of myocardial tissue. We evaluated loss of water and proteins, electrogenesis of the myocardium cells and changes in the ECG parameters. We also performed histological examination of the myocardial tissue.

**Results.** Experimental studies in dogs showed that the development of endotoxemia of peritoneal origin is accompanied by significant metabolic disorders and cardiac malfunction leading to the development of myocardial pathology. The most important role in the development and progression of myocardial damage in endotoxemia is played by biomembrane damage and disruption of associated processes. The main processes are quantitative and qualitative modifications of phospholipids in cardiac cell membranes.

**Conclusion.** The obtained data demonstrate the key role of the interrelation between dyslipidemia in the investigated cellular structures and intensification of lipid peroxidation, an increase in phospholipase A<sub>2</sub> activity, and hypoxia; which confirms the significance of these processes in destabilization of the phospholipid matrix of biomembranes.

**Key words:** endogenous intoxication, peritonitis, myocardial pathology.

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

**Source of financing.** The authors state that there is no funding for the study.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the ethics committee at National Research Ogarev Mordovia State University (Protocol No. 53 of 17.04.2015).

**For citation:** Bunyatyan N.D., Vlasova T.I., Myshkina N.A., Vlasov A.P., Polozova E.I., Leshchankina N.Yu., Prokofiev A.B., Gurevich K.G. Key elements of toxic myocardial pathology pathogenesis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 24–30. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-24-30>.

## ВВЕДЕНИЕ

Кардиальная патология – осложнение многих заболеваний, в том числе хирургических, сопровождающихся синдромом эндогенной интоксикации (ЭИ) [1]. Первостепенной задачей исследователей является изучение молекулярных механизмов расстройств морфофункционального состояния миокарда, что имеет не только академическое значение, но и представляет основу для осмысленных практических лечебных действий [2].

Патологические изменения сердечно-сосудистой системы при синдроме эндогенной интоксикации определяются совокупностью ряда патогенетических механизмов. Анализ литературных данных не дает полного представления о патогенезе кардиотоксических повреждений, обусловленных эндогенной интоксикацией [3].

Цель исследования: выявить ключевые звенья патогенеза токсической миокардиопатии в условиях эндогенной интоксикации при перитоните.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все манипуляции с животными проводили под общим обезболиванием. Гнойный перитонит моделировали на 24 взрослых беспородных собаках путем инфузии каловой взвеси в брюшную полость (Власов А.П., 1991). Через 24 ч после моделирования с помощью срединной лапаротомии проводили оценку возникших патоморфологических изменений в брюшной полости. Затем выполняли ее санацию и ушивали брюшную стенку. На контрольных этапах наблюдения (1-, 3-, 5-е сут) животным производили релапаротомию, торакотомию, забор крови из бедренной и коронарных вен путем пункции, биопсию тканей левого желудочка сердца. Такого рода манипуляции проводили только один раз, поэтому каждый контрольный этап включал восемь особей. Антибактериальная терапия в послеоперационном периоде включала гентамицин внутримышечно из расчета 0,8 мг/кг массы тела, инфузионная терапия – 5%-й раствор глюкозы и 0,89%-й раствор хлорида натрия внутривенно из расчета 50 мл/кг массы животного.

Применялись следующие методики: световая микроскопия биоптатов ткани миокарда при окраске препаратов гематоксилином и эозином; определение уровня токсинов в плазме крови (среднемолекулярные пептиды определяли после реакции с трихлоруксусной кислотой с помощью спектрофотометра СФ-46 (Пикуза О.И., Шакирова Л.З., 1994); общую и эффективную концентрации альбумина в крови – с использованием анализатора АКЛ-01 «Зонд» (Грызунов Ю.А.,

Добрецов Г.Е., 1994)). В ходе операции регистрировали редокс-потенциал для оценки электрогенеза тканей миокарда с использованием ионометра ЭВ-74. Определяли коэффициент диффузии кислорода в тканях миокарда (Труфанов Л.А., 1991), выраженность процесса липоперекисления тканей миокарда по содержанию первичных (Ганстон Ф.Д., 1986) и вторичных продуктов (малонового диальдегида), активность супероксиддисмутазы (Гуревич В.С. и др., 1990) и фосфолипазы  $A_2$  (Трофимов В. А., 1999). Определяли показатели гипоксии тканей миокарда: содержание пировиноградной кислоты (Кушманова О.Д., Ивченко Г.М., 1983); содержание молочной кислоты (Меньшиков В.В., 1987). Липиды из тканей миокарда экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью (Хиггинс Дж.А., 1990), фракционировали методом тонкослойной хроматографии. Молекулярный анализ проводили на денситометре Model GS-670 (BIO-RAD, США) с соответствующим программным обеспечением (Phosphor Analyst/PS Software). Регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) в стандартных отведениях на электрокардиографе ЭК ЭТ-01-«Р-Д».

Данные обрабатывали методом медицинской статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента и коэффициента корреляции Пирсона (<http://medstatistic.ru/index.php>, программы Excel 7.0 и Statistica 8.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании острого гнойного перитонита в течение 24 ч у животных развивался синдром ЭИ. В течение первых 3 сут явления ЭИ прогрессировали, о чем свидетельствовала динамика показателей токсических продуктов в плазме крови. Уровень токсических продуктов гидрофильной природы (молекул средней массы  $MCM_{280}$  и  $MCM_{254}$ ) в динамике болезни был повышен на 169,3–236,7% по сравнению с нормой. Гидрофильные токсические соединения, оцененные по общей и эффективной концентрации альбумина, – на 154,5–272,9% ( $p < 0,05$ ).

Синдром ЭИ характеризовался изменением микроструктуры ткани миокарда, которое можно определить как дисметаболическую кардиомиопатию. Были выявлены явления дистрофии (белковой, липидной и вакуольной), атрофии кардиомиоцитов. Зарегистрированы отек и лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы миокарда. Встречался некроз отдельных кардиомиоцитов, а также признаки микроциркуляторных нарушений (расширение и полнокровие капилляров и венул, микроварикозы, умеренный и очаговый

диапедез эритроцитов, набухание стенок мелких интрамуральных и субэндокардиальных артерий, спазмирование отдельных артериол).

Известно, что значимым пусковым фактором патогенеза различных заболеваний является расстройство липидного метаболизма [4]. Нами проведен анализ основных липидов тканевых структур миокарда.

Установлено, что в сердечной мышце показатели липидного обмена подвержены существенной модификации. Отмечалось по сравнению с нормой уменьшение уровня эстерифицированного холестерина на 17,5% ( $p < 0,01$ ) и количества суммарных фосфолипидов (СФЛ) на 11,7% ( $p < 0,01$ ), фракционный состав которых также изменялся. Показано уменьшение по сравнению с нормой уровня сфингомиелина (СМ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозита (ФИ) на 9,7; 21,2 и 11,5% соответственно ( $p < 0,05$ ).

При этом регистрировали повышение относительно нормы уровня моноацилглицерола (МАГ) на 17,8% ( $p < 0,05$ ), диацилглицерола (ДАГ) на 12,0% ( $p < 0,01$ ), триацилглицерола (ТАГ) на 11,6% ( $p < 0,05$ ) и фракции свободных жирных кислот (СЖК) на 19,1% ( $p < 0,01$ ), существенное повышение количества лизофосфолипидов (ЛФЛ) на 312,9% ( $p < 0,001$ ).

Через 1 сут после создания модели перитонита изменения в спектре липидов нарастали. В сердечной мышце отмечено увеличение уровня МАГ на 78,5% ( $p < 0,001$ ), ДАГ – на 24,5% ( $p < 0,001$ ), ТАГ – на 22,9% ( $p < 0,001$ ), холестерина – на 14,7% ( $p < 0,05$ ), СЖК – на 37,7% ( $p < 0,001$ ), ЛФЛ – на 522,6% ( $p < 0,001$ ). Спектр СФЛ представлен еще большим снижением уровня СМ на 22,1% ( $p < 0,001$ ), фосфатидилхолина (ФХ) – на 17,5% ( $p < 0,001$ ), ФС – на 37,4% ( $p < 0,001$ ), при достоверном увеличении ФИ на 22% ( $p < 0,001$ ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА) – на 21,7% ( $p < 0,001$ ).

В ткани миокарда на 3-и сут эксперимента регистрировали повышение уровня МАГ на 98,2% ( $p < 0,001$ ), ДАГ – на 15,5% ( $p < 0,001$ ), ТАГ – на 25,2% ( $p < 0,01$ ), СЖК – на 121,6% ( $p < 0,001$ ), ЛФЛ – на 445,2% ( $p < 0,001$ ) и снижение количества эстерифицированного холестерина на 45,6% ( $p < 0,001$ ), СФЛ – 20,1% ( $p < 0,001$ ), в спектре которых снижалось содержание СМ, ФХ, ФС на 19,1; 20,8; 44,4% ( $p < 0,001$ ) соответственно, повышалась доля ФИ на 31,8 и ФЭА – на 31,2% ( $p < 0,001$ ) соответственно.

Проводя анализ результатов исследований липидного состава тканевых структур миокарда на конечном этапе наблюдения, выявлено повыше-

ние содержания МАГ на 87,7% ( $p < 0,001$ ), ДАГ – на 30,6% ( $p < 0,001$ ), СЖК – на 169,8% ( $p < 0,001$ ), холестерина – на 10,2% ( $p < 0,05$ ), ЛФЛ – на 367,7% ( $p < 0,001$ ), при достоверном уменьшении уровня ЭХС на 43,3% ( $p < 0,001$ ) и СФЛ – на 14,5% ( $p < 0,01$ ), в спектре которых выявлено снижение уровня СМ на 14,6% ( $p < 0,01$ ), ФХ – на 15,3% ( $p < 0,001$ ), ФС – на 60,3% ( $p < 0,001$ ) при увеличении уровня ФИ на 24,8% ( $p < 0,01$ ), ФЭА – на 20,4% ( $p < 0,001$ ).

Исследования показали, что в ткани сердечной мышцы при остром перитоните интенсифицируется процесс липоперекисления (рис. 1). Об этом свидетельствует достоверное увеличение на всех этапах исследования по сравнению с нормой уровня диеновых конъюгатов на 52,2–104,3% ( $p < 0,05$ ), триеновых конъюгатов – на 100,0–121,4% ( $p < 0,05$ ), малонового диальдегида – на 50,6–56,9% ( $p < 0,05$ ), а также активности фосфолипазы  $A_2$  на 92,3–197,6% ( $p < 0,05$ ). Регистрировали уменьшение активности супероксиддисмутазы на 48,8–50,7% ( $p < 0,05$ ).

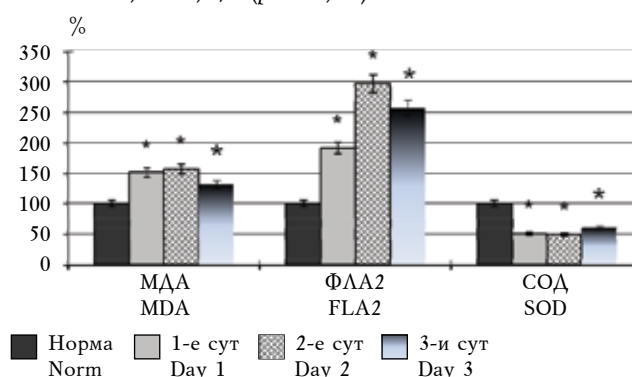


Рис. 1. Показатели уровня малонового диальдегида (МДА), супероксиддисмутазы (СОД) и фосфолипазы  $A_2$  (ФЛА $_2$ ) в ткани миокарда при гнойном перитоните на фоне инфузионной терапии. Здесь и в рис. 2, 3: \* достоверность отличия по отношению к исходу при  $p < 0,05$

Fig. 1. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and phospholipase  $A_2$  (PLA $_2$ ) in the myocardial tissue under purulent peritonitis against the background of infusion therapy. Here and in Fig. 2, 3: \* statistical significance of the differences is shown with respect to the outcome at  $p < 0.05$ .

При остром воспалении брюшины, как показали наши исследования, развивалась тканевая гипоксия сердца, что подтверждалось увеличением в тканях левого желудочка содержания молочной и пировиноградной кислот на 127,1–167,4 и 147,8–456,5% соответственно ( $p < 0,05$ ) по сравнению с исходными данными до воспроизведения у животных перитонита (рис. 2).

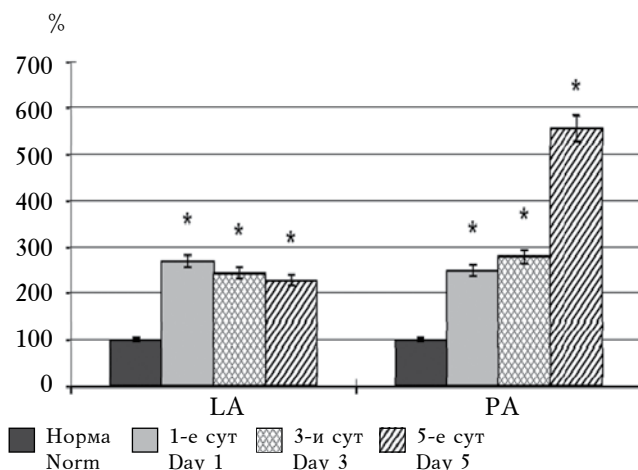


Рис. 2. Динамика изменений содержания молочной кислоты (МК) и пировиноградной кислоты (ПВК) в ткани сердца при остром гнойном перитоните на фоне инфузионной терапии

Fig. 2. The dynamics of the changes in the level of lactic acid (LA) and pyruvic acid (PA) in the myocardial tissue under acute purulent peritonitis against the background of infusion therapy

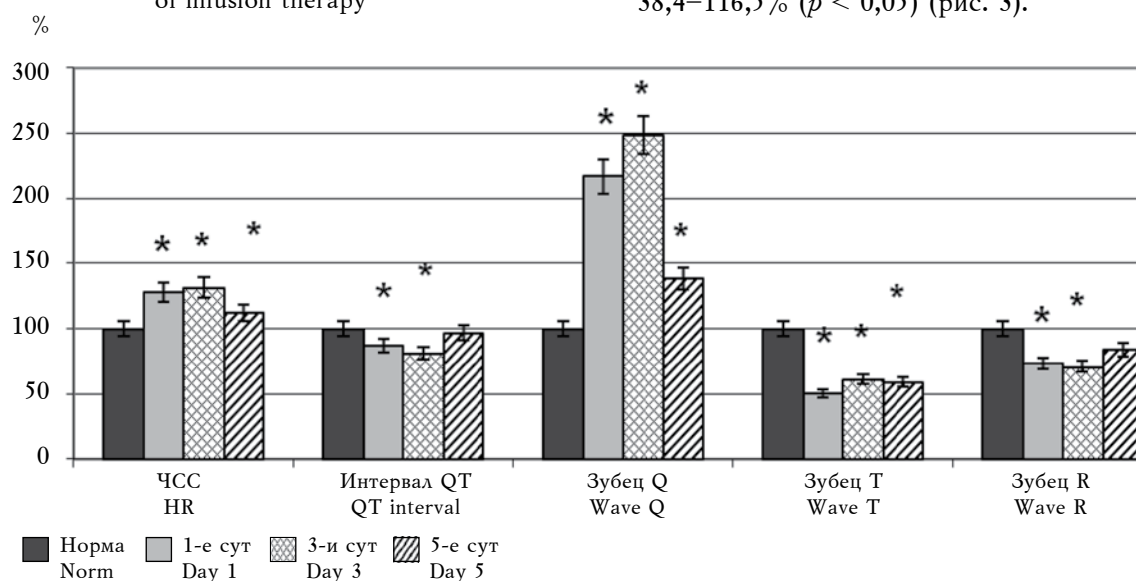


Рис. 3. Динамика изменений частоты сердечных сокращений (ЧСС), высоты зубцов и длительности интервалов электрокардиограммы (ЭКГ) при остром гнойном перитоните в условиях инфузионной терапии

Fig. 3. The dynamics of the changes in the heart rate (HR), ECG wave height and interval duration (ECG) under acute purulent peritonitis in conditions of infusion therapy

На фоне развивающегося эндотоксикоза регистрировалось увеличение эктопической активности миокарда в виде нарушений ритма сердца, которые возникали у 18 (75%) из 24 животных и были представлены преимущественно наджелудочковой экстрасистолой, реже – желудочковой бигеминией. У 6 (25%) из 24 животных были зарегистрированы и ишемические изменения на ЭКГ в виде депрессии сегмента ST.

Одним из уровней реализации патологических эффектов токсемии в условиях перитонита являются генерализованные макро- и микроциркуляторные нарушения. В сердце выявлены изменения трансапикалярного обмена, электрогенеза тканей и их диффузионной способности для кислорода. Это подтверждалось падением окислительно-восстановительного (редокс) потенциала, уменьшением коэффициента диффузии кислорода, повышением продукции капиллярного фильтра и белка. Зарегистрировано и увеличение кровенаполнения миокарда.

Полученные нами фактические данные свидетельствуют о нарушении электрофизиологических параметров сердечной мышцы на фоне эндотоксикоза, которые были зарегистрированы в виде изменения интервалов ЭКГ. Выявлено увеличение частоты сердечных сокращений, уменьшение длительности интервалов RR, PQ, QT и амплитуды основных зубцов на ЭКГ: S и T. Амплитуда зубца Q, напротив, возрастала на 38,4–116,5% ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя полученные факты с акцентом на установление ключевых звеньев в патогенезе токсической кардиомиопатии, представляется возможным заключить, что при ЭИ перитонеального генеза в миокарде формируются существенные нарушения трофики тканей, что обуславливает падение их электрогенетической активности и, как следствие, нарушение электрофизиологиче-



ских параметров сердечной мышцы. Необходимо отметить, что максимальное нарушение метаболических и электрических показателей сердца происходило на 3-и сут, что сопряжено с динамикой ЭИ. Проведение корреляционного анализа продемонстрировало тесную корреляционную связь ( $r = 0,70-0,99$ ;  $p < 0,05$ ) ЭИ с изменением состава основных фракций липидов тканей сердечной мышцы, интенсивностью перекисного окисления мембранных липидов и активностью фосфолипидных систем (на примере фосфолипазы  $A_2$ ), а также электрической активностью миокарда.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Абдуллаев Э.Г., Бабышин В.В., Новиков Ю.А., Гусев А.В., Малахов Н.Б. Перитонит. Владимир: Издательство ВлГУ, 2014: 144. [Abdullaev E.G., Babyshin V.V., Novikov Ju.A., Gusev A.V., Malakhov N.B. Peritonitis. Vladimir: Izdatelstvo VIGU Publ., 2014: 144 (in Russ.).]
2. Новоселов В.П., Савченко С.В., Кузнецов Е.В., Титаренко Б.Ф. Морфологическое обоснование формирования самостоятельного варианта токсической кардиомио-

патии при хронической интоксикации опиатами и этанолом. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 26 (1–2): 30–33. [Novoselov V.P., Savchenko S.V., Kuznetsov E.V., Titarenko B.F. Morphological substantiation of the formation of an independent variant of toxic cardiomyopathy with chronic intoxication with opiates and ethanol. *Siberian Medical Journal*. 2011; 26 (1–2): 30–33 (in Russ.).]

3. Смирнов В.В., Розанов В.Е., Болотников А.И., Пискалов В.П., Хайкин И.В. Эндогенная интоксикация в механизмах формирования патологии сердца при тяжелой сочетанной травме. *Современное состояние естественных и технических наук*. 2014; XV: 120–126. [Smirnov V.V., Rozanov V.E., Bolotnikov A.I., Piskalov V.P., Khaikin I.V. Endogenous intoxication in the mechanisms of formation of the heart pathology in severe combined trauma. *Current State of the Natural and Technical Sciences*. 2014. XV: 120–126 (in Russ.).]
4. Савельев В.С., Петухов В.А. Липидный дистресс-синдром: руководство для врачей. М.: МАКСПресс, 2010: 660. [Savelyev V.S., Petukhov V.A. Lipid distress syndrome: a guide for doctors. Moscow: MAXPress Publ., 2010: 660 (in Russ.).]

#### Вклад авторов

Бунятян Н.Д. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Власова Т.И. – проведение экспериментальной и аналитической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Мышкина Н.А. – проведение экспериментальной части работы, биохимические исследования. Власов А.П. – разработка концепции и дизайна, написание рукописи статьи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Полозова Э.И. – статистическая обработка полученных результатов и их интерпретация. Лещанкина Н.Ю. – проведение практической части исследования (биохимический анализ), анализ и интерпретация данных. Прокофьев А.Б. – анализ и интерпретация данных, редактирование статьи. Гуревич К.Г. – редактирование и оформление статьи.

#### Authors contribution

Bunyatyan N.D. – analysis and interpretation of data, writing the manuscript of the article, the final approval for the publication of the manuscript. Vlasova T.I. – experimental and analytical part of the study, data analysis and interpretation, writing the manuscript. Mishkina N.A. – carrying out the experimental part of this work, biochemical studies. Vlasov A.P. – development of the concept and design, writing the manuscript of the article, the final approval for the publication of the manuscript. Polozova E.I. – statistical processing of the results and their interpretation. Leschankina N.Yu. – conducting the practical part of the study (biochemical analysis), data analysis and interpretation. Prokofiev A.B. – data analysis and interpretation, article editing. Gourevitch K.G. – editing and preparation of the manuscript.

#### Сведения об авторах

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии, Институт фармации, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; гл. науч. сотрудник, Центр клинической фармакологии, НЦЭСМП, г. Москва.

Власова Татьяна Ивановна, д-р мед. наук, профессор, кафедра нормальной и патологической физиологии, МГУ им. Н.П. Огарева, г. Саранск. ORCID iD 0000-0002-2624-6450.

#### Authors information

Bunyatyan Natalia D., DM, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; Chief Researcher, Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation.

Vlasova Tatyana I., DM, Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

**Мышкина Нина Алексеевна**, ассистент, кафедра госпитальной терапии, МГУ им. Н.П. Огарева, г. Саранск.

**Власов Алексей Петрович**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой факультетской хирургии с курсами топографической анатомии и оперативной хирургии, детской хирургии и урологии, МГУ им. Н.П. Огарева, г. Саранск. ORCID iD 0000-0003-4731-2952.

**Полозова Элла Ивановна**, д-р мед. наук, профессор, кафедра госпитальной терапии, МГУ им. Н.П. Огарева, г. Саранск. ORCID iD 0000-0003-2693-420X.

**Лещанкина Нина Юрьевна**, д-р мед. наук, зав. кафедрой госпитальной терапии, МГУ им. Н.П. Огарева, г. Саранск.

**Прокофьев Алексей Борисович**, д-р мед. наук, профессор, кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; директор Центра клинической фармакологии, НЦЭСМП, г. Москва.

**Гуревич Константин Георгиевич**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой, МГМСУ им. А.И. Евдокимова, г. Москва.

(✉) **Власов Алексей Петрович**, e-mail: vap.61@yandex.ru.

**Myshkina Nina A.**, Assistant, Department of Hospital Therapy, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

**Vlasov Aleksey P.**, DM, Professor, Head of the Department of Intermediate Surgery with Courses in Topographic Anatomy and Operative Surgery, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

**Polozova Ella I.**, DM, Professor of the Department of Advanced Therapy, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

**Leshchankina Nina Yu.**, DM, Head of the Department of Advanced Therapy, National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

**Prokofiev Alexey B.**, DM, Professor, Department of Clinical Pharmacology and Introduction in Internal Diseases of the Sechenov University; Director of the Center for Clinical Pharmacology, Moscow, Russian Federation.

**Gurevich Konstantin G.**, DM, Professor, Head of the Department, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation.

(✉) **Vlasov Aleksey P.**, e-mail: vap.61@yandex.ru.

Received 03.05.2018

Accepted 14.12.2018

Поступила в редакцию 03.05.2018

Подписана в печать 14.12.2018

## Результаты стандартной эхокардиографии и использования технологии Velocity Vector Imaging в отдаленные сроки после хирургической реваскуляризации у пациентов с ишемической болезнью сердца

Васильев А.Ю.<sup>1</sup>, Петрова Е.Б.<sup>2</sup>, Федорова М.В.<sup>3</sup>, Ефимова С.Б.<sup>3</sup>, Кордатов П.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Московский медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова  
Россия, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20/1

<sup>2</sup> Приволжский исследовательский медицинский университет  
Россия, 603950, г. Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1

<sup>3</sup> Специализированная кардиохирургическая клиническая больница  
Россия, 603136, г. Нижний Новгород, ул. Ванеева, 209

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования:** оценить влияние хирургической реваскуляризации на функцию левого желудочка (ЛЖ) при использовании стандартного эхокардиографического исследования и технологии Velocity Vector Imaging.

**Материалы и методы.** Обследованы 40 пациентов с ишемической болезнью сердца до, после и спустя 6, 12 и 24 мес после коронарного шунтирования (КШ). Стандартное эхокардиографическое (эхоКГ) исследование выполняли на ультразвуковом сканере Acuson X 300 (Siemens, США) секторным мультисекторным датчиком 5–1 МГц. Для объективной оценки функции миокарда проводился анализ деформационных и ротационных свойств левого желудочка в режиме постобработки с помощью системы Syngo VVI (Siemens Medical Solutions USA Inc., США) в 720 сегментах ЛЖ.

**Результаты.** Данные стандартного эхоКГ исследования показали стабильный результат систолической, диастолической и сократительной функции ЛЖ на протяжении 2 лет наблюдения. Изучение глобальных значений деформации S и скорости деформации SR показало снижение продольного S спустя 6 мес после КШ в бассейне правой коронарной артерии в группе пациентов с жалобами по сравнению с теми, кто жалоб не имел ( $p = 0,004$ ). Кроме того, в данном бассейне отмечалась тенденция к различию SR между двумя группами ( $p = 0,07$ ). Изучая бассейн правой коронарной артерии, тенденция к снижению S ( $p = 0,06$ ) отмечена в эти же сроки наблюдения. Спустя 1 год после КШ снижение S у пациентов с жалобами ( $p = 0,04$ ) наблюдалось в бассейне огибающей артерии только при изучении циркулярных волокон. Положительная динамика отмечена при изучении диастолической функции волокон и показателей ротации ЛЖ.

**Заключение.** Использование технологии Velocity Vector Imaging в отдаленные сроки позволяет выявить изменение функции волокон миокарда в бассейнах коронарных артерий, что актуально у пациентов, предъявляющих жалобы на боли в области сердца.

**Ключевые слова:** Velocity Vector Imaging, ишемическая болезнь сердца, левый желудочек, реваскуляризация.

**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.

---

✉ Петрова Екатерина Борисовна, e-mail: eshakhova@yandex.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено этическим комитетом НижГМА, г. Нижний Новгород (протокол № 2 от 08.02.2017).

Для цитирования: Васильев А.Ю., Петрова Е.Б., Федорова М.В., Ефимова С.Б., Кордастов П.Н. Результаты стандартной эхокардиографии и использования технологии Velocity Vector Imaging в отдаленные сроки после хирургической реваскуляризации у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 31–43. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-31-43>.

УДК 616.12-005.4-089-06-073.4-8

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-31-43>

## The results of standard echocardiography and use of Velocity Vector Imaging technology after surgical revascularization in patients with coronary artery disease

Vasiliev A.Yu.<sup>1</sup>, Petrova E.B.<sup>2</sup>, Fedorova M.V.<sup>3</sup>, Efimova S.B.<sup>3</sup>, Kordatov P.N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry  
20/1, Delegatskaya Str., Moscow, 127473, Russian Federation

<sup>2</sup> Privolzhsky Research Medical University  
10/1, Minin Sq., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

<sup>3</sup> Specialized Cardiological Clinical Hospital  
209, Vaneev Str., Nizhny Novgorod, 603136, Russian Federation

### ABSTRACT

**The aim** of the study was to assess the impact of surgical revascularization on left ventricular function using standard echocardiographic study and Velocity Vector Imaging technology.

**Materials and methods.** 40 patients with ischemic heart disease were examined before and 12 days, 6, 12 and 24 months after coronary artery bypass grafting (CABG). A standard echocardiographic (EchoCG) study was performed on ultrasound scanner Acuson X 300 (Siemens, USA) with a 5–1 MHz sector multi-frequency sensor. For objective assessment of myocardial function, the analysis of left ventricular (LV) deformation and rotational properties was performed using Syngo VVI (Siemens Medical Solutions USA Inc., CHIA) in 720 LV segments.

**Results.** Standard EchoCG showed a stable systolic, diastolic and contractile LV function during 2 years of follow-up. The study of global values of strain ( $S$ ) and strain rate ( $SR$ ) showed a decrease in longitudinal  $S$  6 months after CABG in the right coronary artery (RCA) area in the group of patients with complaints compared to those who had no complaints ( $p = 0.004$ ), in addition, in this zone there was a tendency to a difference in longitudinal  $SR$  between these two groups ( $p = 0.07$ ). In anterior descending artery area was a tendency to decreased strain of longitudinal fibers ( $p = 0.06$ ) during the same period of observation. 1 year after CABG, strain decreased in patients with complaints ( $p = 0.04$ ) in the circumference artery area only in circular fibers. Positive dynamics were noted in the diastolic function of left ventricular fibers and rotation indices.

**Conclusion.** The use of Velocity Vector Imaging after coronary bypass surgery shows a change in the function of myocardial fibers in the areas of coronary arteries, which is important in patients complaining of angina pain.

**Key words:** Velocity Vector Imaging, ischemic heart disease, left ventricle, revascularization.

**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 Privolzhsky Research Medical University (Protocol No. 2 of 08.02.2017).

**For citation:** Vasiliev A.Yu., Petrova E.B., Fedorova M.V., Efimova S.B., Kordatov P.N. The results of standard echocardiography and use of Velocity Vector Imaging technology after surgical revascularization in patients with coronary artery disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 31–43. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-31-43>.

## ВВЕДЕНИЕ

Стандартное эхокардиографическое (эхоКГ) исследование играет важную роль в диагностике ишемической болезни сердца (ИБС) и оценке функции миокарда левого желудочка (ЛЖ) до и после хирургической реваскуляризации. По данным литературы, показателями, влияющими на выживаемость пациентов в ранние и отдаленные сроки, являются: фракция выброса (ФВ), индекс конечно-систолического объема (КСО) ЛЖ, а также количество зон жизнеспособного миокарда [1–4]. При этом диастолическая функция (ДФ) рассматривается как ранний маркер ишемии [5–8]. Оценка сократительной функции при стандартном эхоКГ исследовании не несет существенной информации о прогнозе функции ЛЖ в послеоперационном периоде [4]. Это связано с тем, что сократимость – более сложный процесс, связанный с взаимодействием продольных, циркулярных и радиальных волокон, функцию которых при стандартном ультразвуковом исследовании визуально оценить невозможно [9]. Технология визуализация вектора скорости движения миокарда, или Velocity Vector Imaging (VVI), позволяет провести детальный анализ продольных, циркулярных и радиальных волокон ЛЖ с оценкой их деформации S и скорости деформации SR, а также изучить диастолическую и ротационную функцию [10, 11].

Хирургическая реваскуляризация приводит к улучшению функции ЛЖ и демонстрирует хорошие отдаленные результаты, однако в ряде случаев в ранние сроки отмечается отрицательная динамика [12–14]. По мнению ряда авторов, это может быть связано со структурно-функциональными изменениями миокарда в ответ на хирургическое вмешательство, с реперфузионным синдромом, отеком миокарда и системным воспалительным ответом у пациентов, оперированных в условиях искусственного кровообращения [15, 16].

Цель исследования – оценить влияние хирургической реваскуляризации на функцию левого желудочка при использовании стандартного эхокардиографического исследования и технологии VVI в ранние и отдаленные сроки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 40 пациентов с ИБС в возрасте 44–75 лет, из них 7 (17,5%) женщин и 33 (82,5%) мужчины. Средний возраст составил  $(60,0 \pm 7,0)$  лет. Перенесенный инфаркт миокарда (ИМ) без патологического зубца Q имели 12 (30,0%), Q-образующий ИМ – 12 (30,0%), ИБС без ИМ – 9 (22,5%) и Q-образующий ИМ с формированием постинфарктной аневризмы (ПИАС) – 7 (17,5%) пациентов. Большинство имели в анамнезе один перенесенный ИМ (28 (90,3%)) и сопутствующую артериальную гипертензию (39 (97,5%)). Коронарный анамнез у всех обследованных составил в среднем  $(3,6 \pm 4,2)$  лет (от 5 мес до 16 лет), срок от перенесенного ИМ до госпитализации  $(3,2 \pm 4,4)$  года (от 5 мес до 16 лет). Острого ИМ не отмечено. При анализе вида ИМ показано преобладание нижнего ИМ (10 (25,0%)) и переднего (5 (12,1%)).

Данные чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) показали доминирование правого типа коронарного кровотока у большинства пациентов (35 (87,5%)), левый тип зарегистрирован у трех (5,0%), сбалансированный – у трех (7,5%) обследованных. Поражение ствола левой коронарной артерии отмечено у 15 (37,5%) человек.

Трехсосудистое поражение отмечено у 31 (77,5,7%) пациента, двухсосудистое – у 9 (22,5%). При анализе коронарного русла выявлено доминирование стенозов со степенью тяжести 71–99% (71 (39,5%) поражений) с преобладанием поражения бассейна передней нисходящей артерии. У 10 (25,0%) пациентов в зоне окклюзии коронарных артерий обнаружено развитие коллатерального кровотока.

Всем больным проведена полная реваскуляризация коронарного русла. Было сформировано 106 шунтов. Коронарное шунтирование (КШ) трех артерий выполнено у 18 (45,0%) пациентов, двух артерий – у 14 (35,0%) и у восьми (20,0%) отмечено шунтирование трех и четырех артерий. Пластика ПИАС отмечена у шести (85,7%), тромбэктомия – у двух (28,5%) обследованных. Длительность перфузии составила в среднем  $87,6 \pm 38,0$ ; от 32 до 198 мин; пережатие аорты –  $64,0 \pm 30,8$ ; от 31 до 149 мин. Летальных исходов не было.

ЭхоКГ исследование выполняли на ультразвуковом сканере Acuson X 300 (Siemens, США) секторным мультитемновым датчиком 5–1 МГц в двухмерном режиме визуализации из парастернальной и апикальной позиций по длинной и короткой осям в режиме второй гармоники с использованием импульсно-волнового, постоянно-волнового доплеровского исследования кровотока и цветного картирования потоков в сроки до, после и спустя 6, 12 и 24 мес после реваскуляризации.

При стандартной эхоКГ в покое осуществлялся анализ систолической функции ЛЖ согласно модифицированному методу Симпсона с вычислением индексов объемов ЛЖ в систолу и диастолу (индекс КСО и КДО) и ФВ. Изучение ДФ осуществляли по трансмитральному потоку при оценке соотношения пиков раннего (пик Е) и позднего диастолического наполнения (пик А) ЛЖ, а оценка сократительной функции ЛЖ проводилась согласно рекомендациям Американского эхокардиографического общества совместно с Европейской эхокардиографической ассоциацией при делении ЛЖ на 17 сегментов с расчетом индекса нарушения локальной сократимости (ИНЛС) [17].

Анализ деформационных и ротационных свойств миокарда ЛЖ проводился в режиме постобработки с помощью системы Syngo VVI (Siemens Medical Solutions USA Inc., США). При исследовании ЛЖ с помощью Velocity Vector Imaging оценивались продольные, радиальные и циркулярные волокна ЛЖ. Проводился анализ продольного, радиального, циркулярного S и SR. Деление ЛЖ на сегменты осуществлялось системой Syngo VVI автоматически, согласно заданному алгоритму на 18 сегментов [17]. Всего было проанализировано 720 сегментов. Функцию продольных волокон изучали в апикальных 2-, 4-, 5-камерных позициях. В каждой позиции анализировали по шесть сегментов. Исследование цир-

кулярных, радиальных волокон и показателей ротации проводили из парастернального доступа в поперечном сечении ЛЖ на уровне митрального клапана, папиллярных мышц и на уровне верхушки. В каждом поперечном сечении оценивалось шесть сегментов.

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для оценки статистической значимости количественных различий между несвязанными группами использовался непараметрический критерий Манна – Уитни, между связанными группами – критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm sd$ , где  $M$  – среднее значение,  $sd$  – стандартное отклонение; минимальных и максимальных значений  $Min-Max$ ; медианы, 25-го и 75-го квартилей  $Me [Q_1; Q_3]$ . При сравнении нескольких показателей в динамике на разных сроках наблюдения при множественных сравнениях и оценке уровня значимости использовался критерий Фридмана. При уровне значимости  $p < 0,05$  проводилось попарное сравнение групп с оценкой критерия Манна – Уитни с поправкой Бонферони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные стандартного эхоКГ исследования показали, что в среднем у всех пациентов до и после реваскуляризации получены нормальные значения показателей систолической и диастолической функции ЛЖ. Динамики объемов ЛЖ и ФВ в ранние и отдаленные сроки не зафиксировано. Изучение ДФ ЛЖ показало, что положительная динамика зарегистрирована на 12-е сут, которая сохранялась на протяжении всего срока наблюдения. Значимое улучшение сократительной функции отмечалось на протяжении 6 мес наблюдения с отсутствием значимых изменений через 12 и 24 мес (табл. 1).

Таблица 1

Table 1

Показатели систолической функции ЛЖ до и после КШ по данным стандартного эхоКГ исследования, $M \pm sd, Min-Max, Me [Q_1; Q_3], n = 40$ Parameters of LV systolic function before and after CABG according to the standard EchoCG study, $M \pm sd, Min-Max, Me [Q_1; Q_3], n = 40$						
Показатель Parameter	До КШ Befor CABG	12 сут 12 days	6 мес 6 months	12 мес 12 months	24 мес 24 months	Средн. Aver.
	1	2	3	4	5	$p$
Индекс КДО, мл / м <sup>2</sup> EDV index, ml / m <sup>2</sup>	61,4 ± 15,1 40–92 58 [49,0; 77,0]	58,1 ± 12,1 36–85 57 [49,0; 64,0]	57,5 ± 11,6 40–92 55 [52,0; 66,0]	61,0 ± 13,9 41–96 61 [51,0; 67,0]	67,4 ± 18,2 52–118 61 [55,0; 75,0]	0,13



Окончание табл. 1  
End of table 1

Показатель Parameter	До КШ Befor CABG	12 сут 12 days	6 мес 6 months	12 мес 12 months	24 мес 24 months	Средн. Aver.
	1	2	3	4	5	<i>p</i>
Индекс КСО, мл / м <sup>2</sup> ESV index, ml / m <sup>2</sup>	27,5 ± 10,3 12–52 24 [20,5; 34,0]	25,5 ± 8,6 13–51 23 [20,0; 30,0]	24,3 ± 8,2 15–52 23 [19,0; 31,0]	26,8 ± 10,9 17–60 26 [20,0; 35,0]	32,8 ± 15,8 21–79 26 [23,0; 37,0]	0,32
ФВ, % EF, %	54,2 ± 7,0 39–70 55 [50,0; 58,5]	55,3 ± 6,8 38–67 56 [50,5; 59,5]	57,1 ± 5,6 43–68 57 [54,0; 61,0]	56,3 ± 6,4 36–67 57 [53,0; 59,0]	52,5 ± 8,3 32–61 56 [48,0; 57,5]	0,79
ДФ ЛЖ* DF LV*	1,04 ± 0,75 0,42–3,8 0,81 [0,67; 1,0]	1,20 ± 0,59 0,56–3,7 1,15 [0,79; 1,32] <i>p</i> <sub>1-2</sub> = 0,008	1,32 ± 0,62 0,61–4,0 1,12 [0,88; 1,67] <i>p</i> <sub>1-3</sub> = 0,02	1,24 ± 0,68 0,56–4,0 1,02 [0,82; 1,47] <i>p</i> <sub>1-4</sub> = 0,02	1,23 ± 0,75 0,51–4,5 0,98 [0,82; 1,45] <i>p</i> <sub>1-5</sub> = 0,02	0,007
ИНЛС ЛЖ* WMSI LV*	1,37 ± 0,45 1,0–2,5 1,21 [1,0; 1,62]	1,31 ± 0,43 1,0–2,5 1,09 [1,0; 1,46] <i>p</i> <sub>1-2</sub> = 0,002	1,20 ± 0,31 1,0–2,1 1,03 [1,0; 1,31] <i>p</i> <sub>1-3</sub> = 0,003	1,26 ± 0,33 1,26–0,33 1,12 [1,0; 1,37] <i>p</i> <sub>1-4</sub> = 0,08	1,33 ± 0,51 1,0–2,8 1,12 [1,0; 1,37] <i>p</i> <sub>1-5</sub> = 0,16	0,0001

Примечание. КДО – конечно-диастолический объем, КСО – конечно-систолический объем, ФВ – фракция выброса, ДФ – диастолическая функция, ИНЛС – индекс нарушения локальной сократимости. Сравнение множественных показателей на разных сроках наблюдения с помощью критерия Фридмана, сравнение двух показателей с помощью теста Вилкоксона.

\* *p* – с поправкой Бонферони.

Note. EDV – end-diastolic volume, ESV – end-systolic volume, EF – ejection fraction, DF – diastolic function, WMSI – Wall Mechanic Score Index.

Comparing multiple variables with Friedman test, comparing two variables with Wilcoxon test.

\* *p* with Bonferonny correction.

При детальном анализе показателей систолической функции ЛЖ отмечено, что у 9 (22%) пациентов было отмечено снижение ФВ ( $45,0 \pm 3,7\%$ ), которая через 6 мес улучшилась ( $54,0 \pm 8,2\%$ ,  $p = 0,02$ ) и статистически значимо не изменилась спустя 2 года ( $44,7 \pm 7,3\%$ ;  $p = 0,08$ ). Увеличение индексов КДО и КСО ( $81,9 \pm 5,5$ ) и ( $41,1 \pm 6,3$ ) мл/м<sup>2</sup> исходно выявлено у 10 (25%) больных, причем 7 (70%) из них являлись пациентами с ПИАС. В ранние сроки у этих обследованных отмечались положительная динамика индекса КДО ( $71,5 \pm 10,1$  мл/м<sup>2</sup>;  $p = 0,01$ ) и отсутствие изменений индекса КСО ( $36,1 \pm 7,2$  мл/м<sup>2</sup>;  $p = 0,10$ ), а в дальнейшем статистически значимых изменений не получено.

Изучение ДФ ЛЖ показало, что тип 1 (нарушение релаксации) выявлен у 29 (72%) пациентов до КШ, у 14 (35%) в ранние сроки, у 12 (30%) спустя 6 мес, у 18 (45%) спустя 1 год и у 21 (52%) – спустя 2 года наблюдения. Динамика ДФ рестриктивного типа не так выражена: 4 (10%) – до КШ, 3 (7%) – после, 4 (10%) спустя 6 мес, 5 (12%) и 5 (12%) спустя 1 и 2 года соответственно.

Сократительная функция ЛЖ по данным визуального анализа в покое была снижена у 27 (67%) пациентов. Расчет ИНЛС показал его увеличение ( $1,3 \pm 0,4$ ) без статистически значимой динамики после реваскуляризации в ранние и отдаленные сроки (см. табл. 1). Тем не менее стоит отметить, что у 13 (32%) пациентов исходно нарушений сократимости не получено. Детальный анализ показал, что в ранние сроки после КШ нормальный ИНЛС зарегистрирован у 15 (37%), спустя 6 мес – у 17 (42%), спустя 1 год – у 15 (37%), а через 2 года – у 13 (32%) обследованных.

Спустя 6 мес жалобы на самочувствие предъявляли 11 (27%) пациентов, спустя 12 мес – 16 (40%), спустя 2 года – 9 (22%). Наиболее разнообразные жалобы отмечены спустя 6 мес после КШ, большее количество – спустя 1 год, меньшее – через 2 года. Большее количество жалоб спустя 1 год было связано с нарушением ритма (табл. 2). Следует отметить, что повторное хирургическое вмешательство (ЧКВ и стентирование шунтов) выполнено спустя 6 и 12 мес, консервативное лечение без выполнения ЧКВ зарегистрировано спустя 6 мес.

Таблица 2

Table 2

Анализ жалоб пациентов во время плановых визитов после КШ Analysis of patient's complaints during planned visits after CABG			
Жалобы Complaints	6 мес 6 months	12 мес 12 months	24 мес 24 months
Слабость Weakness	2	—	—
Высокий сахар крови High blood glucose	1	2	—
Увеличение веса Weight increase	1	2	1
Высокое артериальное давление High blood pressure	3	3	3
Сердцебиение Palpitation	1	5	—
Одышка Dyspnea	3	4	3
Отеки на ногах Edema in the legs	1	—	—
Боли за грудиной Chest pain	4	1	1
«Тяжесть в сердце» «Heaviness of heart»	2	3	2
Количество жалоб Number of complaints	18	20	10

Наряду со стандартным эхоКГ исследованием проводился анализ глобальных деформационных показателей спустя 6, 12 и 24 мес среди обследованных без жалоб и с жалобами с использовани-

ем технологии VVI (табл. 3). Следует отметить, что изучение глобальных значений S и SR в группах пациентов, предъявляющих жалобы и без них, статистически значимых различий не выявило.

Таблица 3

Table 3

Деформационные показатели у пациентов с наличием и отсутствием жалоб спустя 6, 12, 24 мес после коронарного шунтирования, $M \pm sd$ , Min–Max, Me [ $Q_1$ ; $Q_3$ ] Deformation parameters in patients with complaints and without complaints at 6, 12, 24 months after coronary bypass surgery, $M \pm sd$ , Min–Max, Me [ $Q_1$ ; $Q_3$ ]						
Показатель Parameter	Без жалоб Without complaints		С жалобами With complaints			
	S, %	SR, c <sup>-1</sup>	S, %	p	SR, c <sup>-1</sup>	p
Продольные волокна ЛЖ LV longitudinal fibers						
6 мес 6 months	-14,6 ± 2,3 (-9,6)–(-18,1) -14,1 [-16,9; -13,1]	-0,95 ± 0,18 (-0,64)–(-1,24) -1,1 [-0,85; -0,18]	-12,4 ± 4,4 (-3,7)–(-2,1) -14,1 [-14,1; -10,5]	0,10	-0,86 ± 0,30 (-0,29)–(-1,53) -0,84 [-1,0; -0,69]	0,35
12 мес 12 months	-13,9 ± 3,4 (-9,4)–(-19,1) -13,4 [-17,0; -10,3]	-0,90 ± 0,18 (-0,61)–(-1,21) -0,83 [-1,03; -0,78]	-13,0 ± 4,1 (-5,2)–(-1,3) -13,4 [-15,5; -10,3]	0,53	-0,86 ± 0,28 (-0,35)–(-1,3) -0,82 [-1,13; -0,67]	0,75
24 мес 24 months	(-12,3) ± 3,5 (-5,7)–(-15,7) -13,3 [-14,4; -11,1]	(-0,78) ± 0,23 (-0,41)–(-1,1) -0,84 [-0,72; -0,85]	(-12,3) ± 5,4 (-5,7)–(-18,4) -13,6 [-16,7; -6,1]	0,94	(-0,83) ± 0,31 (-0,39)–(-1,31) -0,82 [-0,97; -0,65]	0,77
Циркулярные волокна ЛЖ LV circular fibers						
6 мес 6 months	-16,8 ± 2,3 (-12,2)–(-21,5) -17,2 [-18,1; -14,9]	-1,10 ± 0,16 (-0,77)–(-1,3) -1,15 [-1,22; -0,98]	-14,4 ± 5,3 (-5,2)–(-24,6) -14,2 [-18,7; -11,7]	0,13	-1,03 ± 0,38 (-0,34)–(-1,9) -0,95 [-1,26; -0,88]	0,48

Показатель Parameter	Без жалоб Without complaints		С жалобами With complaints			
	S, %	SR, c <sup>-1</sup>	S, %	p	SR, c <sup>-1</sup>	p
12 мес 12 months	-16,2 ± 2,2 (-13,5)–(-20,9) -15,6 [-16,8; -14,8]	-1,11 ± 0,18 (-0,91)–(-1,40) -1,01 [-1,22; -0,98]	-14,0 ± 3,4 (-5,9)–(-18,5) -15,7 [-16,2; -11,8]	0,07	-0,95 ± 0,22 (-0,38)–(-1,31) -1,0 [-1,08; -0,88]	0,05
24 мес 24 months	-14,8 ± 3,2 (-8,3)–(-17,2) -16,3 [-17,2; -13,4]	-1,00 ± 0,22 (-0,61)–(-1,37) -1,04 [-1,1; -0,86]	-13,3 ± 4,9 (-7,7)–(-20,2) -12,6 [-17,1; -9,5]	0,47	-0,87 ± 0,35 (-0,5)–(-1,32) -0,73 [-1,32; -0,64]	0,39
Радиальные волокна LV radial fibers						
6 мес 6 months	21,0 ± 4,5 13,7–30,7 19,2 [30,7; 19,0]	1,34 ± 0,33 0,92–1,96 1,39 [1,04; 1,55]	21,9 ± 9,8 8,7–44,2 18,6 [15,6; 26,6]	0,75	1,32 ± 0,49 0,62–2,4 1,15 [1,01; 1,64]	0,86
12 мес 12 months	21,2 ± 5,4 14,7–32,0 19,5 [16,4; 24,9]	1,26 ± 0,21 0,91–1,59 1,30 [1,11; 1,45]	20,8 ± 7,2 6,5–41,9 20,4 [18,6; 22,9]	0,89	1,19 ± 0,41 0,43–2,3 1,07 [0,96; 1,4]	0,59
24 мес 24 months	20,5 ± 7,2 4,9–29,8 20,1 [19,9; 23,4]	1,23 ± 0,44 0,34–1,91 1,26 [1,17; 1,42]	14,8 ± 7,9 4,7–27,5 12,9 [10,7; 20,3]	0,17	0,99 ± 0,61 0,35–2,1 0,92 [0,56; 1,09]	0,39

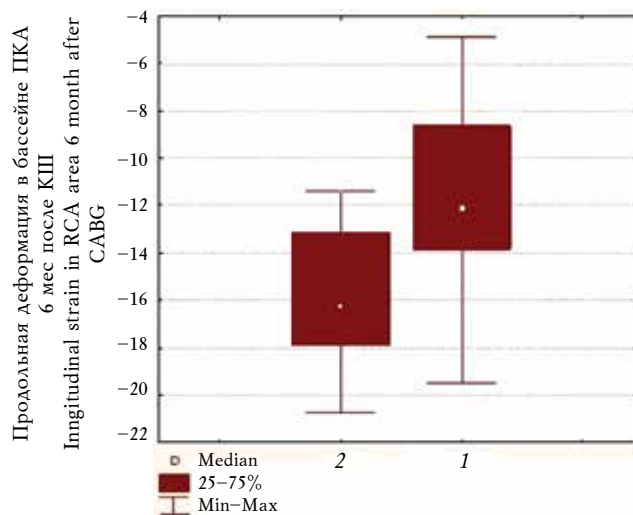
Примечание. Использовался критерий Манна – Уитни.

Note. Using Mann – Whitney test.

Дальнейший поиск привел к изучению глобальных деформационных показателей в бассейнах коронарных артерий. При этом было отмечено, что при анализе продольных волокон спустя 6 мес после КШ наблюдалось значимое снижение S в бассейне правой коронарной артерии (ПКА) в группе пациентов с жалобами ((-11,3 ± 4,2)%) по сравнению с теми, кто жалоб не имел ((-15,5 ± 2,8)%,  $p = 0,004$ ). Кроме того, в данном бассейне отмечалась тенденция к различию SR между двумя группами (-0,80 ± 0,2 – жалобы, -1,00 ± 0,2 – без жалоб,  $p = 0,07$ ). Изучая бассейн передней нисходящей артерии (ПНА), тенденция к снижению S (-11,2 ± 5,1 – жалобы, -14,2 ± 3,0 – без жалоб,  $p = 0,06$ ) отмечена в эти же сроки наблюдения (рис. 1). Спустя 1 год после КШ анализ глобальных деформационных свойств циркулярных волокон показал тенденцию к их снижению у пациентов с жалобами. Выявление статистически значимого снижения S у пациентов с жалобами (-14,3 ± 3,8%) по сравнению с теми, кто жалоб не предъявлял ((-17,1 ± 2,5)%;  $p = 0,04$ ) наблюдалось в бассейне огибающей артерии (ОА) только при изучении циркулярных волокон (рис. 2).

Таким образом, глобальные значения волокон миокарда не всегда являются критериями, указывающими на различия или динамику деформационных свойств. Очень важно в отдаленные сроки наблюдения у пациентов с жалобами при изучении

глобальных показателей ориентироваться на бассейн коронарного русла, а также проводить изучение всех волокон ЛЖ, так как значимые изменения могут начинаться не с продольных волокон.



2 – с жалобами; 1 – без жалоб;  $p = 0,004$

2 – with complaints; 1 – without complaints;  $p = 0.004$

Рис. 1. Деформация продольных волокон левого желудочка в бассейне правой коронарной артерии спустя 6 мес после коронарного шунтирования у пациентов с жалобами и без жалоб

Fig. 1. LV strain of longitudinal fibers in the right coronary artery area 6 months after CABG in patients with and without complaints

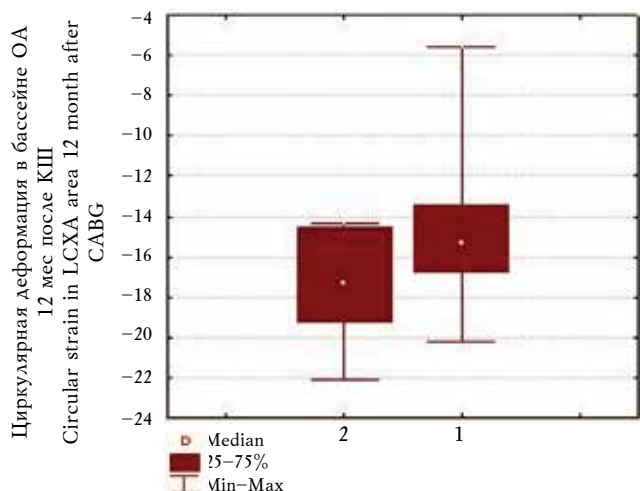


Рис. 2. Деформация циркулярных волокон левого желудочка в бассейне огибающей артерии спустя 12 мес после коронарного шунтирования у пациентов с жалобами и без жалоб

Fig. 2. LV strain of circular fibers in the left circumflex artery area 12 months after CABG in patients with and without complaints

Помимо деформационных свойств волокон ЛЖ изучались ротационные свойства (табл. 4). Анализ подвергались базальные, средние и апикальные отделы ЛЖ. В среднем показатели рота-

ции базальных отделов были в пределах нормы, тогда как в средних и апикальных — значительно снижены. Положительная динамика ротационных свойств спустя 2 года была получена в средних отделах ЛЖ, при этом отмечалось увеличение показателей по сравнению с дооперационными значениями. Вращение апикальных сегментов не изменилось.

В каждом отделе ЛЖ были выявлены изменения направления вращения, которые восстанавливались после КШ либо оставались без изменения. Тем не менее через 24 мес нарушение механики вращения было зарегистрировано только у одного пациента в апикальных отделах (рис. 3).

Наряду с изучением систолической и ротационной функции волокон миокарда ЛЖ, технология VVI позволяет дать оценку диастолической функции сегментов ЛЖ. Исследование соотношений пиков  $e$  и  $a$  показало в среднем отсутствие диастолической дисфункции (ДД) во всех волокнах ЛЖ до КШ и на протяжении всего срока наблюдения (табл. 5). Детальный анализ и диапазон изучаемых значений показал различные варианты ДД на разных сроках наблюдения. Статистически значимая динамика была отмечена при изучении продольных и радиальных волокон в ранние сроки и спустя 12 мес после КШ соответственно.

Таблица 4  
Table 4

Динамика ротационных показателей миокарда ЛЖ во всех отделах, $M \pm sd$ , Min-Max, Me [ $Q_1$ ; $Q_3$ ]						
Dynamics of rotational parameters in all parts of the LV, $M \pm sd$ , Min-Max, Me [ $Q_1$ ; $Q_3$ ]						
Отделы ЛЖ LV parts	До КШ Before CABG 1	12 сут 12 days 2	6 мес 6 months 3	12 мес 12 months 4	24 мес 24 months 5	Средн. Aver. $p$
Базальные Basal	$-4,0 \pm 5,5$ $-11,0-15,2$ $-5,2$ [-7,3; -2,7]	$-3,9 \pm 3,5$ $-11,2-5,5$ $-3,6$ [-6,6; -2,1]	$-2,8 \pm 5,7$ $-14,1-11,7$ $-3,1$ [-4,4; -2,1]	$-3,0 \pm 4,9$ $-10,0-7,4$ $-3,7$ [-6,2; -1,1]	$-3,3 \pm 4,9$ $-13,2-5,1$ $-3,6$ [-4,3; -2,8]	0,98
Средние Middle	$0,72 \pm 5,3$ $-8,1-12,5$ $1,9$ [-5,5; 4,7]	$-0,66 \pm 5,6$ $-12,0-7,6$ $1,4$ [-4,7; 4,2] $p_{1-2} = 0,28$	$1,23 \pm 3,5$ $-5,7-8,2$ $2,1$ [0,2; 3,6] $p_{1-3} = 0,13$	$1,01 \pm 3,6$ $-5,5-5,6$ $2,2$ [1,4; 3,5] $p_{1-4} = 0,81$	$3,7 \pm 4,1$ $-5,9-10,0$ $4,4$ [1,8; 4,5] $p_{1-5} = 0,04^*$	0,02
Апикальные Apical	$1,81 \pm 5,9$ $-12,6-11,6$ $3,2$ [-4,1; 5,1] $p_{1-5} = 0,93$	$2,03 \pm 5,0$ $-11,2-14,3$ $3,2$ [-1,8; 4,3] $p_{1-2} = 0,86$	$0,28 \pm 6,2$ $-22,4-6,2$ $3,0$ [-3,3; 3,6] $p_{2-3} = 0,22$	$1,00 \pm 5,7$ $-14,4-11,4$ $2,1$ [-2,7; 4,0] $p_{3-4} = 0,66$	$1,94 \pm 4,2$ $-6,5-6,9$ $3,1$ [2,2; 4,1] $p_{4-5} = 0,56$	0,09

Примечание. Сравнение множественных показателей на разных сроках наблюдения проводилось с помощью критерия Фридмана, сравнение двух показателей — теста Вилкоксона.

\*  $p$  — с поправкой Бонферони.

Note. Comparing multiple variables with Friedman test, comparing two variables with Wilcoxon test.

\*  $p$  — with Bonferonny correction.



Рис. 3. Нарушение механики вращения левого желудочка по данным технологии Velocity Vector Imaging

Fig. 3. Change of left ventricle rotation mechanics based on Velocity Vector Imaging

Таблица 5  
Table 5

Динамика диастолической функции сегментов ЛЖ ( $n = 720$ ) до и в разные сроки после КШ, $M \pm sd, Min-Max, Me [Q_1; Q_3]$						
Dynamics of diastolic function of LV segments ( $n = 720$ ) before and at different times after CABG, $M \pm sd, Min-Max, Me [Q_1; Q_3]$						
Показатель Parameter	До КШ Before CABG 1	12 сут 12 days 2	6 мес 6 months 3	12 мес 12 months 4	24 мес 24 months 5	Средн. Aver. $p$
Продольные волокна ЛЖ LV longitudinal fibers						
$e/a$	$1,47 \pm 0,43$ $0,51-2,7$ $1,45$ $[1,25; 1,58]$	$1,64 \pm 0,32$ $1,03-2,5$ $1,61$ $[1,43; 1,88]$ $p_{1-2} = 0,04$	$1,33 \pm 0,31$ $0,69-1,89$ $1,34$ $[1,05; 1,60]$ $p_{1-3} = 0,21$	$1,51 \pm 0,33$ $0,95-2,25$ $1,45$ $[1,26; 1,77]$ $p_{1-4} = 0,17$	$1,32 \pm 0,28$ $0,77-1,69$ $1,33$ $[1,14; 1,55]$ $p_{1-5} = 0,17$	0,0003
Циркулярные волокна ЛЖ LV circular fibers						
$e/a$	$1,56 \pm 0,50$ $0,76-3,1$ $1,52$ $[1,21; 1,77]$ $p_{1-5} = 0,35$	$1,66 \pm 0,38$ $1,03-2,6$ $1,57$ $[1,34; 1,95]$ $p_{1-2} = 0,35$	$1,60 \pm 0,29$ $1,19-2,2$ $1,57$ $[1,37; 1,82]$ $p_{2-3} = 0,55$	$1,50 \pm 0,33$ $0,84-2,25$ $1,48$ $[1,24; 1,78]$ $p_{3-4} = 0,22$	$1,63 \pm 0,33$ $1,06-2,2$ $1,58$ $[1,25; 1,81]$ $p_{4-5} = 0,30$	0,21
Радиальные волокна ЛЖ LV radial fibers						
$e/a$	$1,24 \pm 0,59$ $0,51-(-2,8)$ $-1,21$ $[-1,52; -1,0]$	$-1,35 \pm 0,44$ $(-0,28)-(-2,3)$ $-1,32$ $[-1,71; -1,1]$ $p_{1-2} = 0,10$	$-0,15 \pm 0,52$ $1,12-(-1,59)$ $-0,11$ $[-0,48; 0,15]$ $p_{1-3} = 0,003$	$-1,25 \pm 0,33$ $(-0,59)-(-2,14)$ $-1,24$ $[-1,55; -0,95]$ $p_{1-4} = 0,55$	$-1,22 \pm 0,51$ $(-0,08)-(-2,3)$ $-1,24$ $[-1,46; -0,91]$ $p_{4-5} = 0,39$	0,02

Примечание. Сравнение множественных показателей на разных сроках наблюдения проводилось с помощью критерия Фридмана, сравнение двух показателей – теста Вилкоксона.

\*  $p$  – с поправкой Бонферони.

Note. Comparing multiple variables with Friedman test, comparing two variables with Wilcoxon test.

\*  $p$  – with Bonferonny correction.

Детальный анализ показал, что при исследовании продольных волокон выявлено меньшее количество пациентов с  $\Delta\Delta$  на протяжении наблюдения от 6 мес до 2 лет. Спустя 2 года наблюдения  $\Delta\Delta$  типа 1 отмечалась только у двух обследованных.

Значительное увеличение  $\Delta\Delta$  типа 1 спустя 6 мес после КШ зарегистрировано при изучении радиальных волокон (20 (50%) пациентов) с про-

грессивным снижением через 1 год со стабильным результатом (3 пациента) после операции.  $\Delta\Delta$  рестриктивного типа спустя 2 года после КШ отмечалась только у 1 пациента.

Диастолическая дисфункция циркулярных волокон спустя 6 мес представлена рестриктивным типом у двух, через 1 год – у одного с дальнейшим стабильным результатом (рис. 4).

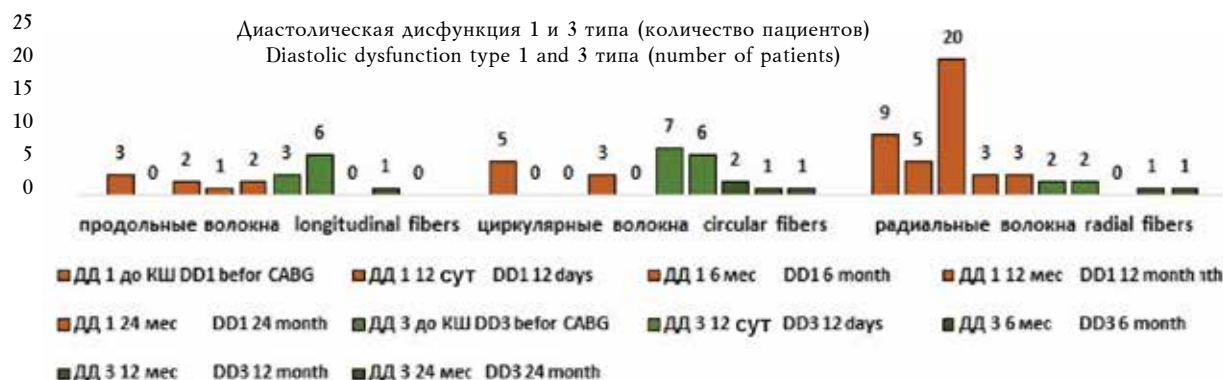


Рис. 4. Диастолическая дисфункция волокон ЛЖ по данным технологии Velocity Vector Imaging

Fig. 4. Diastolic dysfunction of LV fibers based on Velocity Vector Imaging

## ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, был проведен комплексный анализ функции миокарда ЛЖ, включающий в себя стандартное эхоКГ исследование и использование технологии Velocity Vector Imaging на протяжении 2 лет наблюдения у 40 пациентов с ИБС и (или) перенесенным ИМ.

Стандартное эхоКГ исследование на протяжении 2 лет наблюдения показало стабильный результат в отношении объемов и ФВ ЛЖ, отсутствие существенного изменения сократительной функции миокарда и улучшение диастолической функции ЛЖ по сравнению с дооперационными значениями.

Изменения в лучшую сторону, безусловно, связаны с восстановлением коронарного кровотока в пораженных артериях, тогда как отрицательные в ранние сроки можно связать с реперфузионным синдромом и адаптацией миокарда к новым условиям функционирования [14–16]. Если в отдаленные сроки значимых изменений систолической функции отмечено не было, то при изучении ДФ ЛЖ получено увеличение количества пациентов с типом 1 ко 2-му году наблюдения (21 (52%)). Опираясь на литературные данные, можно заключить, что ДД является критерием ишемии [5–8]. Действительно, спустя 6, 12 и 24 мес были выявлены пациенты с различными жалобами, в том числе связанными с дискомфортом за грудиной, однако были и те, кто отмечал стойкие подъемы артериального давления. Следует отметить, что в ранние сроки после КШ может наблюдаться улучшение ДФ ЛЖ, связанное с влиянием ингаляционной анестезии на параметры релаксации миокарда [19, 20]. Возврат к дооперационным значениям может быть связан с наличием у пациентов сопутствующей артериальной гипертензии (39 (97%)), а ухудшение или

переход в другой тип дисфункции должен сопровождаться комплексным обследованием.

Что касается сократительной функции, то явных ухудшений в отдаленные сроки не отмечено, тем не менее незначительное уменьшение количества пациентов с нормальным ИНЛС выявлено спустя 2 года. Использование технологии VVI в изучении глобальных значений деформации и скорости деформации и их динамики на протяжении 2 лет после КШ позволило выявить причину ухудшения показателей стандартного эхоКГ исследования, особенно это касалось пациентов, предъявляющих жалобы. При этом наиболее значимые изменения деформационных показателей оказались в бассейнах коронарных артерий при изучении продольных и циркулярных волокон. Следует отметить, что как в ранние, так и в отдаленные сроки после КШ изучение функции всех волокон является целесообразным, что согласуется с данными литературы о значимости циркулярного S. Не только продольная, циркулярная, но и радиальная деформация свидетельствуют о дисфункции ЛЖ до снижения ФВ [21, 22].

Изучение диастолической и ротационной функции волокон ЛЖ с использованием технологии VVI показало хорошую положительную динамику на протяжении 2 лет наблюдения, что согласуется с данными литературы [23].

## ВЫВОДЫ

1. Стандартное эхоКГ исследование при динамическом наблюдении после коронарного шунтирования в сроки 6, 12, 24 мес в среднем показало стабильный результат со стороны показателей систолической функции, улучшение со стороны диастолической и отсутствие существенного изменения сократительной функции ЛЖ по сравнению с дооперационными значениями.



2. Детальный анализ показал, что к 2-летнему сроку наблюдения после коронарного шунтирования, по данным стандартного эхоКГ исследования, отмечались увеличение количества пациентов с диастолической дисфункцией типа 1 по сравнению с ранними сроками и незначительный прирост количества пациентов с увеличением индекса нарушения локальной сократимости.

3. Использование технологии Velocity Vector Imaging в отдаленные сроки наблюдения позволяет оценить значимость изменений показателей стандартного эхоКГ исследования исходя из анализа глобальных деформационных свойств волокон миокарда в бассейнах коронарных артерий.

4. При использовании технологии Velocity Vector Imaging в отдаленные сроки у пациентов с жалобами было выявлено статистически значимое снижение S продольных волокон в бассейне ПКА спустя 6 мес после КШ и снижение S циркулярных волокон в бассейне ОА спустя 1 год после реваскуляризации.

5. Хирургическая реваскуляризация привела к улучшению диастолической и ротационной функции волокон миокарда на протяжении 2 лет наблюдения.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дор В., Ди Донато М., Сивая Ф. Постинфарктное ремоделирование левого желудочка: магнитно-резонансная томография для оценки патофизиологии после реконструкции левого желудочка. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 2014; 3: 14–27. [Dor V., Di Donato M., Civaia F. Post myocardial infarct left ventricular remodeling: role of magnetic resonance imaging for the assessment of its pathophysiology after left ventricular reconstruction. *Grudnaya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2014; 3: 14–27 (in Russ.)].
2. Bonow R.O., Castelvichio S., Panza J.A., Berman D.S., Velazquez E.J., Michler R.E., She L., Holly T.A., Desvigne-Nickens P., Kosevic D., Rajda M., Chrzanowski L., Deja M., Lee K.L., White H., Oh J.K., Doenst T., Hill J.A., Rouleau J.L. Ischemic left ventricular dysfunction: severity of remodeling, myocardial viability and survival after surgical revascularization. *JACC Cardiovasc. Imaging*. 2015; 8 (10): 1121–1129. DOI: 10.1016/j.jcmg.2015.03.013.
3. Kancharla K., Weissman G., Elagha A.A., Kancherla K., Samineni S., Hill P.C., Boyce S., Fuisz A.R. Scar quantification by cardiovascular magnetic resonance as an independent predictor of long – term survival in patients with ischemic heart failure treated by coronary artery bypass graft surgery. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2016; 18 (1): 45. DOI: 10.1186/s12968-016-0265-y.
4. Prior D.L., Stevens S.R., Holly T.A., Krejca M., Paraforos A., Pohost G.M., Byrd K., Kukulski T., Jones R.H., Desvigne-Nickens P., Varadarajan P., Amanullah A., Lin G., Al-Khalidi H.R., Aldea G., Santambrogio C., Bochenek A., Berman D.S. Regional left ventricular function does not predict survival in ischemic cardiomyopathy after cardiac surgery. *Heart*. 2017; 103 (17): 1359–1367. DOI: 10.1136/heartjnl-2016-310693.
5. Liu S., Moussa M., Wassef A.W., Hiebert B.M., Hussain F., Jassal D.S. The utility of systolic and diastolic echocardiographic parameters for predicting coronary artery disease burden as defined by the SYNTAX Score. *Echocardiography*. 2016; 33: 14–22. DOI: 10.1111/echo.12995.
6. Azarisman S.M., Teo K.S., Worthley M.I., Worthley S.G.. Cardiac magnetic resonance assessment of diastolic dysfunction in acute coronary syndrome. *J. Int. Med. Res.* 2017; 45 (6): 1680–1692. DOI: 10.1177/0300060517698265.
7. Cacciapuoti F., Magro V.M., Caturano M., Lama D., Cacciapuoti F. The role of ivabradine in diastolic heart failure with preserved ejection fraction. A doppler-echocardiographic study. *J. Cardiovasc. Echogr.* 2017; 27 (4): 126–131. DOI: 10.4103/jcecho.jcecho\_6\_17.
8. Mansour M.J., Aljaroudi W., Mroueh A., Hamoui O., Honeine W., Khoury N., Nassif J.A., Chammas E. Stress-induced worsening of left ventricular diastolic function as a marker of myocardial ischemia. *J. Cardiovasc. Echogr.* 2017; 27 (2): 45–51. DOI: 10.4103/jcecho.jcecho\_44\_16.
9. Alizadehasl A., Sadeghpour A., Hali R., Bakhshandeh Abkenar H., Badano L. Assessment of left and right ventricular rotational interdependence: A speckle tracking echocardiographic study. *Echocardiography*. 2017; 34 (3): 415–421. DOI: 10.1111/echo.13452.
10. Smiseth O.A., Torp H., Opdahl A., Haugaa K.H., Urheim S. Myocardial strain imaging: how useful is it in clinical decision making? *European Heart Journal*. 2016; 37 (15): 1196–1207. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv529.
11. Claus P., Omar A.M., Pedrizzetti G., Sengupta P.P., Nagel E. Tissue tracking technology for assessing cardiac mechanics: principles, normal values, and clinical applications. *J. Am. Coll. Cardiol. Img.* 2015; 8 (12): 1444–1460. DOI: 10.1016/j.jcmg.2015.11.001.
12. Yee N.P., Siu A.M., Davis J., Kao J. Recovery of left ventricular function after percutaneous coronary intervention compared to coronary artery bypass grafting in patients with multi-vessel coronary disease and left ventricular dysfunction. *Hawaii J. Med. Public Health*. 2016; 75 (9): 273–277. PMID: 27688953 PMCID: PMC5030790.
13. Hwang H.Y., Yeom S.Y., Choi J.W., Oh S.J., Park E.A., Lee W., Kim K.B. Cardiac magnetic resonance predictor of ventricular function after surgical coronary revascularization. *J. Korean Med. Sci.* 2017; 32 (12): 2009–2015. DOI: 10.3346/jkms.2017.32.12.2009.
14. Koene R.J., Kealhofer J.V., Adabag S., Vakil K., Florea V.G. Effect of coronary artery bypass graft surgery on left ventricular systolic function. *J. Thorac. Dis.* 2017; 9 (2): 262–270. DOI: 10.21037/jtd.2017.02.09.
15. Бузиашвили Ю.И., Кокшенова И.В., Самсонова Н.Н., Абуков С.Т., Бузиашвили В.Ю., Климович А.Г. Динамика уровня факторов воспалительной реакции в

- раннем послеоперационном периоде при различных методиках коронарного шунтирования. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2015; 8 (1): 4–11. [Buziashvili Yu.I., Koksheneva I.V., Samsonova N.N., Abukov S.T., Buziashvili V.Yu., Klimovich L.G. The dynamics of inflammatory factors in the early postoperative period after various techniques of coronary artery bypass grafting. *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2015; 8 (1): 4–11 (in Russ.)]. DOI: 10.17116/kardio2015814-11.
16. Panza J.A., Velazquez E.J., She L., Smith P.K., Nicolau J.C., Favalaro R.R., Gradinaru S., Chrzanowski L., Prabhakaran D., Howlett J.G., Jasinski M., Hill J.A., Szwed H., Larbalestier R., Desvigne-Nickens P., Jones R.H., Lee K.L., Rouleau J.L. Extent of coronary and myocardium disease and benefit from surgical revascularization in ischemic LV dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 64 (6): 553–561. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.04.064.
  17. Lang R.M., Badano L.P., Mor-Av V., Aflalo J., Armstrong A., Ernande L., Flachskampf F.A., Foster E., Goldstein S.A., Kuznetsova T., Lancellotti P., Muraru D., Picard M.H., Rietzschel E.R., Rudski L., Spencer K.T., Tsang W., Voigt J.-U. Recommendation for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *European Heart Journal – Cardiovascular Imaging*. 2015; 16 (3): 233–271. DOI: 10.1093/ehjci/jev014.
  18. Хельсинская декларация ВМА: Этические принципы медицинских исследований с привлечением человека, принятая 18-й Генеральной Ассамблеей ВМА (Хельсинки, Финляндия, июнь 1964 г.). [http://www.psychiatr.ru/lib/helsinki\\_declaration.php](http://www.psychiatr.ru/lib/helsinki_declaration.php). (дата обращения: 25.05.2015) [Helsinki declaration of VMA: Ethical principles of medical researches with involvement of the person, Accepted by the 18th General Assembly of VMA (Helsinki, Finland, June, 1964). [http://www.psychiatr.ru/lib/helsinki\\_declaration.php](http://www.psychiatr.ru/lib/helsinki_declaration.php). (date of the address: 25.05.2015) (in Russ.)].
  19. Salehi N., Saidi M., Rai A., Najafi F., Javeedannejad S., Babanejad M., Tadbiri H. Effect of percutaneous coronary intervention on left ventricular diastolic function in patients with coronary artery disease. *Glob. J. Health. Sci.* 2015; 8 (1): 270–276. DOI: 10.5539/gjhs.v8n1p270.
  20. Ammar A., Mahmoud K., Elkersh A., Kasemy Z. A randomised controlled trial comparing the effects of propofol with isoflurane in patients with diastolic dysfunction undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Anaesthesia*. 2016; 71 (11): 1308–1316. DOI: 10.1111/anae.13564.
  21. Sugimoto T., Dulgheru R., Bernard A., Ilardi F., Contu L., Addetia K., Caballero L., Akhaladze N., Athanassopoulos G.D., Barone D., Baroni M., Cardim N., Hagedorff A., Hristova K., Lopez T., de la Morena G., Popescu B.A., Moonen M., Penicka M., Ozyigit T., Rodrigo Carbonero J.D., van de Veire N., von Bardeleben R.S., Vinereanu D., Zamorano J.L., Go Y.Y., Rosca M., Calin A., Magne J., Cosyns B., Marchetta S., Donal E., Habib G., Galderisi M., Badano L.P., Lang R.M., Lancellotti P. Echocardiographic reference ranges for normal left ventricular 2D strain: results from the EACVI NORRE study. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*. 2017; 18 (8): 833–840. DOI: 10.1093/ehjci/jex140.
  22. Stokke T.M., Hasselberg N.E., Smedsrud M.K., Sarvari S.I., Haugaa K.H., Smiseth O.A., Edvardsen T., Remme E.W. Reply: Interaction between longitudinal, circumferential, and radial deformations and their contributions to ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018; 71 (2): 257–258. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.10.090.
  23. Cheng N., Cheng L., Wang R., Zhang L., Gao C. The improvement of torsion assessed by cardiovascular magnetic resonance feature tracking after coronary artery bypass grafting: a sensitive index of cardiac function. *Heart Surg. Forum*. 2017; 20 (1): E026-E031. DOI: 10.1532/hsf.1655.

## Вклад авторов

Васильев А.Ю. – разработка концепции, дизайна исследования, окончательное утверждение для публикации рукописи. Петрова Е.Б. – проведение практической части исследования исходных показателей, показателей в ранние и отдаленные сроки после коронарного шунтирования с помощью технологии Velocity Vector Imaging, анализ и интерпретация данных, статистическая обработка, написание рукописи статьи. Федорова М.В. – практическая часть исследования, анализ и интерпретация полученных данных в ранние сроки наблюдения, редактирование и оформление статьи. Ефимова С.Б. – практическая часть исследования, анализ и интерпретация данных в отдаленные сроки наблюдения, редактирование статьи. Корда-тов П.Н. – практическая часть исследования исходных показателей, статистическая обработка данных.

## Authors contribution

Vasiliev A.Yu. – concept development, research design, final approval for manuscript publication. Petrova E.B. – the practical part of the study of baseline parameters in the early and long period after coronary bypass surgery, the application of Velocity Vector Imaging, data analysis and interpretation, statistical processing, writing a manuscript. Fedorova M.V. – the practical part of the study, analysis and interpretation of the data obtained in the early period after coronary bypass surgery, editing and design of the article. Efimova S.B. – the practical part of the study, analysis and interpretation of the data obtained in the long term after coronary bypass surgery, editing and design of the article. Kordatov P.N. – the practical part of the study of the baseline, statistical processing.

## Сведения об авторах

**Васильев Александр Юрьевич**, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, кафедра лучевой диагностики, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, г. Москва.

**Петрова Екатерина Борисовна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра лучевой диагностики ФДПО, Приволжский исследовательский медицинский университет, г. Нижний Новгород.

**Федорова Марина Вадимовна**, канд. мед. наук, врач-кардиолог, отделение хирургического лечения ишемической болезни сердца, Специализированная кардиохирургическая клиническая больница, г. Нижний Новгород.

**Ефимова Светлана Борисовна**, врач-кардиолог, отделение хирургического лечения ишемической болезни сердца, Специализированная кардиохирургическая клиническая больница, г. Нижний Новгород.

**Кордаков Петр Николаевич**, канд. мед. наук, врач-кардиолог, зав. отделением хирургического лечения ишемической болезни сердца, Специализированная кардиохирургическая клиническая больница, г. Нижний Новгород.

(✉) **Петрова Екатерина Борисовна**, e-mail: eshakhova@yandex.ru.

Поступила в редакцию 18.09.2018

Подписана в печать 14.12.2018

## Authors information

**Vasiliev Alexandr Yu.**, DM, Professor, Corresponding Member of the RAS, Department of Radiology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation.

**Petrova Ekaterina B.**, PhD, Associate Professor, Department of Radiology, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

**Fedorova Marina V.**, PhD, Cardiologist, Department of Surgery, Specialized Cardiological Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

**Efimova Svetlana B.**, Cardiologist, 3rd Department of Surgery, Specialized Cardiological Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

**Kordatov Petr N.**, PhD, Head of the 3rd Department of Surgery, Specialized Cardiological Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

(✉) **Petrova Ekaterina B.**, e-mail: eshakhova@yandex.ru.

Received 18.09.2018

Accepted 14.12.2018

## Изменения в эмоциональном состоянии и представлениях об образе своего тела у пациентов с дорсопатиями после курса медицинского массажа

Васильева И.В.<sup>1</sup>, Григорьев П.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Тюменский государственный университет (ТюмГУ)  
Россия, 625003, г. Тюмень, ул. Семакова, 10

<sup>2</sup> Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского  
Россия, 295007, г. Симферополь, пр. Вернадского, 4

### РЕЗЮМЕ

**Цель:** оценка изменений отношения к телу у пациентов с патологией позвоночника после восстановительных процедур (на примере массажа).

**Материалы и методы.** В исследовании участвовали 50 человек с заболеваниями позвоночника (из них имеют грыжи межпозвонковых дисков, протрузии – 13 пациентов; сколиозы – 22; остеохондрозы – 46; перенесенные травмы позвоночника – 8). Для оценки психоэмоционального состояния и отношения к телу использовались восьмицветовой вариант теста М. Люшера и модифицированная под задачи исследования методика «Цветовые метафоры» И.А. Соломина. С каждым пациентом проводился курс медицинского массажа (10 процедур). Оценка психологических параметров проводилась до и после курса медицинского массажа с целью установления их изменений. Использовались методы описательной статистики, t-критерий Стьюдента для зависимых выборок, процедура древовидной кластеризации.

**Результаты.** Средний или повышенный уровень непродуктивной нервно-психической напряженности после лечения пациентов либо существенно снизился, либо полностью нормализовался (уровень статистической значимости  $p < 0,005$ ). Установка на бездействие и оптимизацию расходования сил в большинстве случаев сменилась на активное действие, мобилизацию физических и психологических ресурсов. Психосемантический анализ указывает на то, что после процедур массажа происходит выделение в кластеры значимых жизненных ценностей, связанных со здоровьем, восприятия себя более нужным и привлекательным, есть основания судить о том, что человек перестает «уходить в болезнь» и, наоборот, «разворачивается» ко внешнему окружению, улучшаются семейные и любовно-эротические отношения.

**Заключение.** После прохождения курса медицинского массажа, помимо терапевтического эффекта, улучшается общее психоэмоциональное состояние пациентов, их психологическое отношение к собственному телу.

**Ключевые слова:** дорсопатии, массаж, отношение к телу, психосоматика, психосемантика.

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

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

**Соответствие принципам этики.** Участники исследования подписывали информированное согласие и в любой момент могли покинуть исследование. Исследование одобрено локальным этическим комитетом кафедры общей и социальной психологии Института психологии и педагогики ТюмГУ (протокол № 12 от 14.03.2018).

✉ Григорьев Павел Евгеньевич, e-mail: grigorievpe@cfuv.ru.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность В.В. Десятковой за сбор данных исследования.

**Для цитирования:** Васильева И.В., Григорьев П.Е. Изменения в эмоциональном состоянии и представлениях об образе своего тела у пациентов с дорсопатиями после курса медицинского массажа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 44–51. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-44-51>.

УДК 616.711-08:615.82]-082.5

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-44-51>

## Changes in emotional state and the perception of body image in patients with dorsopathies after a course of medical massage

Vasilieva I.V.<sup>1</sup>, Grigoriev P.E.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Tyumen State University

10, Semakova Str., Tyumen, 625003, Russian Federation

<sup>2</sup> V.I. Vernadsky Crimean Federal University

4, Vernadsky Av., 295007, Simferopol, Russian Federation

### ABSTRACT

**Objective:** to evaluate the changes in perception of body image in patients with dorsopathies after restorative procedures (with the example of massage).

**Materials and methods.** The study involved 50 patients with spinal diseases (of which 13 had intervertebral disc hernias, 13 patients had protrusions, 22 had scoliosis, 46 had osteochondrosis and 8 patients had spinal traumas). To assess the dynamics of the psychoemotional state and the attitude toward the body, we used the eight-color version of Lüscher color test and the color metaphors technique offered by I.L. Solomin and modified for the research task. Each patient was treated by a course of medical massage (10 sessions). Assessment of psychological parameters was conducted before and after the course of medical massage with the aim to establish the changes in the psychological state. The methods of descriptive statistics, the Student's test for dependent samples and the procedure of tree clustering were used.

**Results.** The average and elevated levels of non-productive neuropsychic tension after treatment of patients either significantly and statistically significantly decreased or completely normalized. Exhaustion and lethargy in most cases were replaced by higher levels of activity and mobilization of physical and psychological resources. Psychosemantic analysis indicates that after massage sessions, important life values related to health and perception of oneself as more necessary and attractive are allocated in clusters. There is a reason to conclude that a person ceases to “indulge in illness,” and opens up to the external environment, thus family and romantic relationships improve. **Conclusion.** After a course of medical massage, in addition to the therapeutic effect, patients' overall psychoemotional state and attitude toward their own bodies improve.

**Key words:** dorsopathy, massage, attitude to the body, psychosomatics, psychosemantics.

**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 included in the study signed an informed consent. The study was approved by the local ethics committee Tyumen State University (Protocol No. 12 of 14.03.2018).

**Acknowledgments.** The authors would like to thank V.V. Desyatkovskaya for collecting data for the study.

**For citation:** Vasilieva I.V., Grigoriev P.E. Changes in emotional state and the perception of body image in patients with dorsopathies after a course of medical massage. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 44–51. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-44-51>.

## ВВЕДЕНИЕ

Дорсопатия является самой распространенной причиной временной нетрудоспособности взрослого населения [1]. Ее распространенность находится на уровне 70–90% населения [2]. Показано, что среди причин распространения болезней позвоночника значимое место занимают психосоциальные факторы [3]. Дорсопатии являются факторами личностных изменений пациентов: ипохондричности [4], предпочтения копингов по типу «бегство в болезнь», «сверхконтроль» [5].

Оптимизация комплексного состояния пациента традиционно проводится с двух сторон: как собственно лечебное воздействие на соматический компонент заболевания, так и корректирующее воздействие на психологическое состояние пациента. Как правило, ожидается, что улучшение соматического состояния пациента будет способствовать улучшению его психологического состояния. В частности, для улучшения не только соматического, но и психологического статуса показана эффективность использования для пациентов с дорсопатиями биорезонансной терапии [6], физиотерапевтического комплекса, включающего световакуум и суховоздушные радоновые ванны [7], остеопатии и рефлексотерапии [8] и т.д.

Продуктивно обращение также к психологическим способам улучшения физического состояния страдающих дорсопатиями. Так, в работе [1] для облегчения болевого синдрома использовался метод психокатализа, что повлекло за собой снижение болевых ощущений.

Несомненно, важным показателем качества жизни пациента, а также самочувствия, настроения, самооценки является и его позитивное отношение к собственному телу. Поэтому в нашем исследовании внимание было уделено изменениям психологического статуса (а именно отношения к телу) у пациентов с дорсопатиями в процессе лечения медицинским массажем.

Целью исследования стала оценка изменений отношения к телу у пациентов с дорсопатиями в ходе реализации восстановительных процедур (на примере массажа). Была сформулирована гипотеза о том, что в результате восстановительных процедур, помимо того, что улучшается физическое состояние пациента (наступает терапевтический эффект), также улучшается его общее психологическое состояние и, в частности, отношение к телу. В качестве восстановительной процедуры был выбран медицинский массаж, курс для каждого пациента составил 10 сеансов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 50 человек в возрасте 18–40 лет, из них 23 мужчины, 27 женщин. Особенности выборки с точки зрения патологии позвоночника: 13 пациентов имеют грыжи межпозвонковых дисков, протрузии; 22 – сколиозы, 46 – остеохондрозы, 8 – перенесенные травмы позвоночника. Оценка отношения к телу у пациентов и оценка их психофизиологического самочувствия проводились методами, снижающими нагрузку на рациональный способ оценивания.

Для оценки психоэмоционального состояния пациентов использовался восьмицветовой вариант теста М. Люшера (модификация В.И. Тимофеева, Ю.И. Филимоненко) [9]. Рассчитывались показатели стандартного отклонения (СО) от аутогенной нормы: СО – критерий уровня выраженности нервно-психической напряженности, а также вегетативный коэффициент (ВК) – критерий уровня психофизиологической работоспособности.

Для оценки отношения к телу использовалась методика «Цветовые метафоры» И.А. Соломина [10], разработанная в рамках психосемантического подхода. Она использует тест М. Люшера в процедуре проведения и основана на следующих принципах. Если человек обозначает какое-либо понятие самым привлекательным цветом, то это может свидетельствовать о привлекательности данного понятия, о позитивном к нему отношении; и, наоборот, к понятиям, обозначенным наиболее неприятным цветом, человек и относится негативно. Обозначение различных понятий одним цветом является косвенным показателем их субъективного сходства, т. е. если два или несколько понятий человек обозначает одним цветом, то в этих понятиях есть для человека что-то общее, и он относится к ним приблизительно одинаково.

Применение методики И.А. Соломина также позволяет снизить рациональный контроль испытуемого за содержанием ответов и получить относительно «чистые» данные об образе своего тела у пациента, не связанные с действиями культурных норм относительно того, что можно и чего не следует сообщать постороннему человеку. В качестве базовых маркеров семантического пространства в методике И.А. Соломина выступают понятия «Мое увлечение», «Интересное занятие» (маркеры базовых потребностей), прошлое, настоящее и будущее как указатели удовлетворенности базовых потребностей. «Я, такой какой я есть» и «Я, каким бы я хотел быть» –



связаны с оценкой реального и идеального образа «Я». Понятия, связанные с эмоционально-положительной или негативной оценкой, позволяют квалифицировать отношение субъекта к тем или иным жизненным ситуациям, связанным с работой, семьей, отношениями со значимыми людьми. Для исследования отношения к телу в список семантических маркеров методики были добавлены понятия, связанные с телом человека и его проявлениями: «Мое тело», «Моя физическая активность», «То, как я обычно сижу», «Моя социальная активность», «Мои жесты», «Мое лицо», «Моя походка», «Моя фигура», «Мои движения (то, как я двигаюсь)», «Моя внешность», «То, как я обычно стою», «Мое физическое самочувствие». Такие дополнения предусмотрены спецификой конструкции диагностической методики и не меняют ее валидность. Добавление дополнительных семантических маркеров позволяет оценить семантику отношения к телу у пациентов до и после восстановительных мероприятий.

Использовались методы статистической обработки данных: описательная статистика (вы-

борочное среднее  $M$ , стандартное квадратичное отклонение  $\sigma$ ) для показателей ВК и СО; параметрический  $t$ -критерий Стьюдента для зависимых выборок применялся на основании результатов проверки выборок критерием Шапиро – Уилка об отсутствии статистически значимых отличий распределения эмпирических данных показателей ВК и СО от нормального; метод древовидной классификации кластерного анализа для результатов методики И.А. Соломина, представленных в категориальной шкале (в качестве правила объединения использовался метод ближайшего соседа, в качестве меры расстояния – доля (%) несогласия). Различия были статистически значимы при уровне  $p < 0,005$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка психофизиологического самочувствия посредством восьмицветового теста М. Люшера (проективного диагностического подхода) позволила получить данные о состоянии испытуемого, относительно независимые от социальной желательности (табл. 1, 2).

Таблица 1

Table 1

Выраженность нервно-психической напряженности (тест М. Люшера) у пациентов до и после лечения, $n = 50$ Intensity of neuro-psychological tension (M. Lüscher test) for patients before and after treatment, $n = 50$						
Нервно-психическая напряженность Neuro-psychological tension	Среднее Arithmetic mean	Стандартное отклонение Standard deviation	Разница средних Difference of means	Стандартное отклонение разницы средних Standard deviation of difference of means	$t$ -критерий t-test	Уровень значимости $p$ Significance level, $p$
До лечения Before treatment	13,44	5,06	2,6	2,03	9,05	<0,001
После лечения After treatment	10,84	4,72				

Таблица 2

Table 2

Выраженность психофизиологической работоспособности (тест М. Люшера) у пациентов до и после лечения, $n = 50$ Intensity of psychophysiological performance (M. Lüscher test) for patients before and after treatment, $n = 50$						
Вегетативный коэффициент Vegetative balance	Среднее Arithmetic mean	Стандартное отклонение Standard deviation	Разница средних Difference of means	Стандартное отклонение разницы средних Standard deviation of difference of means	$t$ -критерий t-test	Уровень значимости $p$ Significance level, $p$
До лечения Before treatment	1,06	0,81	-0,09	0,19	-3,28	0,001
После лечения After treatment	1,15	0,77				

Средний и повышенный уровень непродуктивной нервно-психической напряженности после лечения пациентов снизились, а у некоторых пациентов проявилось даже отсутствие непродуктивной напряженности. Истощенность,

установка на бездействие и на оптимизацию расходования сил в большинстве случаев сменились на установку на активное действие, мобилизацию физических и психологических ресурсов. Те участники исследования, которые ранее отмеча-

ли проблемы с психологическим и физическим здоровьем, после лечения утверждали, что есть изменения в их состоянии в лучшую сторону, повысилась продуктивность работы и взаимодействия с людьми в профессиональной деятельности. Большинство респондентов связывают полученные результаты с улучшением физического здоровья, устранением болевого раздражающего

компонента. Это помогло скорректировать психическое состояние пациента и улучшить отношение к своему телу.

Общие дендрограммы представлений о своем теле до и после восстановительных процедур, построенные по результатам применения методики И.А. Соломина, существенно отличаются друг от друга (рис. 1, 2).

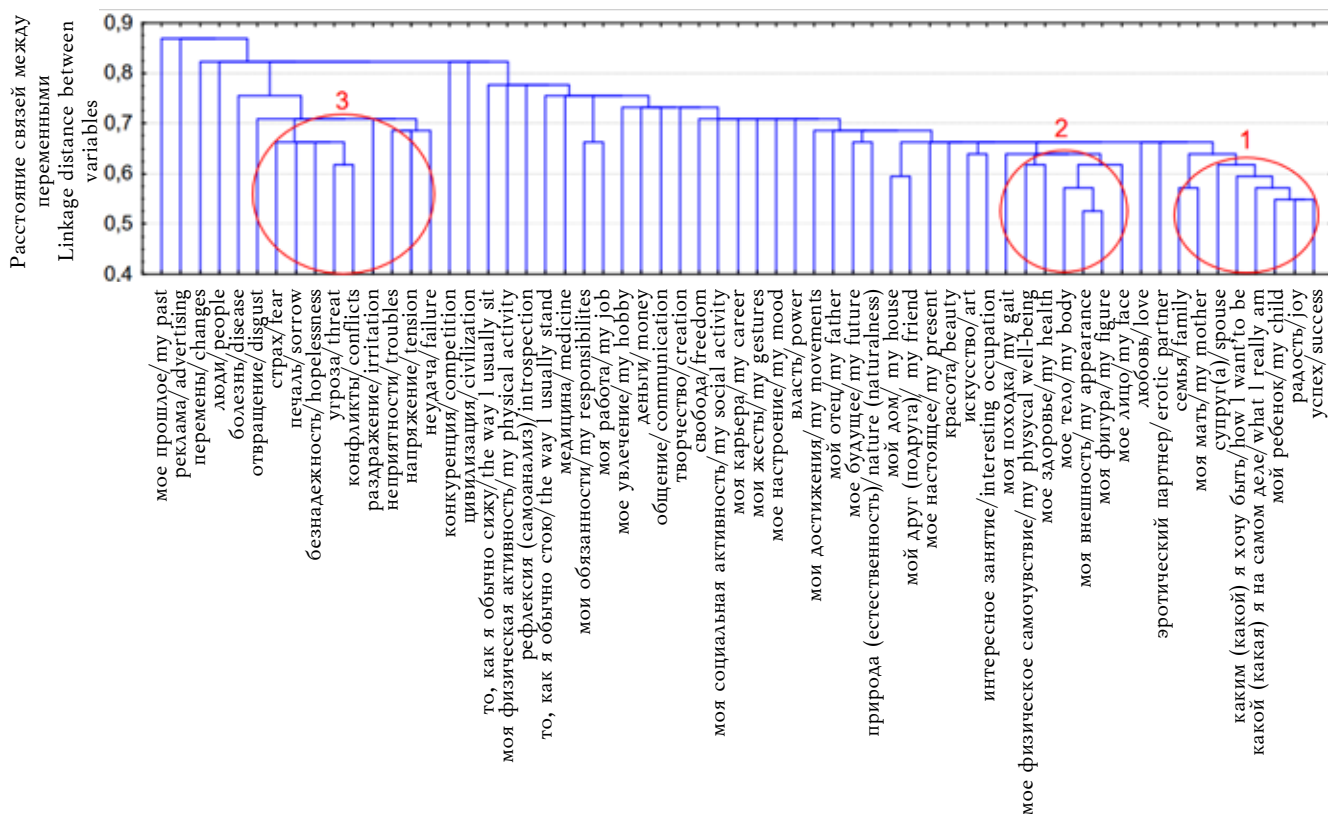


Рис. 1. Кластеры представлений образа тела у пациентов до медицинского массажа: 1 – семья и успех; 2 – физическое самочувствие и внешность; 3 – стрессовые состояния

Fig. 1. Clusters of body image representations in patients before medical massage: 1 – family and success; 2 – physical health and appearance; 3 – stress full conditions

В дендрограмме представлений о себе и образе своего тела до начала восстановительных процедур относительно четко выделяются три кластера. Первый кластер объединяет понятия «Ребенок», «Радость», «Успех», «Какой я на самом деле», «Каким я хочу быть», «Супруг(а)», «Моя мать», «Семья». В данном случае представление о себе реальном и идеальном семантически относительно гомогенны, воспринимаются эмоционально положительно и связаны с самореализацией человека в кругу семьи.

Второй кластер объединяет понятия, отражающие состояние соматического здоровья, его внешнюю репрезентацию: «Моя походка», «Мое физическое самочувствие», «Мое здоровье»,

«Мое тело», «Моя внешность», «Моя фигура», «Мое лицо». Необходимо отметить, что эти маркеры не связаны с показателями стресса в представлениях самих пациентов. Несмотря на то, что объективно пациенты, обратившиеся к процедуре массажа, испытывают как минимум дискомфорт, связанный с дисфункцией опорно-двигательного аппарата, тем не менее, они воспринимают свое состояние как нейтральное, не связанное с болезнью, страданием, стрессом.

Семантические маркеры, связанные с симптоматикой стресса, объединились в третий кластер: «Отвращение», «Страх», «Печаль», «Безнадежность», «Угроза», «Конфликты», «Раздражение», «Неприятности», «Напряжение», «Неудача».

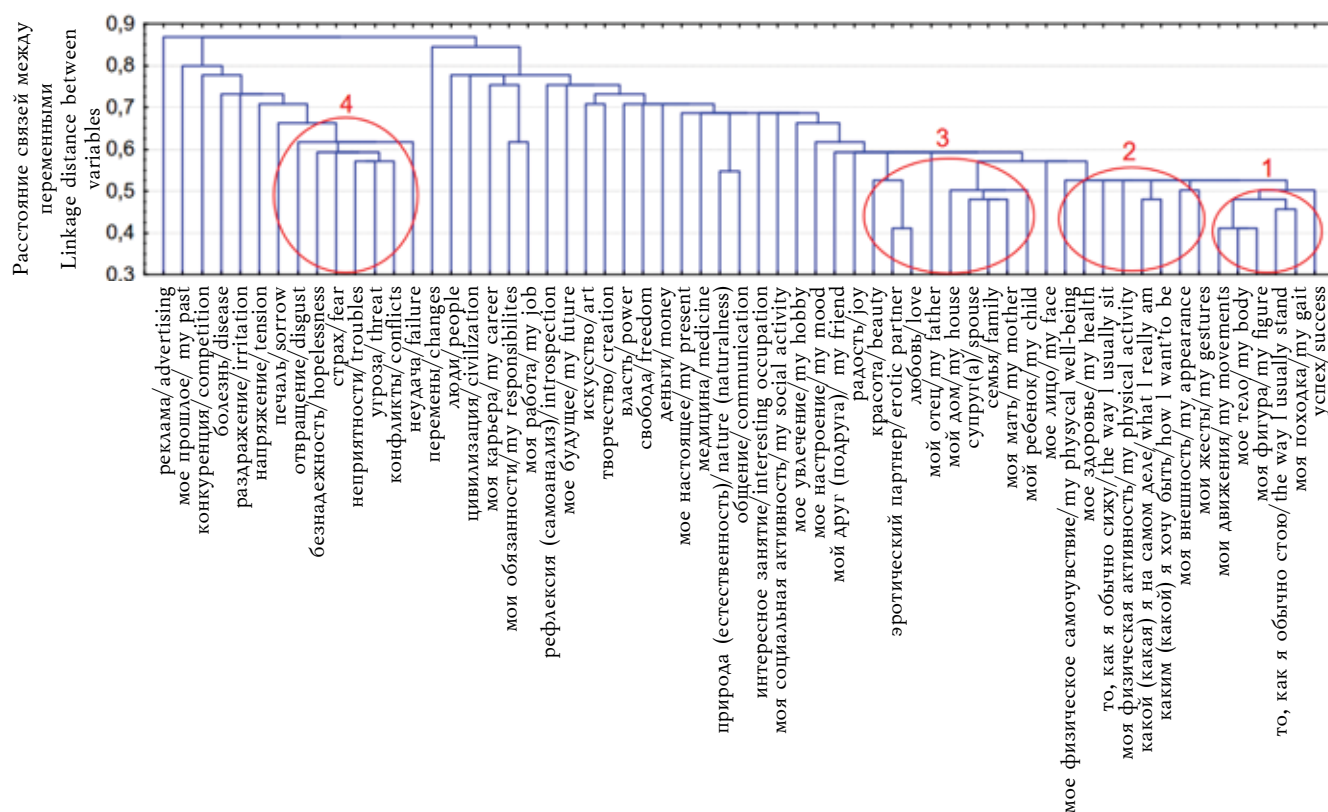


Рис. 2. Кластеры представлений образа тела у пациентов после медицинского массажа: 1 – отношение к телу; 2 – семантическая гомогенность реального и идеального образа «Я» у пациентов; 3 – семья и любовь; 4 – стрессы  
 Fig. 2. Clusters of body image representations in patients after medical massage: 1 – attitude to the body; 2 – semantic homogeneity between of the real and ideal image of the «Self» in patients; 3 – family and love; 4 – stress

Отсутствие связей с жизненными ситуациями, значимыми людьми, ведущими мотивами позволяет полагать, что испытуемые не подвержены значительному стрессовому воздействию.

Вторая дендрограмма, отражающая представления, связанные с образом тела после восстановительных процедур, в отличие от первой, более структурирована, и связи между семантическими маркерами являются более тесными, нежели ранее. Это указывает на то, что улучшение физического самочувствия позволяет пациентам улучшать свое психологическое состояние, что выражается в лучшей структурированности представлений о себе и мире.

Вторая дендрограмма содержит четыре оформленных кластера семантических маркеров. Первый кластер включает следующие маркеры: «Успех», «Моя походка», «То, как я обычно стою», «Моя фигура», «Мое тело», «Мои движения». Базовые статические и динамические характеристики соматического состояния теперь связаны у пациентов с эмоционально положительной оценкой. Отношение к телу у пациентов в ходе восстановительных процедур меняется,

причем с положительной динамикой. Исчезновение или уменьшение болей, тревожащих пациентов ранее, повышение тонуса мышц, расслабляющий эффект массажа положительно повлияли на психофизическое состояние пациентов. Второй кластер включает маркеры: «Мои жесты», «Моя внешность», «Каким я хочу быть», «Какой я есть на самом деле», «Моя физическая активность», «То, как я обычно сижу», «Мое здоровье», «Мое физическое самочувствие». Этот кластер описывает семантическую гомогенность реального и идеального образа «Я» у пациентов, но в отличие от этапа до реабилитационного воздействия сейчас самооценка пациента связана с коммуникативным аспектом жизни пациента, который оптимизирован за счет улучшившегося самочувствия и возможности проявлять физическую активность, не испытывая дискомфорт. Третий кластер, объединивший маркеры «Мой ребенок», «Моя мать», «Мой отец», «Семья», «Мой дом», «Любовь», «Эротический партнер», «Супруг», описывает улучшения, связанные с отношениями в семье. Как отмечают сами пациенты, отношения в их семьях стали теснее, появилось желание улуч-

шать качество жизни себе и близким. Четвертый кластер, объединивший понятия, сочлененные со стрессом и конфликтами, по-прежнему не связан с жизненными ситуациями и значимыми для пациентов близкими людьми.

Таким образом, после лечения произошла дифференцировка в кластеры значимых сфер жизни людей, связанных с представлениями о своем теле, семейных ценностях и потребностях. Наблюдается рост мотивации, направленный на улучшение качества собственной жизни и жизни окружающей, обусловленный, на наш взгляд, ощущением того, что пациент может это осуществить, чувствует в себе силы и определенную уверенность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нашла свое подтверждение гипотеза о том, что после прохождения курса медицинского массажа, помимо терапевтического эффекта, также улучшается общее психологическое состояние пациента и психологическое отношение к телу. В результате нормализуются нервно-психическое напряжение, а также психофизиологическая работоспособность, оцененные цветовым тестом М. Люшера. Психосемантический анализ указывает на то, что после процедур медицинского массажа в семантической сфере пациентов выделяются в кластеры значимые жизненные ценности, связанные со здоровьем, формируется образ восприятия себя как более нужный и привлекательный. Есть основания судить о том, что человек перестает «уходить в болезнь» и, наоборот, «разворачивается» ко внешнему окружению, улучшаются семейные и любовно-эротические отношения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кукшина А.А., Верещагина Д.А., Голубев М.В. Применение метода психокатализа в психотерапии болевого синдрома у пациентов с дорсопатиями. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2016; 93 (2–2): 95–96. [Kukshina A.A., Vereshchagina D.A., Golubev M.V. Application of the method of psychocatalysis in the psychotherapy of pain syndrome in patients with dorsopathy. *Questions of Balneology, Physiotherapy and Therapeutic Physical Training*. 2016; 93 (2–2): 95–96 (in Russ.)].
2. Такенов Ж.Т. Физическая реабилитация и физиофармакотерапия дорсопатии. *Нейрохирургия и неврология Казахстана*. 2016; 42 (1): 31–38. [Takenov Zh.T. Physical rehabilitation and physiopharmacotherapy of dorsopathy. *Neurosurgery and Neurology of Kazakhstan*. 2016; 42 (1): 31–38 (in Russ.)].
3. Сухова А.В., Кирьяков В.А., Яцына И.В., Преображенская Е.А., Жеглова А.В. Современные возможности использования психосоциальных факторов в диагностике производственных дорсопатий. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017; 2: 16–20. [Sukhova A.V., Kiryakov V.A., Yatsyna I.V., Preobrazhenskaya E.A., Zheglova A.V. Modern possibilities of using psychosocial factors in the diagnosis of production dorsopathies. *Occupational Medicine and Industrial Ecology*. 2017; 2: 16–20 (in Russ.)].
4. Соков Е.Л., Корнилова Л.Е., Соков Р.С. Особенности личностного профиля пациентов с хроническим болевым синдромом в спине и нижних конечностях. *Медицинский альманах*. 2014; 3 (33): 71–73. [Sokov E.L., Kornilova L.E., Sokov R.S. Characteristics of the personal profile of patients with chronic pain syndrome in the back and lower limbs. *Medical Almanac*. 2014; 3 (33): 71–73 (in Russ.)].
5. Андреева О.С., Моргун П.И. Взаимосвязь локализации болей в спине и предпочитаемых психологических защит и копинг-стратегий. *Вестник Тюменского государственного университета. Социально-экономические и правовые исследования*. 2014; 9: 196–203. [Andreeva O.S., Morgun P.I. The relationship between the localization of back pain and preferred psychological defenses and coping strategies. *Bulletin of the Tyumen State University. Socio-economic and legal research*. 2014; 9: 196–203 (in Russ.)].
6. Шарова Л.В., Кравцов Ю.И. Методы коррекции адаптационных возможностей организма человека (на примере обострений цервикальной дорсопатии). Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Физическая культура, спорт, туризм: научно-методическое сопровождение», Пермь: ПГТУ, 15–16 мая 2014 г.: 356–358. [Sharova L.V., Kravtsov Yu.I. Methods of correction of adaptive abilities of the human body (for example, exacerbations of cervical dorsopathy). Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation “Physical Culture, Sports, Tourism: Scientific and Methodological Support”, Perm: PSPU, May 15–16, 2014: 356–358 (in Russ.)].
7. Горбунов Ф.Е., Выговская С.Н., Нувахова М.Б., Дубовской А.В., Пенионжкевич Д.Ю. Световакуумная импульсная терапия в комплексе с радонотерапией в лечении больных с цервикальной дорсопатией. *Физиотерапевт*. 2013; 6: 10–15. [Gorbunov F.E., Vygovskaya S.N., Nuwahova M.B., Dubovskoi A.V., Penionzhkevich D.Yu. Light-pulsed pulse therapy in combination with radon therapy in the treatment of patients with cervical dorsopathy. *Physiotherapist*. 2013; 6: 10–15 (in Russ.)].
8. Михайлова А.А., Малаховский В.В., Поспелова А.А., Круглянин К.Д. Остеопатия и рефлексотерапия в реабилитации больных с дорсопатией шейного отдела позвоночника, сочетающейся с артериальной гипертензией I степени. *Мануальная терапия*. 2015; 1 (57):

- 33–40. [Mikhailova A.A., Malakhovsky V.V., Pospelova A.A., Kruglyanin K.D. Osteopathy and reflexotherapy in rehabilitation of patients with dorsopathia of the cervical spine, combined with arterial hypertension of the first degree. *Manual Therapy*. 2015; 1 (57): 33–40 (in Russ.)].
9. Тимофеев В.И., Филимоненко Ю.И. Цветовой тест М. Люшера (стандартизированный вариант). Методическое руководство. СПб: ГП ИМАТОН, 2001: 32. [Timofeev V.I., Filimonenko Yu.I. Color test by M. Lusher (standardized version). Methodical guidance. St. Petersburg: State Enterprise IMATON Publ., 2001: 32 (in Russ.)].
10. Соломин И.А. Психосемантическая диагностика скрытой мотивации. Методическое руководство. СПб: ГП ИМАТОН, 2001: 112. [Solomin I.A. Psychosemantic diagnosis of latent motivation. Methodical guidance. St. Petersburg: State Enterprise IMATON Publ., 2001: 112 (in Russ.)].

## Сведения об авторах

**Васильева Инна Витальевна**, канд. психол. наук, доцент, кафедра общей и социальной психологии, Институт психологии и педагогики, ТюмГУ, г. Тюмень. ORCID iD 0000-0003-0740-7260.

**Григорьев Павел Евгеньевич**, д-р биол. наук, доцент, зав. кафедрой медицинской физики и информатики, Физико-технический институт, Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, г. Симферополь; профессор, кафедра общей и социальной психологии, Институт психологии и педагогики, ТюмГУ, г. Тюмень. ORCID iD 0000-0001-7390-9109.

(✉) Григорьев Павел Евгеньевич, e-mail: grigorievpe@cfuv.ru.

## Authors information

**Vasilieva Inna V.**, PhD, Assistant Professor, General and Social Psychology Department, Institute of Psychology and Pedagogy, Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0740-7260.

**Grigoriev Pavel E.**, DBSc, Assistant Professor, Head of the Department Medical Physics and Informatics Department, Physical and Technical Institute, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation; Professor, General and Social Psychology Department, Institute of Psychology and Pedagogy, Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7390-9109.

(✉) Grigoriev Pavel E., e-mail: grigorievpe@cfuv.ru.

Поступила в редакцию 05.04.2018  
Подписана в печать 14.12.2018

Received 05.04.2018  
Accepted 14.12.2018

## Частотно-временные характеристики веретен сна при идиопатической генерализованной эпилепсии с переменным фенотипом у взрослых

Гребенюк О.В., Алифирова В.М., Светлик М.В., Левко А.Н., Катаева Н.Г.

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

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы** – изучение частотно-временных характеристик веретен сна при идиопатической генерализованной эпилепсии (ИГЭ) с переменным фенотипом у взрослых.

**Материалы и методы.** В исследуемую группу вошли 179 пациентов с дебютом ИГЭ до 18 лет, из них 102 женщины и 77 мужчин в возрасте 19–35 лет. Для изучения частотно-временных характеристик веретен сна проводили математический вейвлетный анализ.

**Результаты.** При резистентных генерализованных тонико-клонических приступах (ГТКП) максимальная длительность стационарной части веретена сна в полосе 10–12 Гц в лобных и париетальных отведениях была больше при ювенильной абсансной эпилепсии по сравнению с ювенильной миоклонической эпилепсией и ИГЭ с изолированными ГТКП. У пациентов с ремиссией ГТКП в анамнезе, принимающих противоэпилептические препараты (ПЭП), частотно-временные характеристики веретен сна не различались. Во всей группе максимальная длительность стационарной части веретен сна у пациентов с ИГЭ с переменным фенотипом, получающих противоэпилептическую терапию, была достоверно меньше, чем у больных, прекративших прием ПЭП.

**Заключение.** Выявленные различия в длительности стационарной части сонных веретен обусловлены различными патогенетическими механизмами, лежащими в основе разных типов генерализованных приступов у взрослых, и могут использоваться для уточнения подтипа ИГЭ и оценки эффективности ПЭП.

**Ключевые слова:** генетическая генерализованная эпилепсия, частотно-временные характеристики, сонные веретена, противоэпилептические препараты.

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

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

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 4068/I от 28.03.2016).

**Благодарности.** Коллектив авторов выражает признательность Кравцовой Тамаре Геннадьевне – заместителю главного врача по клинико-экспертной работе, председателю врачебной комиссии Клиник СибГМУ.

**Для цитирования:** Гребенюк О.В., Алифирова В.М., Светлик М.В., Левко А.Н., Катаева Н.Г. Частотно-временные характеристики веретен сна при идиопатической генерализованной эпилепсии с переменным фенотипом у взрослых. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 52–59. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-52–59](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-52-59).



УДК 616.853-021.3-06:616.8-009.836]-053.8  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-52-59>

## Frequency-temporal characteristics of sleep spindles in IGE with variable phenotypes in adults

Grebenyuk O.V., Alifirova V.M., Svetlik M.V., Levko A.N., Kataeva N.G.

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

### ABSTRACT

A Mathematical Wave Analysis was conducted to study the frequency-temporal characteristics of sleep spindles in idiopathic generalized epilepsy (IGE) with variable phenotypes in adults. In resistant generalized tonic-clonic seizures (GTCS), the maximum duration of the stationary part of the sleep spindle in the 10–12Hz frequency band in the frontal and parietal regions was greater with Juvenile Absence Epilepsy compared with Juvenile Myoclonic Epilepsy and IGE with isolated GTCS. In patients with GTCS remission who took antiepileptic drugs (AED's) in the anamnesis, the frequency-time characteristics of the sleep spindle were not different. In the entire group, the maximum duration of the stationary part of the sleep spindles in patients with IGE with a variable phenotype receiving AED's was significantly less than in patients who stopped receiving AED's. The revealed differences in the duration of the stationary part of the sleep spindles are due to various pathogenetic mechanisms underlying the different types of generalized seizures in adults, and can be used to refine the subtype of the IGE and evaluate the efficacy of the AED's.

**Key words:** idiopathic generalized epilepsy, time-frequency characteristics of sleep spindles, antiepileptic drugs.

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

**Source of financing.** The authors state that there is no funding for the study.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee under SSMU (Protocol No. 4068/I of 28.03.2016).

**Acknowledgments.** The authors would like to express special gratitude to Kravtsova Tamara Gennadyevna, deputy chief physician for clinical and expert work and chairman of the medical commission of the Clinic of Siberian State Medical University.

**For citation:** Grebenyuk O.V., Alifirova V.M., Svetlik M.V., Levko A.N., Kataeva N.G. Frequency-temporal characteristics of sleep spindles in IGE with variable phenotypes in adults. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 52–59. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-52-59>.

## ВВЕДЕНИЕ

Идиопатические генерализованные эпилепсии (ИГЭ) с вариабельным фенотипом характеризуются различными вариантами сочетания абсансных, миоклонических, генерализованных тонико-клонических приступов (ГТКП) и интериктальной эпилептиформной активности (ИЭА) и включают в себя ювенильную абсансную эпилепсию (ЮАЭ), ювенильную миоклоническую эпилепсию (ЮМЭ) и эпилепсию с изолированными ГТКП [1]. Длительное проспективное наблюдение за пациентами с ИГЭ показало, что во взрослом возрасте терминальной ремиссии достигает меньше 30% пациентов, а большая часть существует с припадками в течение жизни [2].

Среди факторов плохого прогноза ИГЭ выделяют поздний дебют абсансов и ГТКП, миоклонические приступы, регистрацию ИЭА в 1–2-й стадии фазы медленного сна (ФМС) [3, 4]. В ФМС создаются условия для синергии физиологической и патологической активности, что ведет к нарастанию нейрональной синхронизации и генерации ИЭА [5, 6]. Основным физиологическим электроэнцефалографическим (ЭЭГ) феноменом спонтанной ритмической таламо-кортикальной активности в 1–2-й стадии ФМС являются веретена сна [7]. Их частотно-временные характеристики считаются основным биомаркером автономных таламо-кортикальных взаимодействий [8].

Взаимосвязь между сонными веретенами и ИЭА до конца не изучена [9], однако, несмотря на различную локализацию пейсмеркеров физиологической и патологической активности, считается, что общность механизмов обусловлена процессами возбуждения и синхронизации в таламо-кортикальных сетях [10].

В экспериментах *in vivo* показано, что у здоровых крыс наблюдалась нарастающая динамика частоты сонных веретен, тогда как у крыс линии WAG/Rij (генетической модели абсансной эпилепсии) частота сонных веретен была постоянна [11, 12].

По данным авторов, «стационарность» веретен сна у исследованных животных появляется только с возраста манифестации абсансов и ИЭА и характеризует клинически позитивную форму заболевания. Для здоровых людей также оказалась характерна «спектральная динамика» сонного веретена, проявляющаяся снижением частоты перед завершением паттерна [13]. В литературе мы не об-

наружили работ, характеризующих частотно-временные характеристики веретен сна при ИЭА с варибельным фенотипом у взрослых в зависимости от клинических особенностей заболевания.

Целью работы явилось изучение частотно-временных характеристик веретен сна при ИЭА с варибельным фенотипом у взрослых.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследуемую группу вошли 179 пациентов с дебютом ИЭА до 18 лет, документированной клинической историей, прошедшие нейрофизиологическое исследование в Отделе клинической нейрофизиологии кафедры неврологии и нейрохирургии СибГМУ. Из них 102 женщины и 77 мужчин в возрасте от 19 до 35 лет (средний возраст ( $Q_1$ ;  $Me$ ;  $Q_3$ ) (21,0; 25,0; 29,0) против (21,0; 23,0; 27,0) соответственно). Клиническая характеристика исследуемых групп больных ИЭА представлена в таблице.

Таблица  
Table

Характеристика исследуемых групп пациентов с идиопатической генерализованной эпилепсией (ИЭА), $Q_1$ ; $Me$ ; $Q_3$ Characteristics of the studied groups of patients with idiopathic generalized epilepsy (IGE), $Q_1$ ; $Me$ ; $Q_3$		
Показатель Indicator	Возраст, годы Age, years	Частота ГТКП, количество за год Frequency of GTCS, number per year
Подтип ИЭА (группа 1): Subtype IGE (group 1):		
подгруппа А (пациенты с ЮАЭ, $n = 50$ ) subgroup A (patients with JAE, $n = 50$ )	20,0; 23,0; 28,0	1,0; 2,0; 3,0
подгруппа В (пациенты с ЮМЭ, $n = 69$ ) subgroup B (patients with JME, $n = 69$ )	22,0; 25,0; 27,0	1,0; 2,0; 3,0
подгруппа С (пациенты с изолированными ГТКП, $n = 60$ ) subgroup C (patients with isolated GTCS, $n = 60$ )	21,5; 24,5; 28,5	1,0; 2,0; 3,0
Течение ИЭА (группа 2): Course of IGE (group 2):		
подгруппа D (пациенты, не имевшие ремиссии с дебюта заболевания, $n = 71$ ) subgroup D (patients who did not have remission from the onset of the disease, $n = 71$ )	20,0; 23,0; 25,0 $p < 0,001$	1,0; 3,0; 4,0 $p < 0,001$
подгруппа F (пациенты с рецидивом ГТКП, $n = 108$ ) subgroup F (patients with recurrent GTCS, $n = 108$ )	22,0; 25,0; 30,0 $p < 0,001$	1,0; 1,0; 2,0 $p < 0,001$
Прием ПЭП (группа 3): AED intake (group 3):		
подгруппа G (без приема, $n = 65$ ) subgroup G (no intake, $n = 65$ )	20,0; 23,0; 26,0 $p = 0,01$	1,0; 1,0; 2,0 $p < 0,001$
подгруппа H (монотерапия, $n = 99$ ) subgroup H (monotherapy, $n = 99$ )	21,0; 24,0; 29,0 $p = 0,04$	1,0; 2,0; 3,0 $p < 0,001$
подгруппа I (политерапия, $n = 15$ ) subgroup I (polytherapy, $n = 15$ )	23,0; 27,0; 34,0 $p = 0,01$	2,0; 3,0; 8,0 $p < 0,001$

Примечание. ЮАЭ – ювенильная абсансная эпилепсия; ЮМЭ – ювенильная миоклоническая эпилепсия; ПЭП – противосудорожные препараты; ГТКП – генерализованные тонико-клонические приступы. Выделение классических подтипов ИЭА с варибельным фенотипом проводилось согласно критериям [14], формирование групп по течению – на основании клинического опроса [15]. Одинаковым количеством астерисков маркировали пары признаков, имеющих достоверные различия.

Note. JAE – Juvenile Absence Epilepsy; JME – Juvenile Myoclonic Epilepsy; AED – antiepileptic drugs; GTCS – generalized tonic-clonic seizures. The differentiation of classical subtypes of IGE with variable phenotype was carried out according to the criteria [14]; the formation of groups along the course was based on a clinical survey [15]. The same number of asterisks was used to mark the pairs of signs with significant differences.

Среди пациентов с ИГЭ, получавших противосудорожные препараты (ПЭП) в режиме монотерапии, 87 пациентов принимали препараты вальпроевой кислоты в средней дозе (600,0; 1000,0; 1000,0), 12 пациентов – препараты ламотриджина в средней дозе (100,0; 100,0; 150,0). Средние суточные дозы вальпроевой кислоты не различались в исследуемых подгруппах. Сравнение проводилось в однородных группах по полу и возрасту среди пациентов с классическими подтипами ИГЭ, принимающих препараты вальпроевой кислоты и прекративших прием ПЭП в подгруппах по течению заболевания.

**Нейрофизиологический протокол.** ЭЭГ исследование проводилось в лаборатории видео-ЭЭГ мониторинга Отдела клинической нейрофизиологии кафедры неврологии и нейрохирургии СибГМУ.

ЭЭГ исследование с применением стандартного расположения электродов по системе 10–20 в отведениях F3, F4, F7, F8, C3, C4, T3, T4, P3, P4, T5, T6, O1, O2 проводили на аппарате «Нейрон–Спектр–4ВП» фирмы «Нейрософт» (Россия) в период физиологического ночного сна. Данные использовались для выявления веретен сна и ИЭА в ФМС. Выделение фрагментов, содержащих веретена сна, проводили на участках ЭЭГ свободных от ИЭА. ИЭА квалифицировали согласно общепринятой классификации [16]. ИЭА (комплексы «пик – волна», «полипик – волна» и ритмические всплески комплексов «пик – волна») выявляли при визуальной оценке нативной ЭЭГ.

**Математическая обработка данных.** Для изучения свойств веретен проводили математический вейвлетный анализ с применением программного обеспечения MatLab 15.0. В ходе анализа строились вейвлетные спектры в частотных диапазонах 5–25 Гц от выделенных из нативной ЭЭГ 2-секундных отрезков с выраженными признаками веретенообразных колебаний в большинстве отведений. Расчет вейвлетных спектров проводили с применением вейвлета Моле [17] по формуле

$$\psi_0(\eta) = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \exp(j\omega_0\eta) \exp(-\eta^2/2)$$

В дальнейшем в спектрах отыскивали участки начала и конца веретена, критерием отсутствия веретена являлось более чем 2-периодное отсутствие пиков на частоте веретена, далее из набора длительностей веретен выбирали максимальное по длительности веретено и включали его в выборку данных. Стационарность веретена оценивалась по признаку отсутствия в окружении вейвлетных

спектров смещения частотного спектра, т.е. получали от 2-секундных участков максимальную длительность стационарной части веретена сна. При отсутствии или наличии длительности веретен менее двух периодов оцениваемого сигнала принимали как нулевую длительность веретена. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ( $Q_1$ ;  $Me$ ;  $Q_3$ ).

**Статистический анализ.** Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами Манна – Уитни, Пирсона (критерий  $\chi^2$ ), Фишера с использованием пакета Statistica 6.0. Проверка нормальности распределений признаков длины волокна (выполнялась с применением критерия Шапиро – Уилка) по некоторым группам не соответствовала нормальному закону распределения. Поэтому применение дисперсионного анализа было отклонено, и для оценивания результатов о зависимости длительности веретена применяли методы обобщенных линейных моделей. При обнаружении факта наличия различий дополнительно (при сильном отклонении распределения остатков от нормального распределения) проводили сравнение между парами с применением критерия Вилкоксона. За достоверный принимался уровень значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы проводили построение вейвлетных спектров веретен сна в исследуемых отведениях в частотных диапазонах 5–25 Гц с выделением максимальной длительности стационарной части. На втором этапе проводили сравнение среди пациентов с ИГЭ в сформированных группах.

У пациентов с ИГЭ достоверные различия были выявлены при сравнении в однородных подгруппах по режиму фармакотерапии и течению заболевания в диапазоне 10–12 Гц в лобных и париетальных отведениях (рис. 1).

При приеме препаратов вальпроевой кислоты у пациентов из группы А максимальная длительность стационарной части веретена сна в полосе 10–11 Гц была больше по сравнению группой С, при этом дозы ПЭП не различались. Среди пациентов, не принимающих ПЭП на момент регистрации ЭЭГ исследования, максимальная длительность стационарной части веретена сна в полосе 10–11 Гц была достоверно выше в группе А по сравнению с группами В и С (рис. 2).

У пациентов группы 2 при приеме ПЭП достоверных различий в длительности стационарной части веретен сна не выявлено (рис. 2, 3).

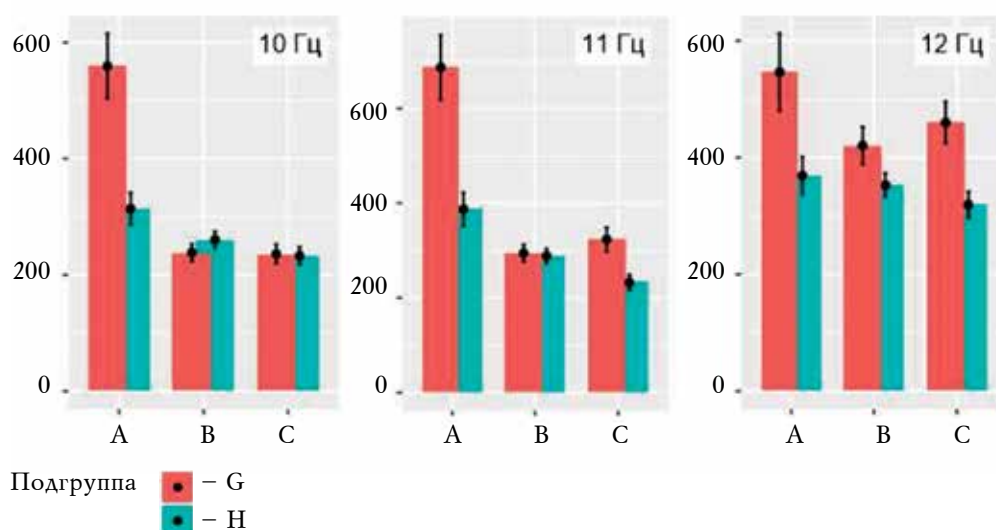


Рис. 1. Максимальная длительность стационарной части веретена сна в полосе 10–12 Гц в лобных и париетальных отведениях у пациентов с ИГЭ, не имевших ремиссии с дебюта заболевания, мс,  $Q_1$ ;  $Me$ ;  $Q_3$ :  $p_{AC} < 0,001$  (монотерапия, 10 Гц);  $p_{AC} = 0,002$  (монотерапия, 11 Гц);  $p_{AB} = 0,002$  (без приема препаратов, 10 Гц);  $p_{AC} < 0,001$  (без приема препаратов, 10 Гц);  $p_{AB} = 0,011$  (без приема препаратов, 11 Гц);  $p_{AC} < 0,001$  (без приема препаратов, 11 Гц)

Fig. 1. The maximum duration of the stationary part of the sleep spindle in the 10–12 Hz band in the frontal and parietal leads in patients with IGE, who do not have remission from the onset of the disease, ms,  $Q_1$ ;  $Me$ ;  $Q_3$ :  $p_{AC} < 0.001$  (monotherapy, 10 Hz);  $p_{AC} = 0.002$  (monotherapy, 11 Hz);  $p_{AB} = 0.002$  (without medication, 10 Hz);  $p_{AC} < 0.001$  (without medication, 10 Hz);  $p_{AB} = 0.011$  (without medication, 11 Hz);  $p_{AC} < 0.001$  (without medication, 11 Hz)

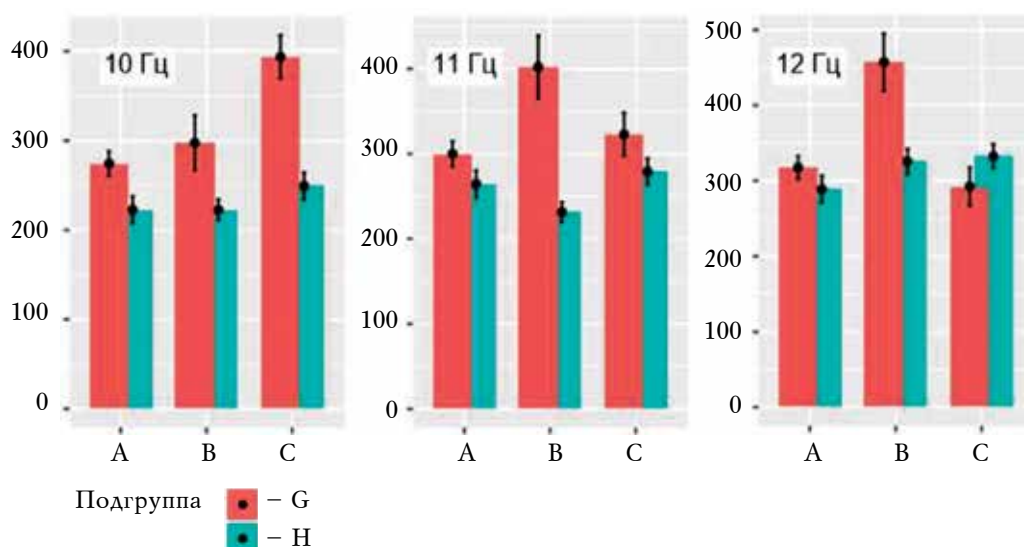


Рис. 2. Максимальная длительность стационарной части веретена сна в полосе 10–12 Гц в лобных и париетальных отведениях у пациентов с ИГЭ, имевших ГТКП, мс,  $Q_1$ ;  $Me$ ;  $Q_3$ :  $p_{CA} = 0,013$  (частота 10 Гц);  $p_{BA} = 0,012$  (частота 11 Гц);  $p_{BA} < 0,001$  (частота 12 Гц)

Fig. 2. The maximum duration of the stationary part of the sleep spindle in the 10–12 Hz band in the frontal and parietal leads in patients with IGE, who have GTCS, ms,  $Q_1$ ;  $Me$ ;  $Q_3$ :  $p_{CA} = 0.013$  (frequency 10 Hz);  $p_{BA} = 0.012$  (frequency 11 Hz);  $p_{BA} < 0.001$  (frequency 12 Hz)

Среди пациентов с ИГЭ с рецидивом ГТКП, не принимающих ПЭП на период включения в исследование, в группе А длительность стационарной части сонного веретена в полосе 10–12 Гц была достоверно меньше по сравнению с группами В и С.

Прием ПЭП (вальпроевая кислота) в режиме монотерапии достоверно снижал максимальную длительность стационарной части сонного веретена у пациентов с ИГЭ с переменным фенотипом (рис. 3).

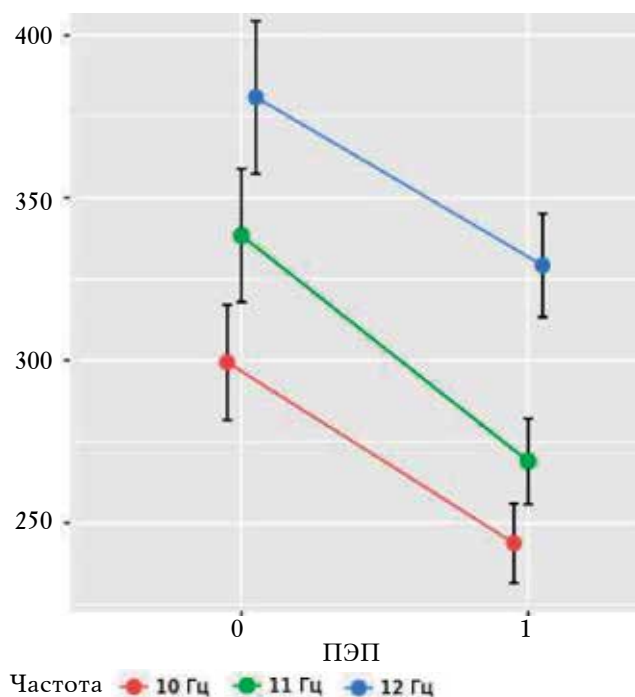


Рис. 3. Максимальная длительность стационарной части веретена сна в полосе 10–12 Гц у пациентов с ИГЭ в зависимости от приема ПЭП, мс,  $Q_1$ ;  $Me$ ;  $Q_3$ : 1 – прием ПЭП в терапевтических дозах; 0 – отмена антиконвульсантов

Fig. 3. The maximum duration of the stationary part of the sleep spindle in the 10–12 Hz band in patients with IGE, depending on the intake of the AED, ms,  $Q_1$ ;  $Me$ ;  $Q_3$ : 1 – AED in therapeutic doses; 0 – stopping of anticonvulsants

## ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении максимальной длительности стационарной части сонного веретена у пациентов с ИГЭ достоверные различия были выявлены в диапазоне 10–12 Гц в лобных и париетальных отведениях, что соответствует данным о частотных характеристиках веретен сна у взрослых [8, 18]. У пациентов с ЮАЭ с непрекращающимися с дебюта заболевания припадками максимальная длительность стационарной части веретена сна в полосе 10–12 Гц была выше, чем у больных с ЮМЭ и ИГЭ с изолированными ГТКП.

Патогенетической особенностью ИГЭ является распространение эпилептиформной активности по корково-таламическим сетям на обе гемисферы. Такой же механизм лежит в основе сонных веретен, характеризующихся спонтанной ритмической активностью таламо-кортикальной системы в ФМС. Предполагается, что при абсансных эпилепсиях в возникновении паттернов ИЭА и веретен сна лежит последовательное взаимодействие глутамат- и ГАМК-ергических нейронов

ядер таламуса, что обеспечивает динамику частоты сонного веретена в физиологических условиях и, напротив, его «стационарность» при патологии [10]. Можно предполагать, что выявленные различия в длительности стационарной части сонных веретен обусловлены различными патогенетическими механизмами, лежащими в основе разных типов генерализованных приступов.

В настоящее время известно, что для большей части больных с ИГЭ характерно достижение нетерминальной ремиссии с последующей эскалацией [19]. Как оказалось, рецидив ИГЭ характеризовался меньшей частотой ГТКП по сравнению с дебютом, при этом средние суточные дозы вальпроатов в подгруппах по течению заболевания не различались.

Известно, что с возрастом происходит снижение частоты и регулярности ИЭА с преимущественно фронтальной локализацией паттернов, что может влиять на частоту приступов [20, 21]. Также у взрослых могут проявляться неклассические (расширенные) формы ИГЭ с абсансными приступами, такие как ИГЭ преимущественно с ГТКП (IGE with predominantly GTCS) и ИГЭ с фантомными абсансами (Idiopathic generalised epilepsy with phantom absences) [21, 22].

В исследуемой группе пациентов с нетерминальной ремиссией в анамнезе максимальная длительность стационарной части сонного веретена у больных с ЮАЭ не различалась или была меньше, чем у пациентов с ЮМЭ и ИГЭ с изолированными ГТКП, что может объясняться как возрастными изменениями нейрональной реактивности, так и синдромальной гетерогенностью, присущей ИГЭ с вариабельным фенотипом.

ИЭА при ИГЭ чувствительна к антиконвульсантам. Общепризнана стратегия титрования ПЭП под контролем ЭЭГ [23]. Прием ПЭП также снижает частоту веретен сна у пациентов с эпилепсией [24].

Максимальная длительность стационарной части веретен сна у пациентов с ИГЭ, получающих противоэпилептическую терапию вальпроатами, была достоверно меньше, чем у больных, прекративших прием ПЭП. Полученные данные подтверждают клинические наблюдения о необходимости длительного приема ПЭП, несмотря на редкую частоту ГТКП у пациентов с ИГЭ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Частотно-временные характеристики веретен сна можно рассматривать в качестве маркеров таламо-кортикальных взаимодействий при ИГЭ. Мы полагаем, что представленные данные



будут способствовать в дальнейшем развитию нейрофизиологических методов доклинической диагностики и контроля эффективности противосудорожной терапии при генетических генерализованных эпилепсиях у взрослых.

# ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Карлов В.А. Эпилепсия у детей и взрослых, женщин и мужчин: руководство для врачей. М.: Медицина, 2010: 720. [Karlova V.A. Epilepsy in children and adults, women and men: a guide for doctors. M.: Medicina Publ., 2010: 720 (in Russ.)].
2. Sillanpää M., Schmidt D. Natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. *Brain*. 2006; 129: 617–624. DOI: 10.1093/brain/awh726.
3. Gomez-Ibanez A., McLachlan R.S., Mirsattari S.M., Diosy D.C., Burneo J.G. Prognostic factors in patients with refractory idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res*. 2017 Feb.; 130: 69–73. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2017.01.011.
4. Гребенюк О.В., Алифиров В.М., Светлик М.В., Евтушенко И.Д., Бочков Ю.А., Степанов И.А. Клинико-электроэнцефалографические предикторы учащения генерализованных судорожных приступов в гестационном и постгравидарном периоде. *Бюллетень сибирской медицины*. 2013; 12 (5): 24–30. [Grebennyuk O.V., Alifirova V.M., Svetlik M.V., Yevtushenko I.D., Bochkov Yu.A., Stepanov I.A. Clinical and EEG predictors of increased frequency of generalized seizures in gestational and post-gravidarum period. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2013; 12 (5): 24–30 (in Russ.)].
5. Steriade M. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J. Neurophysiol*. 2001; 86 (1): 1–39. DOI: 10.1152/jn.2001.86.1.1.
6. Halász P. How sleep activates epileptic networks? *Epilepsy Research and Treatment*. 2013; 2013: 1–19. DOI: 10.1155/2013/425697.
7. De Gennaro L., Ferrara M. Sleep spindles: an overview. *Sleep Medicine Reviews*. 2003; 7 (5): 423–440. DOI: 10.1016/S1087-0792(02)00116-8.
8. Urakami Y., Ioannides A.A., Kostopoulos G.K. Sleep spindles – as a biomarker of brain function and plasticity. In: *Advances in Clinical Neurophysiology*, I.M. Ajeena, Eds. nTech, Rijeka, Croatia, 2012; 73–153. DOI: 10.5772/48427.
9. Kostopoulos G.K. Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis. *Clinical Neurophysiology*. 2000; 111 (2): 27–38.
10. Leresche N., Lambert R.C., Errington A.C., Crunelli V. From sleep spindles of natural sleep to spike and wave discharges of typical absence seizures: is the hypothesis still valid? *Pflügers Archiv*. 2012; 463 (1): 201–212. DOI: 10.1007/s00424-011-1009-3.
11. Sitnikova E., Hramov A.E., Grubov V.V., Koronovsky A.A. Time-frequency characteristics and dynamics of sleep spindles in WAG/Rij rats with absence epilepsy. *Brain Research*. 2014; 1543: 290–299. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.11.001.
12. Sitnikova E., Rutsikova E.M., Raevsky V.V. Maternal care affects EEG properties of spike-wave seizures (including pre- and postictal periods) in adult WAG/Rij rats with genetic predisposition to absence epilepsy. *Brain Res Bull*. 2016; 127: 84–91. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.019.
13. Schönwald S.V., Carvalho D.Z., Dellagustin G., de Santa-Helena E.L., Gerhardt G.J.L. Quantifying chirp in sleep spindles. *Journal of Neuroscience Methods*. 2011; 197 (1): 158–164. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2011.01.025.
14. Fisher R.S., Cross J.H., D'Souza C., French J.A., Haut S.R., Higurashi N., Hirsch E., Jansen F.E., Lagae L., Moshé S.L., Peltola J., Roulet P.E., Scheffer I.E., Schulze-Bonhage A., Somerville E., Sperling M., Yacubian E.M., Zuberi S.M. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*. 2017; 58 (4): 531–542. DOI: 10.1111/epi.13671.
15. Thurman D.J., Beghi E., Begley C.E., Berg A.T., Buchhalter J.R., Ding D., Hesdorffer D.C., Hauser W.A., Kazis L., Kobau R., Kroner B., Labiner D., Liow K., Logroscino G., Medina M.T., Newton C.R., Parko K., Paschal A., Preux P.M., Sander J.W., Selassie A., Theodore W., Tomson T., Wiebe S. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia*. 2011; 52 (7): 2–26. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2011.03121.x.
16. St. Louis E.K., Frey L.C. (eds). *Electroencephalography (EEG): An introductory text and atlas of normal and abnormal findings in adults, children and infants*. Chicago, IL: American Epilepsy Society, 2016: 135. DOI: 10.5698/978-0-9979756-0-4.
17. Короновский А.А., Храмов А.Е., Непрерывный вейвлетный анализ и его приложения. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003: 176. [Koronovskiy A.A., Khramov A.E. Continuous wavelet analysis and its applications. Moscow: FIZMATLIT Publ., 2003: 176 (in Russ.)].
18. Carvalho D.Z., Gerhardt G.J., Dellagustin G., de Santa-Helena E.L., Lemke N., Segal A.Z., Schönwald S.V. Loss of sleep spindle frequency deceleration in obstructive sleep apnea. *Clin Neurophysiol*. 2014; 125 (2): 306–312. DOI: 10.1016/j.clinph.2013.07.005.
19. Shorvon S.D. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. 2011; 52 (6): 1052–1057. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2011.03041.x.
20. Seneviratne U., Hepworth G., Cook M., D'Souza W. Can EEG differentiate among syndromes in genetic generalized epilepsy? *Journal of Clinical Neurophysiology*. 2017; 34 (3): 213–221. DOI: 10.1097/WNP.0000000000000358.
21. Seneviratne U., Cook M.J., D'Souza W.J. Electroencephalography in the Diagnosis of Genetic Generalized Epilepsy Syndromes. *Frontiers in Neurology*. 2017; 8: 499. DOI: 10.3389/fneur.2017.00499.
22. Panayiotopoulos C.P. Syndromes of idiopathic generalized epilepsies not recognized by the International league



against epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46(9): 57–66. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2005.00314.x.

23. Зенков Л.Р. Клиническая электроэнцефалография (с элементами эпилептологии). М: МИА, 2011: 368. [Zenkov L.R. Clinical electroencephalography (with el-

ements of epileptology). Moscow: MIA Publ., 2011: 368 (in Russ.)].

24. Weiner O.M., Dang-Vu T.T. Spindle oscillations in sleep disorders: a systematic review. *Neural. Plast.* 2016; 2016: 7328725. DOI: 10.1155/2016/7328725.

## Вклад авторов

Гребенюк О.В. – разработка концепции и дизайна, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста. Алифирова В.М. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Светлик М.В. – анализ полученных данных, написание текста. Левко А.Н., Катаева Н.Г. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

## Authors contribution

Grebenyuk O.V. – development of the concept and design, review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data, writing the text. Alifirova V.M. – verification of critical intellectual content, final approval for publication of the manuscript. Svetlik M.V. – analysis of the data, writing text. Levko A.N., Kataeva N.G. – final approval for publication of the manuscript.

## Сведения об авторах

Гребенюк Олег Валерьевич, канд. мед. наук, доцент, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4740-0162.

Алифирова Валентина Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4140-3223.

Светлик Михаил Васильевич, канд. мед. наук, доцент, кафедра медицинской и биологической кибернетики с курсом медицинской информатики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0990-2580.

Левко Алена Николаевна, гл. врач Клиник СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0313-0698.

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

(✉) Гребенюк Олег Валерьевич, e-mail: oleg129129@mail.ru.

## Author information

Grebenyuk Oleg V., PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4740-0162

Alifirova Valentina M., DM, Professor, Head of the Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4140-3223.

Svetlik Michael V., PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0990-2580.

Levko Alena N., Chief Physician of the Clinics of SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0313-0698.

Kataeva N.G., DM, Professor, Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Grebenyuk Oleg V., e-mail: oleg129129@mail.ru.

Received 25.05.2018  
Accepted 14.12.2018

Поступила в редакцию 25.05.2018

Подписана в печать 14.12.2018

## Применение многокомпонентной пленки в лечении ран в эксперименте

Григорьян А.Ю., Бежин А.И., Панкрушева Т.А., Суковатых Б.С.,  
Чекмарева М.С., Жилиева Л.В.

Курский государственный медицинский университет (КГМУ)  
Россия, 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** Оптимизировать лечение гнойных ран с помощью разработанного раневого покрытия с разнонаправленным действием, которое сочетает в себе противомикробный эффект широкого спектра, стимуляцию регенерации, сорбционную активность, местное анестезирующее действие.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования явилось разработанное нами на базе Курского государственного медицинского университета раневое покрытие в виде пленки (патент на изобретение РФ № 2601897). Эксперимент выполнен на лабораторных животных (самцы крыс породы Вистар), которые были разделены на две группы (сравнения и опытная) по 36 животных в каждой. Животным моделировалась гнойная рана по методике П.И. Толстых. Для оценки эффективности лечения применялись следующие методы: микробиологический (определение зон задержки роста и обсемененности ран), Ренье (для определения местной анестезирующей активности), планиметрический (измеряли площадь ран, долю (%) уменьшения площади и скорость заживления). Проводили визуальную оценку состояния ран и их pH-метрию. Статистическую значимость различий определяли по непараметрическому критерию Манна – Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Изначально в эксперименте *in vitro* была выявлена высокая эффективность разработанной пленки в отношении наиболее распространенных тест-штаммов микроорганизмов – возбудителей раневой инфекции. Индекс Ренье был в 1,2 раза выше у разработанной пленки с хлоргексидином, чем у 2%-й лидокаиновой мази, а длительность общей анестезии – на 25% дольше. На основании визуальной оценки раны показано, что очищение и регенерация ран наступали раньше у животных в опытной группе, однако статистическая достоверность различий не выявлена. Максимальные различия по скорости заживления в 1,6 раза и отмечены на сроке 3–5-е сут, а обсемененность ран была в 1,3 раза ниже в опытной группе, чем в группе сравнения. По результатам pH-метрии достоверные различия между группами выявлены лишь на 15-е сут. Приближение значений pH к значениям неповрежденной кожи также доказывала эффективность лечения.

**Заключение.** Разработанное нами раневое покрытие обладает высокой противомикробной активностью в отношении широкого спектра возбудителей раневой инфекции, создает достаточно хороший местно-анестезирующий эффект, статистически значимо ускоряет процесс сокращения площади и обсемененности ран. Таким образом, разработанное нами раневое покрытие можно рекомендовать для дальнейших исследований в клинике для лечения гнойно-воспалительных процессов мягких тканей.

**Ключевые слова:** гнойная рана, лечение ран, раневое покрытие, метилурацил, метронидазол, хлоргексидина биглюконат.

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

**Источник финансирования.** Работа поддержана грантом Президента РФ для молодых кандидатов наук МК-5245.2016.7.

---

✉ Григорьян Арсен Юрьевич, e-mail: arsgrigorian@mail.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено Региональным этическим комитетом КГМУ (протокол № 2 от 05.11.2013).

Для цитирования: Григорьян А.Ю., Бежин А.И., Панкрушева Т.А., Суковатых Б.С., Чекмарева М.С., Жилиева Л.В. Применение многокомпонентной пленки в лечении ран в эксперименте. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 60–68. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-60-68>.

УДК 616-001.4-085.28:[615.454:544.023.26]:57.08  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-60-68>

## Experimental usage of a multicomponent film in treatment of wounds

Grigoryan A.Yu., Bezhin A.I., Pankrusheva T.A., Sukovatykh B.S.,  
Chekmareva M.S., Zhilyaeva L.V.

*Kursk State Medical University  
3, Karl Marx Str., Kursk, 305041, Russian Federation*

### ABSTRACT

**Objectives.** To optimize treatment of purulent wounds with the help of a wound coating with a multidirectional action that combines broad-spectrum antimicrobial effect, stimulation of regeneration, sorption activity and local anesthetic action.

**Materials and methods.** The material for the study was a wound covering in the form of a film developed by the authors at Kursk State Medical University (Russian patent No. 2601897). The experiment was performed on laboratory animals (Wistar rats), which were divided into 2 groups (comparison and experimental), each group containing 36 animals. Purulent wound was modeled in the animals according to the method of P.I. Tolstykh. To evaluate the effectiveness of the treatment, the following methods were used: microbiological method (determination of areas of growth retardation and bacterial contamination in the wounds), Renier's method (determination of local anesthetic activity), visual assessment of wounds, planimetric method (measurement of the wound area, percentage of area reduction and healing speed) and measurement of pH in the wounds. The statistical significance of the differences was determined with the nonparametric Mann–Whitney test. The differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

**Results.** Initially, high efficiency of the film was detected *in vitro* for the most common strains of test organisms, which were wound infection pathogens. The Renier index was 1.2 times higher in the film with chlorhexidine than in 2% lidocaine ointment, and the duration of general anesthesia was 25% longer. Following visual assessment of the wounds we revealed that purification and regeneration of the wounds first occurred in the animals in the experimental group; however, no statistical significance was detected. The maximal differences in the healing speed (1.6 times) were observed at 3–5 days, and the contamination of the wounds was 1.3 times lower in the experimental group than in the comparison group. According to the results of pH assessment, significant differences between the groups were noted only on day 15. Approximation of pH values to intact skin values also proved the effectiveness of treatment.

**Conclusion.** The developed contact wound covering has high antimicrobial activity against a broad spectrum of wound infection pathogens, creates a fairly good local anesthetic effect, significantly speeds up the healing process and reduces bacterial contamination of the wound area. Thus, the developed wound covering can be recommended for further studies in the clinical setting for treatment of inflammatory processes in soft tissues.

**Key words:** purulent wound, wound treatment, wound covering, methyluracil, metronidazol, chlorhexidine digluconate.

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

**Source of financing.** The study was supported by the Presidential grant awarded for young Candidates of science MK-5245.2016.7.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee at Kursk State Medical University (Protocol No. 2 of 05.11.2013).

**For citation:** Grigoryan A.Yu., Bezhin A.I., Pankrusheva T.A., Sukovatykh B.S., Chekmareva M.S., Zhilyaeva L.V. Experimental usage of a multicomponent film in treatment of wounds. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 60–68. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-60-68>.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во всем мире возникают локальные войны, неотъемлемым атрибутом которых являются ранения (огнестрельные и не только) как военных, так и мирного населения [1]. Раны, полученные в подобных условиях, являются первично инфицированными, а учитывая несвоевременность оказания медицинской помощи, чаще всего они переходят в разряд гнойных. Более того, и в мирное время гнойные осложнения составляют 35–45% в структуре хирургических заболеваний, а летальность от них достигает 25% [2–4]. На фоне современных, порой дорогостоящих, методов лечения гнойно-воспалительных процессов мягких тканей [5–9] нельзя забывать о простом, но в то же время эффективном методе лечения ран – под повязкой с использованием современных раневых покрытий [10, 11]. Особенно это актуально на догоспитальном этапе и для амбулаторного лечения. Нельзя также забывать о способности микроорганизмов – возбудителей раневой инфекции – приспосабливаться и становиться невосприимчивыми к устаревающим препаратам, которые до сих пор широко применяются [12]. Помимо этого современные средства должны обеспечивать не только бактерицидное действие в отношении широкого спектра микроорганизмов, но и стимулировать регенерацию тканей и обеспечивать минимальную травматизацию и безболезненность при смене повязки. Данные обстоятельства диктуют необходимость постоянной разработки и внедрения в практику новых комбинаций антисептиков и противомикробных препаратов на основах, способных пролонгированно выделять в рану активное вещество, что, в свою очередь, будет сокращать периодичность перевязок.

Цель исследования – оптимизировать лечение гнойных ран с помощью разработанного нами раневого покрытия с разнонаправленным действием, которое сочетает в себе противомикробный эффект широкого спектра, стимуляцию регенерации, сорбционную активность, местное анестезирующее действие.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования явилось разработанное нами на базе Курского государственного медицинского университета раневое покрытие в виде пленки (патент на изобретение РФ № 2601897) следующего состава:

Метронидазол	1,0
Лидокаина гидрохлорид	2,0
Метилурацил	2,0
Глицерин	1,0
Полиэтиленоксид	
с молекулярной массой 400	1,0
Натриевая соль	
карбоксиметилцеллюлозы	1,75
Раствор хлоргексидина	
биглюконата (0,05%)	91,25

В связи с тем, что основным компонентом является хлоргексидина биглюконат, далее раневое покрытие будем именоваться как «Разработанная пленка с хлоргексидином».

Для определения силы и спектра противомикробной активности разработанной пленки с хлоргексидином проводили микробиологическое исследование с помощью метода стандартных дисков в отношении тест-штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и *Candida albicans* ATCC 885-653. В качестве препарата сравнения был выбран «ПараПран с хлоргексидином».

Для определения способности разработанной пленки с хлоргексидином оказывать местное анестезирующее действие использовали метод Ренье. Исследуемое вещество закладывали в конъюнктивальный мешок глаза кролика породы шиншилла (40 животных, распределенных на две группы: контрольная и опытная). Первое определение поверхностной, аппликационной анестезии проводили в течение 1 мин и повторяли на 5-, 10-, 15-, 20-, 30-, 40-, 50-, 55-, 60-, 65-, 70-, 75-, 80-, 85-, 90-, 95-, 100-, 105-ю мин опыта. В итоге было проведено 19 определений. Во всех опытах записывали наименьшее число прикосновений

одинаковой силы и частоты, которые приводили к смыканию век кролика. За индекс Ренье, который характеризует степень анестезии, принимали усредненную величину, которая вычислялась как сумма величин, полученных при апробации исследуемой субстанции в течение 105 мин.

Отсутствие смыкания век в течение 1-й мин (100 прикосновений) расценивали как признак полной анестезии. Максимально возможный индекс Ренье 1 900, минимальный 19. Исходя из полученных данных, отражающих изменение чувствительности роговицы глаза кролика, определяли начало, длительность полной (100%-й) анестезии, общую длительность анестезии (до момента, пока первое прикосновение приводило к смыканию век). В данном эксперименте в качестве сравнения использовалась 2%-я лидокаиновая мазь, так как ПараПран с хлоргексидином не обладает анестезирующей активностью.

Для проведения эксперимента всем подопытным животным (самцы крысы породы Вистар) под наркозом в стерильных условиях моделировалась рана (размером около 250 мм<sup>2</sup>) по методике П.И. Толстых [13]. Для формирования гнойной раны в нее вносили миллиардную взвесь *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-R. Протокол экспериментов был составлен в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, 18.03.1986), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.) и приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики», МЗ ССР № 755 от 12.08.1977.

В ходе эксперимента распределение экспериментальных животных было следующее: в группе

сравнения (36 особей) лечение проводилось ПараПраном с хлоргексидином; в опытной группе (36 особей) – разработанной пленкой с хлоргексидином. Перевязки производили 1 раз в день, ежедневно в течение 14 сут.

В качестве клинического метода использовали визуальную оценку состояния ран. Регистрировали сроки: ликвидации отека окружающих тканей, полного очищения, начала появления грануляций, начала краевой эпителизации.

Кроме того, определяли площадь ран, рассчитывали процент уменьшения площади ран (ПУП) и скорость заживления по методике Л.Н. Поповой, что помогло объективизировать результаты и уйти от субъективности клинического метода.

Информативным также явился метод по определению уровня обсемененности раны микроорганизмами, осуществлялся путем забора биоптата из очага гнойно-воспалительного процесса и посева его на питательную среду, после чего подсчитывали количество выросших колоний (КОЕ/1 г ткани).

Контроль над процессом заживления осуществляли также с помощью рН-метрии ран (использовался прибор РН-98110). В ходе исследования установлено, что рН неповрежденной кожи крыс составила  $5,4 \pm 0,1$ .

Обрабатывали результаты с помощью методов однофакторного дисперсионного анализа при использовании пакета Microsoft Excel 2010 и Statistica v. 6.0. Количественные признаки представляли в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей. При сравнении двух независимых выборок использовали критерий Манна – Уитни. Критический уровень статистической значимости принят  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, отражающие силу и диапазон противомикробной активности изучаемых средств, представлены в табл. 1.

Таблица 1  
Table 1

Зона задержки роста, мм, $n = 6$ , $Me [Q_1; Q_3]$ Area of growth retardation, mm, $n = 6$ , $Me [Q_1; Q_3]$		
Исследуемый состав The investigated composition	ПараПран с хлоргексидином ParaPran dressing with chlorhexidine	Разработанная пленка с хлоргексидином Developed film with chlorhexidine
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-R	29,5 [29,0; 30,0]	31,0* [31,0; 31,0]
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702	22,0 [21,0; 23,0]	30,0* [28,0; 32,0]
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	30,5 [30,0; 32,0]	31,5 [31,0; 33,0]
<i>Proteus vulgaris</i>	24,0 [24,0; 26,0]	28,5* [28,0; 30,0]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	18,5 [18,0; 19,0]	22,0* [21,0; 23,0]
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	10,5 [9,0; 12,0]	25,0* [24,0; 25,0]

\*  $p < 0,05$  при сопоставлении ПараПран с хлоргексидином с разработанной пленкой с хлоргексидином.

\*  $p < 0,05$ , when comparing ParaPran dressing with chlorhexidine with the developed film with chlorhexidine.

Разработанная пленка с хлоргексидином показала высокую противомикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов микроорганизмов, и результаты по зонам задержки роста достоверно ( $p < 0,05$ ) превосходили ПараПрана с хлоргексидином в отношении всех исследуемых тест-штаммов за исключением *Escherichia coli* ATCC 25922.

По местной анестезирующей активности разработанная пленка с хлоргексидином достовер-

но превосходила препарат сравнения по трем из четырех параметров (табл. 2). Индекс Ренье в 1,2 раза выше у разработанной пленки с хлоргексидином, чем у 2%-й лидокаиновой мази, а длительность общей анестезии на 25% дольше.

При визуальной оценке течения раневого процесса показано, что в опытной группе исчезновение отека, очищение раны, появление грануляций и краевой эпителизации наступали несколько раньше, однако отличия от группы сравнения статистически не достоверны (табл. 3).

Таблица 2

Table 2

Результаты местной анестезирующей активности по методу Ренье, $n = 20$ , $Me [Q_1; Q_3]$ Local anesthetic activity according to the Renier's method, $n = 20$ , $Me [Q_1; Q_3]$		
Исследуемый состав Investigated criteria	Лидокаиновая мазь 2%-я 2% lidocaine ointment	Разработанная пленка с хлоргексидином Developed film with chlorhexidine
Время наступления анестезии, с Onset of anesthesia, sec	60,5 [60,0; 61,0]	60,0 [59,5; 61,0]
Индекс Ренье, усл. ед. Renier index, c.u.	1 044,0 [954,0; 1 169,0]	1 290,5*[1 232,0; 1 339,5]
Длительность полной анестезии, мин Duration of total anesthesia, min	45,0 [40,0; 50,0]	65,0*[65,0; 67,5]
Длительность общей анестезии, мин Duration of general anesthesia, min	72,5 [65,0; 80,0]	100,0*[95,0; 102,5]

\*  $p < 0,05$  при сопоставлении 2%-й лидокаиновой мази с разработанной пленкой с хлоргексидином.

\*  $p < 0,05$ , when comparing 2% lidocaine ointment with the developed film with chlorhexidine.

Примечание. Здесь и в табл. 1–7:  $n$  – количество наблюдений.

Note. Here and in tab. 1–7:  $n$  – is the number of observations.

Таблица 3

Table 2

Визуальная оценка состояния ран, $Me [Q_1; Q_3]$ Visual assessment of the wounds, $Me [Q_1; Q_3]$				
Группа Group	Исчезновение перифокального отека, $n = 24$ Disappearance of perifocal edema, $n = 24$	Очищение раны, $n = 18$ Wound cleansing, $n = 18$	Появление грануляций, $n = 18$ Emergence of granulations, $n = 18$	Начало краевой эпителизации, $n = 18$ Start of epithelialization of wound edges, $n = 18$
Сравнения Comparison	7,0 [7,0; 8,0]	8,0 [8,0; 9,0]	8,0 [8,0; 9,0]	9,0 [9,0; 10,0]
Опытная Experimental	7,0 [6,5; 8,0]	8,0 [7,5; 9,0]	8,0 [7,0; 9,0]	9,0 [9,0; 10,0]

\*  $p < 0,05$  при сопоставлении опытной группы с контрольной.

\*  $p < 0,05$ , when comparing the comparison and experimental groups.

Площадь ран в обеих группах на 1-е сут составляла в среднем 250 мм<sup>2</sup> (табл. 4, 5). В результате проводимого лечения происходило планомерное уменьшение площади ран и, соответственно, увеличение ПУП ран. Статистически значимые различия отмечены на всех сроках наблюдения в пользу опытной группы (лишь на 10-е сут в группе сравнения), максимальные отличия по площа-

ди ран в 1,3 раза наблюдались на 5-е сут, на 15-е сут – в 1,9 раза. При этом максимальные различия по скорости заживления отмечены на 1–5-е сут (отличия статистически значимы), в 1,6 раза – на 3–5-е сут. Данные планиметрического исследования указывают на большую эффективность разработанной пленки с хлоргексидином по сравнению с ПараПран с хлоргексидином.



Таблица 4

Table 4

Планметрические изменения ран, $Me [Q_1; Q_3]$ Planimetric changes in the wounds, $Me [Q_1; Q_3]$				
Срок наблюдения Observation day	Группа сравнения Comparison group		Группа опытная Experimental group	
	S раны, мм <sup>2</sup> S of the wound, mm <sup>2</sup>	ПУП, % Percentage reduction in wound surface area, %	S раны, мм <sup>2</sup> S of the wound, mm <sup>2</sup>	ПУП, % Percentage reduction in wound surface area, %
1-е сут, Day 1 $n = 36$	250,0 [249,0; 250,0]	–	250,0 [249,0; 250,0]	–
3-е сут, Day 3 $n = 30$	162,0 [159,0; 165,0]	35,5 [34,3; 36,5]	142,0* [138,0; 150,0]	43,4* [40,0; 44,6]
5-е сут, Day 5 $n = 24$	128,0 [127,5; 130,0]	48,8 [48,1; 49,1]	90,5* [88,5; 97,5]	63,6* [60,9; 64,8]
8-е сут, Day 8 $n = 18$	54,5 [53,0; 56,0]	78,2 [77,6; 78,9]	44,0* [39,0; 56,0]	82,4* [77,6; 84,3]
10-е сут, Day 10 $n = 12$	17,0 [15,0; 19,0]	93,2 [92,4; 94,0]	20,0* [17,5; 22,0]	92,0* [91,2; 93,0]
15-е сут, Day 15 $n = 6$	4,0 [3,0; 4,0]	98,4 [98,4; 98,8]	2,0* [2,0; 2,0]	99,2* [99,2; 99,2]

\*  $p < 0,05$  при сопоставлении опытной группы с контрольной.\*  $p < 0.05$ , when comparing the comparison and experimental groups.

Таблица 5

Table 5

Скорость заживления ран у экспериментальных животных в процессе лечения, мм <sup>2</sup> /сут, $Me [Q_1; Q_3]$ Speed of wound healing in experimental animals during treatment, mm <sup>2</sup> /day, $Me [Q_1; Q_3]$		
Срок наблюдения Observation time	Группа сравнения Comparison group	Группа опытная Experimental group
1–3-е сут, Day 1–3 $n = 30$	17,6 [16,9; 18,1]	21,6* [20,0; 22,5]
3–5-е сут, Day 3–5 $n = 24$	6,5 [6,0; 6,9]	10,1* [8,8; 12,0]
5–8-е сут, Day 5–8 $n = 8$	9,8 [9,6; 10,2]	6,3* [5,7; 7,0]
8–10-е сут, Day 8–10 $n = 12$	7,5 [7,2; 7,9]	4,4* [3,8; 6,7]
10–15-е сут, Day 10–15 $n = 6$	1,1 [1,0; 1,4]	1,4* [1,2; 1,7]

\*  $p < 0,05$  при сопоставлении опытной группы с контрольной.\*  $p < 0.05$ , when comparing the comparison and experimental groups.

На 1-е сут микробная загрязненность ран составляла в среднем  $14,1 \times 10^7$  КОЕ/г (табл. 6). В группе сравнения и опытной постепенно на каждом последующем сроке регистрировалось уменьшение микробной обсемененности ран.

Между группами статистически значимые различия отмечались на 8-е и 10-е сут наблюдения (максимальная разница в 1,3 раза зарегистрирована на 8-е сут), что говорит о более высокой противомикробной эффективности разработанной пленки с хлорексидином.

Таблица 6  
Table 6

Динамика обсемененности ран, КОЕ/г, $n = 6$ , $Me [Q_1; Q_3]$ Dynamics of bacterial contamination of the wounds, CFU/g, $n = 6$ , $Me [Q_1; Q_3]$		
Срок наблюдения Observation day	Группа сравнения Comparison group	Группа опытная Experimental group
1-е сут Day 1	$(14,1 [14,1; 14,2]) \times 10^7$	$(14,1 [14,0; 14,2]) \times 10^7$
3-и сут Day 3	$(6,0 [5,6; 6,4]) \times 10^6$	$(6,2 [5,2; 6,6]) \times 10^6$
5-е сут Day 5	$(19,4 [17,2; 21,8]) \times 10^5$	$(16,0 [12,2; 25,1]) \times 10^5$
8-е сут Day 8	$(12,0 [11,0; 14,2]) \times 10^4$	$(9,3 [9,0; 10,5]) \times 10^{4*}$
10-е сут Day 10	$(7,0 [6,8; 7,5]) \times 10^4$	$(6,3 [6,0; 6,9]) \times 10^{4*}$

\*  $p < 0,05$  при сопоставлении опытной группы с контрольной.\*  $p < 0.05$ , when comparing the comparison and experimental groups.

Исследование по определению pH ран показало (табл. 7), что исходная среда гнойных ран была слабощелочная, в процессе очищения и ре-

генерации происходила смена pH в кислую сторону и к 15-м сут стремилась к нормальному значению интактной кожи.

Таблица 7  
Table 7

Результаты pH-метрии ран, $Me [Q_1; Q_3]$ Results of pH assessment in the wounds, $Me [Q_1; Q_3]$		
Срок наблюдения Observation day	Группа сравнения Comparison group	Группа опытная Experimental group
1-е сут, $n = 36$ Day 1, $n = 36$	8,0 [7,8; 8,1]	7,9 [7,7; 8,1]
3-и сут, $n = 30$ Day 3, $n = 30$	7,0 [6,9; 7,2]	7,0 [6,9; 7,1]
5-е сут, $n = 24$ , Day 5, $n = 24$	6,6 [6,5; 6,9]	6,6 [6,5; 7,0]
8-е сут, $n = 18$ Day 8, $n = 18$	6,3 [6,1; 6,6]	6,2 [6,1; 6,5]
10-е сут, $n = 12$ Day 10, $n = 12$	6,1 [5,8; 6,2]	6,0 [5,9; 6,1]
15-е сут, $n = 6$ Day 15, $n = 6$	5,9 [5,9; 6,0]	5,8* [5,8; 5,9]

\*  $p < 0,05$  при сопоставлении опытной группы с контрольной.\*  $p < 0.05$ , when comparing the comparison and experimental groups.

Статистически достоверные различия по уровню pH между группами наблюдались лишь на 15-е сут эксперимента (в пользу опытной группы). Данное обстоятельство характеризует оба исследуемых препарата с положительной стороны.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Современный ритм жизни диктует необходимость применять средства, которые в короткие сроки помогут преодолеть временную нетрудоспособность. Это касается и лечения гнойно-вос-

палительных процессов мягких тканей. Сегодня на амбулаторном этапе и в полевых условиях врачи обращаются к так называемым раневым покрытиям, которые обладают всеми необходимыми качествами для скорейшего заживления ран [3, 4, 12]. Разработанное нами раневое покрытие в виде пленки с хлоргексидином содержит в своем составе в качестве лечебных компонентов антисептик хлоргексидина биглюконат 0,05%-й, метронидазол, стимулятор регенерации метилурацил, содержит в качестве основы – полиэти-

леноксид с молекулярной массой 400 и натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, в качестве анестетика лидокаина гидрохлорид, в качестве стабилизатора – глицерин. Лечебные компоненты воздействуют одновременно на разные звенья микробной клетки, тем самым эффективнее уничтожают патогенные микроорганизмы (в том числе биопленку, которую они образуют на поверхности раны, таким образом замедляя процессы регенерации). Более того, метронидазол способствует профилактике присоединения анаэробной инфекции, а метилурацил стимулирует процессы пролиферации.

Таким образом, результаты проведенного нами исследования свидетельствуют об эффективности применения разработанной пленки с хлоргексидином для лечения гнойно-воспалительного процесса мягких тканей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанное нами раневое покрытие в виде пленки с хлоргексидином обладает высокой противомикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и *Candida albicans* ATCC 885-653). Достоверно превосходит результаты препарата сравнения по анестезирующей активности, ускоряет сроки наступления грануляции и эпителизации ран, статистически значимо ускоряет процесс сокращения площади и обсемененности ран. Таким образом, его можно рекомендовать для дальнейших исследований в клинике для лечения гнойно-воспалительных процессов мягких тканей.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Левчук И.П., Костюченко М.Б., Назаров А.П., Горобец А.А. Лечение ран на этапах медицинской эвакуации. *Эффективная фармакотерапия*. 2012; 28: 36–41. [Levchuk I.P., Kostyuchenko M.B., Nazarov A.P., Gorobets A.A. Treatment of wounds during the stages of medical evacuation. *Effective Pharmacotherapy*. 2012; 28: 36–41 (in Russ.)].
2. Третьяков А.А., Неверов А.Н., Петров С.В., Гатиатуллин И.З. Комплексное лечение трофических язв нижних конечностей и длительно незаживающих ран (обзор литературы). *Оренбургский медицинский вестник*. 2016; 4 (16): 62–68. [Tret'yakov A.A., Neverov A.N., Petrov S.V., Gatiatullin I.Z. Complex treatment of trophic ulcers of lower extremities and long-term non-healing wounds (review of literature). *Orenburg Medical Bulletin*. 2016; 4 (16): 62–68 (in Russ.)].
3. Краснолуцкая В.Н., Сесорова Д.В. Современные подходы к лечению гнойных ран. *Центральный научный вестник*. 2017; 2, 5 (22): 10–12. [Krasnolutsckaya V.N., Sesorova D.V. Modern approaches to treatment of purulent wounds. *Central Scientific Bulletin*. 2017; 5 (22): 10–12 (in Russ.)].
4. Плешков В.Г., Привольнев В.В., Голуб А.В. Лечение хронических ран. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2015; 14 (2): 58–65. [Pleshkov V.G., Privol'nev V.V., Golub A.V. Treatment of chronic wounds. *Bulletin of Smolensk State Medical Academy*. 2015; 14 (2): 58–65 (in Russ.)].
5. Рябов А.А., Скалозуб О.И., Лапин Р.В. Лечение гнойных ран отрицательным давлением. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2014; (6): 58–60. [Ryabov A.L., Skalozub O.I., Lapin R.V. Treatment of purulent wounds with negative pressure. *Surgery. Journal of Them. N.I. Pirogov*. 2014; (6): 58–60 (in Russ.)].
6. Казарян Н.С., Козлов К.К., Быков А.Ю., Кокорин С.В., Викторов С.И. Лечение пациентов с гнойными ранами путем применения аспирационно-проточно-промывного дренажа новой конструкции. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; 68 (12): 64–68. [Kazaryan N.S., Kozlov K.K., Bykov A.Yu., Kokorin S.V., Viktorov S.I. Treatment of patients with purulent wounds by applying aspiration-flow-washing drainage of a new design. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2013; 68 (12): 64–68 (in Russ.)].
7. Липова Е.В., Покровский К.А., Грязева Н.В. Опыт применения аутологичной богатой тромбоцитами плазмы в лечении длительно незаживающих ран кожи. *Анналы хирургии*. 2012; (5): 41–44. [Lipova E.V., Pokrovskiy K.A., Gryazeva N.V. The experience of using autologous platelet-rich plasma in treatment of long-lasting non-healing skin wounds. *Annals of Surgery*. 2012; (5): 41–44 (in Russ.)].
8. Chiang N., Rodda O.A., Sleigh J., Vasudevan T. Effects of topical negative pressure therapy on tissue oxygenation and wound healing in vascular foot wounds. *J. Vasc. Surg.* 2017; 66 (2): 564–571. DOI: 10.1016/j.jvs.2017.02.050.
9. Yan D., Liu S., Zhao X., Bian H., Yao X., Xing J., Sun W., Chen X. Recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor in deep second-degree burn wound healing. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96 (22): e6881. DOI: 10.1097/MD.0000000000006881.
10. Попова Т.В., Толстикова Т.Г., Лetyagin А.Ю., Жукова Н.А., Бгатова Н.П., Рачковская Л.Н., Котлярова А.А., Бурмистров В.А. Влияние новой мазевой композиции аг/тага и хитозан-геля на лечение экспериментальных ран различной этиологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (1): 47–54. [Popova T.V., Tolstikova T.G., Letyagin A.Yu., Zhukova N.A., Bgatova N.P., Rachkovskaya L.N., Kotlyarova A.A., Burmistrov V.A. Influence of the new ointment composition ag/tag and chitosan gel on treatment of experimental wounds of different etiology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (1): 47–54. (in Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-1-47-54.

11. Бубенчикова В.Н., Малютина А.Ю., Новикова Л.С., Григорьян А.Ю., Затолокина М.А., Жилыева Л.В. Рано-заживляющая активность геля на основе густого экстракта травы прозання крапчатого. *Фундаментальные исследования*. 2013; (8-1): 123–127. [Bubenchikova V.N., Malyutina A.Yu., Novikova L.S., Grigoryan A.Yu., Zatolokina M.A., Zhilyaeva L.V. Wound healing activity of a gel based on thick extract of seasoned speckled grass. *Fundamental Research*. 2013; (8-1): 123–127 (in Russ.)].
12. Третьяков А.А., Петров С.В., Неверов А.Н., Щетинин А.Ф. Лечение гнойных ран. *Новости хирургии*. 2015; 23 (6): 680–687. DOI: 10.18484/2305-0047.2015.6.680. [Tret'yakov A.A., Petrov S.V., Neverov A.N., Shchetinin A.F. Treatment of purulent wounds. *Surgery News*. 2015; 23 (6): 680–687 (in Russ.)].
13. Горохова А.С., Григорьян А.Ю., Бежин А.И., Панкрушева Т.А., Жилыева Л.В., Мишина Е.С., Кобзарева Е.В. Эффективность иммобилизированной формы бензалкония хлорида в лечении гнойных ран. *Новости хирургии*. 2016; 24 (6): 539. [Gorokhova A.S., Grigoryan A.Yu., Bezhin A.I., Pankrusheva T.A., Zhilyaeva L.V., Mishina E.S., Kobzareva E.V. Efficacy of immobilized form of benzalkonium chloride in treatment of purulent wounds. *Surgery News*. 2016; 24 (6): 539–545 (in Russ.)]. DOI: 10.18484/2305-0047.2016.6.539.

## Вклад авторов

Григорьян А.Ю. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Бежин А.И. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Панкрушева Т.А. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Суковатых Б.С. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Чекмарева М.С. – анализ и интерпретация данных. Жилыева Л.В. – анализ и интерпретация данных.

## Authors contribution

Grigoryan A.Yu. – conception and design, analysis and interpretation of the data, justification of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Bezhin A.I. – justification of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Pankrusheva T.A. – justification of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Sukovatykh B.S. – justification of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Chekmareva M.S. – analysis and interpretation of the data. Zhilyaeva L.V. – analysis and interpretation of the data.

## Сведения об авторах

Григорьян Арсен Юрьевич, канд. мед. наук, доцент, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, КГМУ, г. Курск.

Бежин Александр Иванович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии, КГМУ, г. Курск.

Панкрушева Татьяна Александровна, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической технологии, КГМУ, г. Курск.

Суковатых Борис Семенович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей хирургии, КГМУ, г. Курск.

Чекмарева Марина Семеновна, канд. фарм. наук, ст. преподаватель, кафедра фармацевтической технологии, КГМУ, г. Курск.

Жилыева Людмила Владимировна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, КГМУ, г. Курск.

(✉) Григорьян Арсен Юрьевич, e-mail: arsgrigorian@mail.ru.

## Authors information

Grigoryan Arsen Yu., PhD, Assistant Professor, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation.

Bezhin Alexander I., DM, Professor, Head of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation.

Pankrusheva Tatyana A., DPhSc, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Technology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation.

Sukovatykh Boris S., DM, Professor, Head of the Department of General Surgery, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation.

Chekmareva Marina S., PhD, Senior Lecturer, Department of Pharmaceutical Technology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation.

Zhilyaeva Ludmila V., PhD, Assistant, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation.

(✉) Grigoryan Arsen Yu., e-mail: arsgrigorian@mail.ru.

Поступила в редакцию 18.08.2017

Подписана в печать 14.12.2018

Received 18.08.2017

Accepted 14.12.2018

## Разработка и свойства нового носителя доксорубина на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа с высокой эффективностью инкапсуляции и возможностью его контролируемого высвобождения

Ди Мартино А.<sup>1,3</sup>, Власов С.С.<sup>1,2</sup>, Гурьев А.М.<sup>2</sup>, Юсубов М.С.<sup>1,2</sup>,  
Постников П.С.<sup>1,4</sup>, Белоусов М.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

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

<sup>3</sup> Университет Томаша Бати в Злине  
Чешская Республика, 760 01, г. Злин, пр. Томаша Бати, 5678

<sup>4</sup> Высшая школа химической технологии  
Чешская Республика, 166 28, г. Прага, пр. Технический, 5

### РЕЗЮМЕ

В настоящее время химиотерапия в сочетании с хирургией и лучевой терапией является наиболее эффективным методом лечения рака. В то же время применение данного метода сопровождается серьезными побочными эффектами, обусловленными неспецифичностью большинства химиотерапевтических агентов. В связи с этим разработка систем доставки лекарственных средств (СДАС), способных обеспечить адресацию химиотерапевтического агента к раковым клеткам, а также его контролируемое высвобождение представляют собой перспективный подход для эффективного лечения онкологических заболеваний.

**Цель работы** – синтез нового СДАС на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа, изучение его свойств в качестве носителя химиотерапевтического агента (эффективность инкапсуляции, емкость загрузки, возможность контролируемого высвобождения химиотерапевтического агента) и безопасности.

**Материалы и методы.** Частицы были получены методом восстановления хлорида железа (III) боргидридом натрия с последующей *in situ* модификацией поверхности 4-карбоксибензолдиазония тозилатом согласно модифицированной методике. Наличие функциональных групп на поверхности подтверждали методом ИК-спектроскопии с использованием спектрометра Nicolet iS5 Infrared Spectrometer (Thermo Scientific, США). Размеры и поверхностный заряд микрочастиц в растворе исследовали методом динамического рассеяния света и дзета-потенциала. Для оценки влияния pH окружающей среды на скорость высвобождения доксорубина исследование проводили в моделированных физиологических условиях (pH 3,3; 5,5; 7,4). Изучение высвобождения под воздействием ультразвукового поля проводили одновременно при тех же условиях. Влияние модификации поверхности на эффективность инкапсуляции оценивали при различных значениях pH (3,3; 5,5; 7,4) и концентрациях доксорубина (0,2; 0,35; 0,5; 0,75; 1,0 мг/мл). Для подтверждения безопасности разработанной СДАС определение цитотоксичности проводили на клеточной линии HeLa (ATCC® CCL-2™).

**Результаты.** Предложена оригинальная методика получения носителя на основе микрочастиц ноль-валентного железа с ковалентно присоединенным к поверхности хитозаном (Fe-CS), обладающе-

го высокими значениями эффективности инкапсуляции и емкости загрузки доксорубина (0,9 мг на 1 мг микрочастиц Fe-CS), низкой цитотоксичностью, а также возможностью контролируемого высвобождения цитостатического агента (доксорубина) под воздействием ультразвукового излучения при различных значениях pH.

**Заключение.** Получен носитель на основе микрочастиц ноль-валентного железа с ковалентно присоединенным к поверхности хитозаном (Fe-CS). Определена эффективность инкапсуляции, емкость загрузки доксорубина и подтверждена возможность его контролируемого высвобождения под воздействием ультразвукового поля при различных значениях pH. В эксперименте *in vitro* на клеточной линии HeLa (ATCC® CCL-2™) установлено отсутствие токсичности для всех образцов (Fe<sup>0</sup>, Fe-COOH и Fe-CS) вне зависимости от их концентрации.

**Ключевые слова:** доксорубин, хитозан, микрочастицы ноль-валентного железа, доставка лекарственных средств, стимул-чувствительный носитель, контролируемое высвобождение.

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

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке проекта развития ТПУ.

**Для цитирования:** Ди Мартино А., Власов С.С., Гурьев А.М., Юсубов М.С., Постников П.С., Белосусов М.В. Разработка и свойства нового носителя доксорубина на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа с высокой эффективностью инкапсуляции и возможностью его контролируемого высвобождения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 69–79. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-69-79>.

---

УДК 615.277.3.015.14:546.72-022.532

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-69-79>

## Development and properties of a new doxorubicin carrier based on surface-modified iron zero-valent microparticles with high encapsulation efficiency and the possibility of its controlled release

Di Martino A.<sup>1,3</sup>, Vlasov S.S.<sup>1,2</sup>, Guryev A.M.<sup>2</sup>, Yusubov M.S.<sup>1,2</sup>, Postnikov P.S.<sup>1,4</sup>, Belousov M.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)  
30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian State Medical University (SSMU)  
2, Moscow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>3</sup> Tomas Bata University in Zlin  
5678, Tr. Tomas Bata Zlin, 760 01, Czech Republic

<sup>4</sup> University of Chemistry and Technology  
166 28 Prague, Czech Republic

### ABSTRACT

Currently, chemotherapy combined with surgery and radiation therapy is the most effective treatment for cancer. At the same time, the use of this method is accompanied by serious side effects caused by the lack of specificity of most chemotherapeutic agents. In this regard, the development of drug delivery systems (DDS) capable of addressing a chemotherapeutic agent to cancer cells, as well as its controlled release, is a promising approach for the effective treatment of cancer.



The aim of the study is to synthesize a new DDS based on surface-modified microparticles of zero-valent iron, to study its properties as a carrier of a chemotherapeutic agent (encapsulation efficiency, loading capacity, possibility of controlled release of a chemotherapeutic agent) and safety.

**Materials and methods.** The microparticles were synthesised by reduction of iron (III) chloride with sodium borohydride followed by *in situ* surface modification by 4-carboxybenzyl diazonium tosylate. To confirm the occurrence of the reaction, FTIR spectroscopy (Nicolet iS5 Infrared Spectrometer (Thermo Scientific, USA)) was used. Hydrodynamic diameter and surface charge of the microparticles in solution were investigated by dynamic light scattering (DLS) and z-potential. DOX release studies were performed in simulated physiological conditions (pH 3.3; 5.5; 7.4) to evaluate the effect of the external pH on the release rate. Release studies under ultrasound irradiation were performed simultaneously in the same conditions. The effect of surface modification on encapsulation efficiency was evaluated at various pH values (3.3; 5.5; 7.4) and doxorubicin concentrations (0.2; 0.35; 0.5; 0.75; 1.0 mg/ml). To demonstrate the safety of the developed system, cytotoxicity studies were performed on HeLa cell lines (ATCC® CCL-2™).

**Results.** An original method of preparation of the drug carrier, based on iron zero-valent microparticles with covalently attached chitosan (Fe-CS) on their surface was proposed. Prepared microparticles demonstrated high encapsulation efficiency, drug loading capacity of DOX (0.9 mg per 1 mg of Fe-CS microparticles), low cytotoxicity and also a possibility to modulate the release rate by ultrasound irradiation and by changing pH of the external environment.

**Conclusion.** A carrier based on microparticles of zero-valent iron with covalently attached to the surface chitosan (Fe-CS) was obtained. The efficiency of encapsulation, the loading capacity of doxorubicin was determined and the possibility of its controlled release under the influence of an ultrasonic field at different pH values was confirmed. In an *in vitro* experiment on the HeLa cell line (ATCC® CCL-2™), no toxicity was established for all samples (Fe<sup>0</sup>, Fe-COOH и Fe-CS), regardless of their concentration.

**Key words:** doxorubicin, chitosan, zerovalent iron microparticles, drug delivery, stimuli responsive carrier, controlled release.

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

**Source of financing.** The study was supported by the TPU development project.

**For citation:** Di Martino A., Vlasov S.S., Guryev A.M., Yusubov M.S., Postnikov P.S., Belousov M.V. Development and properties of a new doxorubicin carrier based on surface-modified iron zero-valent microparticles with high encapsulation efficiency and the possibility of its controlled release. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 69–79. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-69-79>.

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что химиотерапия является одним из основных [1] и наиболее эффективных методов лечения злокачественных новообразований, ее применение по-прежнему ограничивается серьезными побочными эффектами [2, 3]. Одной из причин возникновения побочных эффектов является отсутствие специфичности химиотерапевтических агентов к опухоли, в результате чего их курсовое введение приводит к токсическому воздействию на здоровые клетки организма [4]. Таким образом, помимо снижения качества жизни пациентов побочные эффекты химиотерапии остаются весьма серьезным препятствием для ее успешного клинического применения [5].

Одним из путей решения данной проблемы является использование систем доставки лекарственных средств (СДАС). Благодаря данным системам стало возможно значительное снижение числа побочных эффектов проводимой хи-

миотерапии, а также использование новых, более эффективных режимов лечения [6], поскольку СДАС обеспечивают легкое введение лекарственного средства, а также увеличение его накопления в опухоли [7–9]. В то же время основными недостатками большинства СДАС могут являться низкое содержание действующего вещества, невозможность удаленного инициирования его высвобождения, а также низкая эффективность инкапсуляции терапевтического агента.

Существует ряд работ, посвященных преодолению указанных недостатков. Так, например, инкапсуляция препарата может быть увеличена при использовании амфифильных полипептидов [10] или олигонуклеотидов [11], однако использование хитозана в качестве модификатора поверхности носителя может позволить увеличить загрузку химиотерапевтического агента за счет возможности образования большого числа водородных связей, а также за счет физических

взаимодействий [12] вследствие особенностей его полимерной структуры. В качестве модельного химиотерапевтического агента планируется использование доксорубина, связывание которого с поверхностью носителя происходит за счет возникающих электростатических взаимодействий. Поскольку в молекулах доксорубина и хитозана присутствуют положительно заряженные аминокислотные группы [13–16], то для электростатического связывания данных компонентов системы целесообразно использование отрицательно заряженного кросс-линкера, например натрия триполифосфата [17]. Преимуществами подобной СДАС являются более высокая эффективность инкапсуляции и, следовательно, повышение содержания терапевтического агента, а также возможность управления кинетикой его высвобождения за счет воздействия как внешних (ультразвуковое излучение), так и внутренних факторов (значения pH окружающей среды). Более того, частицы ноль-валентного железа являются перспективным носителем для разработки эффективной СДАС за счет их лучших магнитных свойств по сравнению с оксидами железа [18], а использование микронных размеров частиц позволяет решать задачи локальной эмболизации опухоли для терапевтических целей.

Таким образом, целью данной работы является синтез новой СДАС на основе поверхностно-модифицированных микрокапсул ноль-валентного железа, изучение его свойств в качестве носителя химиотерапевтического агента (эффективность инкапсуляции, емкость загрузки, возможность контролируемого высвобождения химиотерапевтического агента) и безопасности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований были использованы реагенты и органические растворители, являющиеся товарными продуктами фирм Aldrich (США), Fluka (Австрия) и др., соответствующей чистоты, которые использовались без предварительной очистки.

Определение размеров и дзета-потенциала микрокапсул проводили с использованием водной суспензии с концентрацией 1 мг/мл и pH = 7 на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Для определения размеров применяли метод динамического рассеяния света. Доказательство ковалентной прививки органических функциональных групп на микрокапсулы железа (Fe-COOH) оценивали методом ИК-спектроскопии на приборе Nicolet iS5 Infrared Spectrometer (Thermo Scientific, США).

*Методика синтеза 4-карбокситетрагидропиримидина.* Синтез осуществляли в соответствии с методикой [19].

*Методика синтеза микрокапсул Fe-COOH и Fe-CS.* Синтез микрокапсул железа проводили по модифицированному методу синтеза, разработанному ранее [20]. Хлорид железа (III) (0,406 г; 1,5 ммоль) и натрия боргидрид (0,171 г; 4,5 ммоль) растворяли в 10 мл дистиллированной воды. Далее в трехгорлой колбе в атмосфере аргона смешивали по 5 мл приготовленных растворов. Перемешивание осуществляли в течение 10 мин с использованием магнитной мешалки. Затем к полученной смеси добавляли оставшиеся 5 мл растворов хлорида железа (III) и натрия боргидрида и снова перемешивали в течение 10 мин. Далее к полученной реакционной массе приливали 20 мл водного раствора 4-карбокситетрагидропиримидина (0,3 г) и продолжали перемешивание в течение еще 40 мин. Полученные микрокапсулы Fe-COOH выделяли из смеси путем осаждения с помощью неодимового магнита и последовательно промывали водой, этанолом и ацетоном до достижения прозрачного раствора над частицами. После промывки микрокапсулы высушивали лиофильно для удаления следов растворителей.

Для получения микрокапсул Fe-CS навеску микрокапсул Fe-COOH массой 75 мг, полученных на предыдущем этапе, суспендировали в 75 мл воды. К полученной суспензии добавляли 12,9 мг N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида и 15,54 мг N-гидроксисукцинимиды. Смесь перемешивали в течение 2 ч. Параллельно растворяли 750 мг хитозана в 300 мл 1%-й (об/об) уксусной кислоты. Далее суспензию Fe-COOH приливали к раствору хитозана. Полученную смесь оставляли при интенсивном перемешивании на 48 ч.

Затем для выделения микрокапсул Fe-CS полученную смесь центрифугировали при 7 500 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отделяли, а полученный осадок повторно суспендировали в 50 мл дистиллированной воды и центрифугировали при тех же условиях. Процедуру отмывки повторяли 3 раза. Очищенные микрокапсулы Fe-CS высушивали лиофильно.

*Методика получения конъюгата Fe-CS/ДОКС.* Навеску микрокапсул Fe-CS массой 20 мг суспендировали в 20 мл воды. Параллельно готовили по 20 мл растворов доксорубина (ДОКС) и натрия триполифосфата (ТПП) с концентрациями 1 мг/мл. Оба раствора смешивали и оставляли при перемешивании в течение 1 ч на магнитной мешалке.

Далее полученную смесь ДОКС/ТПП по каплям добавляли к суспензии микрочастиц Fe-CS. Смесь Fe-CS/ТПП/ДОКС оставляли при интенсивном перемешивании на 2 ч.

Полученную реакционную массу центрифугировали при 7 500 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отделяли, а осадок микрочастиц повторно суспендировали в дистиллированной воде и центрифугировали при тех же условиях, а затем высушивали лиофильно.

*Изучение высвобождения доксорубина и эффективности инкапсуляции.* Изучение высвобождения проводили при постоянной температуре 37 °С и перемешивании 100 об/мин. Для проведения эксперимента использовали инкубатор Stuart SI 500 (Stuart, Великобритания). В качестве растворителя использовали смесь KCl/HCl с начальным значением pH = 3,3. Смесь готовили путем смешивания 50 мл 0,2 М раствора KCl со 140 мл дистиллированной воды. Далее добавляли 0,2 М раствор соляной кислоты до достижения pH = 3,3. Затем полученный раствор доводили до 400 мл дистиллированной водой. Изучение высвобождения проводили при трех различных значениях pH (3,3; 5,5; 7,4). Величину значений кислотности изменяли последовательно. Для проведения эксперимента готовили 10 мл суспензии конъюгата Fe-CS/ДОКС с концентрацией 1 мг/мл. Исследуемый образец помещали в инкубатор и через установленные промежутки времени отбирали пробы среды высвобождения в объеме 2 мл. Образец предварительно центрифугировали при 7 500 об/мин в течение 5 мин. Концентрацию высвободившегося доксорубина в пробе определяли методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм на спектрофотометре Evolution 201/220 UV-Visible Spectrophotometers (Thermo Scientific, США). Отобранный объем среды замещали эквивалентным объемом свежего раствора KCl/HCl. Изменение значений pH проводили путем добавления 0,1 М раствора натрия гидроксида до достижения необходимого значения.

Изучение высвобождения доксорубина под воздействием ультразвука проводили параллельно при условиях, аналогичных описанным выше. Отличием данной методики является внесение исследуемого образца в ультразвуковое поле с частотой 75 кГц и удельной мощностью 2 Вт/см<sup>2</sup> на 30 с. В качестве источника ультразвукового излучения использовали ультразвуковую ванну Elmasonic S10H (Elma, Германия). Обработку ультразвуком осуществляли непосредственно перед центрифугированием образца. Концентрацию

высвободившегося доксорубина в пробе также определяли методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм.

Использование ультразвукового (УЗ) излучения низкой частоты необходимо для инициирования высвобождения доксорубина без повреждения структуры тканей организма. Описанное значение частоты УЗ излучения было использовано для демонстрации чувствительности исследуемой системы к внешним иницирующим воздействиям.

Эффективность инкапсуляции (ЭИ) определяли в соответствии с методом [21]. Расчет ЭИ проводили по формуле

$$\text{ЭИ (\%)} = \left( \frac{D_T - D_\phi}{D_T} \right) \times 100,$$

где  $D_T$  – теоретическая концентрация взятого для загрузки доксорубина,  $D_\phi$  – концентрация ДОКС после процесса инкапсуляции.

Концентрацию доксорубина в образцах определяли методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм. Для расчета концентрации использовали калибровочную кривую, которую строили по результатам измерения поглощения падающего света растворами доксорубина в диапазоне концентраций 3,75–60 мкг/мл [22].

Влияние pH и поверхностной модификации на изменение ЭИ оценивали по следующей методике. Раствор ДОКС (1 мг/мл, 1 мл) добавляли к суспензии ноль-валентного железа или Fe-COOH (1 мг/мл, 1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 5 мин, затем центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин. Образовавшийся супернатант отбирали для анализа. Для микрочастиц Fe-CS определение ЭИ проводили в соответствии с описанной методикой, но с использованием смеси ДОКС/ТПП (2 мл, вместо раствора ДОКС). Смесь ДОКС/ТПП готовили в соответствии с разделом «Методика получения конъюгата Fe-CS/ДОКС» и к суспензии микрочастиц прибавляли по каплям.

Влияние концентрации ДОКС на ЭИ изучали при pH = 5,5 по следующей методике. Раствор ДОКС объемом 1 мл с исследуемой концентрацией (0,4; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 мг/мл) добавляли к суспензии, содержащей ноль-валентное железо или Fe-COOH (1 мг/мл, 1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 5 мин, затем центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин. Образовавшийся супернатант отбирали для анализа. Для микрочастиц Fe-CS определение проводили в соответствии с описанной методикой, но с использованием смеси ДОКС/ТПП вместо раствора ДОКС. Смесь ДОКС/ТПП готовили с использо-

ванием растворов доксорубина с концентрациями (0,6; 1,05; 1,5; 2,25; 3,0 мг/мл) в соответствии с разделом «Методика получения конъюгата Fe-CS/ДОКС» и к суспензии микрочастиц прибавляли по каплям.

**Методика изучения цитотоксичности.** Определение цитотоксичности проводили с использованием клеточной линии HeLa (ATCC® CCL-2™). Выживаемость клеток *in vitro* определяли методом МТТ в соответствии со следующим протоколом [23]. Клетки культивировали в отдельных средах ( $2,5 \times 10^5$  клеток/мл), содержащих микрочастицы железа ноль-валентного ( $\text{Fe}^0$ ), Fe-COOH и Fe-CS, соответственно, в течение 24, 48 и 72 ч. Среда, не содержащую микрочастиц, использовали в качестве контроля.

Суспензии анализируемых образцов микрочастиц с концентрацией 5–100 мкг/мл готовили непосредственно в среде. Удаление среды из каждой ячейки производили методом аспирации. Клетки в каждой ячейке промывали 200 мкл фосфатного буфера, а затем в каждую ячейку добавляли по 50 мкл раствора метилтиазолилтетразолия (МТТ) в концентрации 1 мг/мл. Спустя 2 ч инкубирования раствор МТТ удаляли путем аспирации и добавляли по 50 мкл изопропанола в каждую ячейку для растворения формазановых кристаллов. Оптическую плотность измеряли трижды для каждого образца при длине волны 595 нм с использованием многоканального считывателя (Тесап, Швейцария). Выживаемость клеток (%) рассчитывали как соотношение средних значений оптической плотности для каждого образца ( $I_{\text{образец}}$ ) и контрольного образца ( $I_{\text{контроль}}$ ).

$$\text{Выживаемость (\%)} = \frac{(I_{\text{образец}})}{(I_{\text{контроль}})} \times 100$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нами был проведен синтез микрочастиц железа, покрытых органическими функциональными группами. Для этого мы модифицировали ранее опубликованный метод [20], включающий в себя восстановление железа из соответствующего трихлорида борогидридом натрия в присутствии 4-карбоксибензолдиазоний тозилата. Для получения частиц микронных размеров мы использовали двухстадийное добавление трихлорида железа для роста частиц, и лишь потом добавляли раствор 4-карбоксибензолдиазоний тозилата для модификации. Размер полученных микрочастиц контролировали с использованием метода динамического светорассеивания (таблица).

Таблица

Размер и дзета-потенциал микрочастиц		
Название образца	Размер частиц, мкм	Дзета-потенциал, мВ
$\text{Fe}^0$	$4,19 \pm 0,12$	$-0,03 \pm 0,01$
Fe-COOH	$4,32 \pm 0,18$	$-18,92 \pm 0,81$
Fe-CS	$4,48 \pm 0,28$	$20,61 \pm 1,51$

Эксперименты по определению размеров микрочастиц железа ( $\text{Fe}^0$ , Fe-COOH и Fe-CS) показали отсутствие значимой дисперсии результатов в ходе проводимых модификаций.

Отрицательное значение дзета-потенциала для микрочастиц Fe-COOH объясняется присутствием на их поверхности карбоксильных групп. После дальнейшей модификации хитозаном происходит резкий сдвиг дзета-потенциала в положительную сторону, что, с одной стороны, объясняется появлением положительно заряженных аминогрупп, а с другой – уменьшением числа свободных карбоксильных групп за счет их участия в образовании амидной связи.

Полученные данные косвенно подтверждают ковалентную модификацию поверхности 4-карбоксифенильными группами, а также вторичную прививку хитозана на поверхность. Данные факты также были подтверждены методом ИК-спектроскопии (рис. 1).

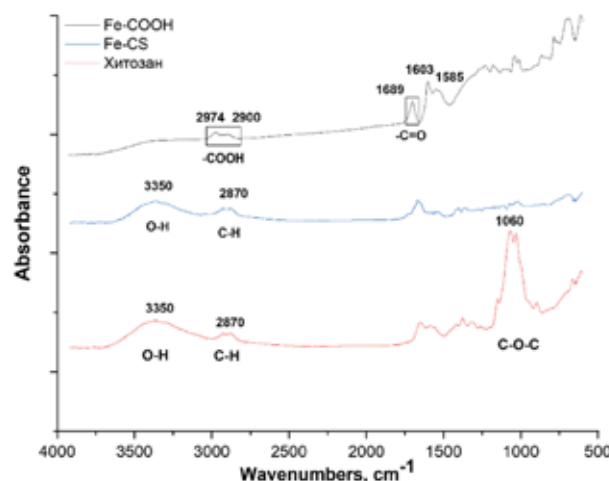


Рис. 1. ИК-спектры микрочастиц Fe-COOH, Fe-CS и чистого хитозана

Fig. 1. FTIR spectra of Fe-COOH, Fe-CS microparticles and pure chitosan

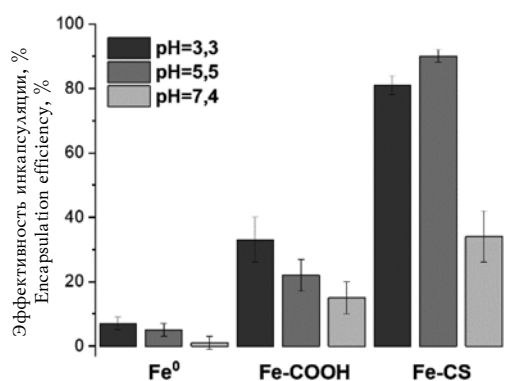
На спектре микрочастиц Fe-COOH наблюдались пики поглощения при длинах волн  $\nu$  2 974, 2 900 и  $\nu_{\text{C=O}}$  1 689  $\text{cm}^{-1}$ , что указывает на присутствие карбоксильной группы (-COOH). По-

глощение при длинах волн  $\nu_{C-C}$  1 603 и 1 585  $\text{см}^{-1}$  подтверждает присутствие бензольного кольца. Таким образом, полученные результаты могут указывать на прививку 4-карбоксифенильных групп к поверхности микрочастиц [24].

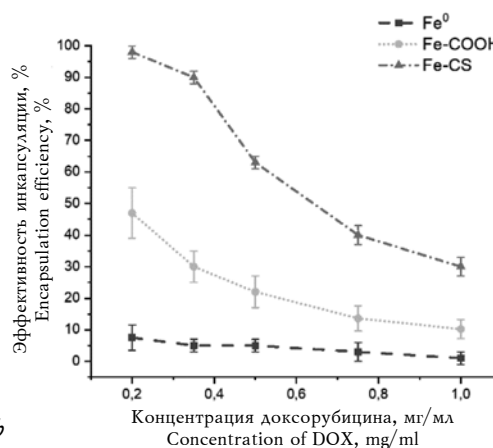
Спектры микрочастиц Fe-CS и хитозана сравнивали между собой. Спектр хитозана характеризуется наличием основных пиков поглощения

при длинах волн 3 350  $\text{см}^{-1}$ , 2 870  $\text{см}^{-1}$  ( $\nu_{CH}$ ) и 1 060  $\text{см}^{-1}$  ( $\nu_{C-O-C}$ ). На спектре микрочастиц Fe-CS также присутствуют полосы поглощения при длинах волн 3 350  $\text{см}^{-1}$  ( $\nu_{OH}$ ), 2 870  $\text{см}^{-1}$  ( $\nu_{CH}$ ). В результате чего можно сделать вывод о наличии хитозана в структуре микрочастиц Fe-CS.

*Изучение эффективности инкапсуляции и контролируемого высвобождения доксорубицина.*



a



b

Рис. 2. Влияние pH и поверхностной модификации ДОКС (a) и концентрации ДОКС (b) на эффективность инкапсуляции

Fig. 2. Influence of pH and surface modification of DOX (a) and the concentration of DOX (b) on the encapsulation efficiency

Результаты, представленные на рис. 2, a, демонстрируют положительное влияние поверхностной модификации на ЭИ доксорубицина. Присутствие карбоксильных групп (-COOH) на поверхности микрочастиц значительно увеличивает эффективность инкапсуляции (более 25%) по сравнению с немодифицированными микрочастицами (Fe<sup>0</sup>). Более того, благодаря дальнейшей модификации поверхности (присоединение хитозана), эффективность инкапсуляции была увеличена до 90%, что делает систему Fe-CS подходящей для использования в качестве носителя лекарственных средств. Данное явление может быть объяснено следующим образом: молекулы доксорубицина из-за наличия положительно заряженных аминогрупп вступают в электростатические взаимодействия с карбоксильными группами микрочастиц Fe-COOH. Связывание компонентов усиливается благодаря появлению водородных связей [12].

В системе Fe-CS присоединение ДОКС также осуществлялось благодаря электростатическим взаимодействиям. За счет большого числа положительно заряженных аминогрупп в молекуле хитозана происходит увеличение емкости загрузки отрицательно заряженных молекул, что, в свою

очередь, приводит к увеличению ЭИ. Поскольку молекула ДОКС несет положительный заряд, ее присоединение к микрочастицам Fe-CS происходит с использованием отрицательного заряженного кросс-линкера (ТПП) в виде комплекса ДОКС-ТПП. Более того, повышение ЭИ может быть связано с увеличением числа водородных связей. Подтверждено влияние pH на ЭИ.

В эксперименте было показано последовательное уменьшение ЭИ при увеличении значений pH. Для микрочастиц Fe-COOH при увеличении pH с 3,3 на 5,5 ЭИ снижалась на 11%. При более сильном увеличении (с 3,3 на 7,4) ЭИ уменьшалась на 18% (см. рис. 2, a). Это объясняется за счет депротонирования функциональных групп (-NH<sup>+</sup> и -COOH), что, в свою очередь, приводит к изменению их зарядов и ослаблению электростатических взаимодействий.

В системе Fe-CS также наблюдалось снижение ЭИ с увеличением значения pH за счет уменьшения прочности электростатических взаимодействий между функциональными группами ДОКС, хитозана и TPP. В данном случае, благодаря присутствию гидрофильного покрытия (хитозана), происходит увеличение числа водородных связей, что повышает стабильность конъюгата.

На рис. 2, б, представлена оценка влияния концентрации доксорубина в реакционной смеси на эффективность инкапсуляции. В случае микрочастиц  $\text{Fe}^0$  наблюдалось стабильное уменьшение ЭИ после ее начального снижения. При концентрации ДОКС 0,5 мг/мл было достигнуто равновесие между процессами адсорбции-десорбции (ЭИ = 5%), о чем свидетельствует дальнейшее последовательное снижение ЭИ при увеличении концентрации ДОКС.

В случае микрочастиц  $\text{Fe-COOH}$  и  $\text{Fe-CS}$  наблюдалась похожая тенденция, но в отличие от  $\text{Fe}^0$  снижение наблюдалось на всем диапазоне исследуемых концентраций. В результате полученные данные подтверждают влияние поверхностной модификации на эффективность инкапсуляции. Также в ходе проведения эксперимента было установлено значение емкости загрузки, которое составило 0,9 мг доксорубина на 1 мг микрочастиц  $\text{Fe-CS}$ .

Оценку возможности контролируемого высвобождения доксорубина из системы  $\text{Fe-CS}$  про-

водили в эксперименте *in vitro* под воздействием УЗ-излучения при последовательном изменении значений pH.

Полученные в ходе эксперимента результаты (рис. 3) подтверждают влияние УЗ-излучения на скорость высвобождения терапевтического агента вне зависимости от pH среды. Такое влияние объясняется появлением кавитационных пузырьков в среде высвобождения при воздействии на нее ультразвука. Их дальнейшее разрушение приводит к появлению градиента сдвига, который, в свою очередь, вызывает растяжение и разрыв химических связей [25]. Присоединение компонентов системы, в том числе и терапевтического агента, происходит за счет электростатических взаимодействий, которые являются менее прочными, чем химические связи. В результате постепенное растяжение приводит к их разрушению и ускоренному высвобождению доксорубина. Таким образом, для исследуемой системы была подтверждена возможность контролируемого высвобождения доксорубина.

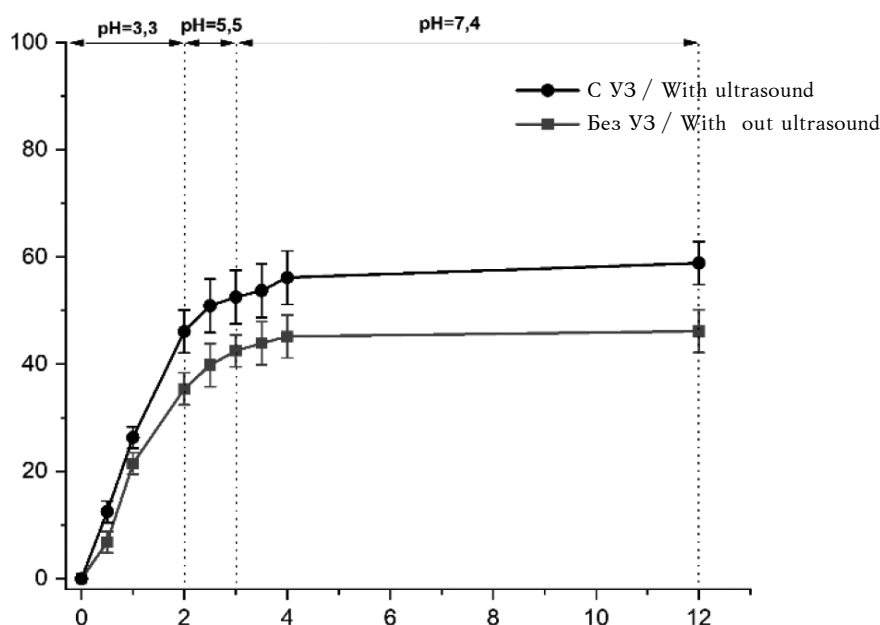


Рис. 3. Высвобождение доксорубина из конъюгата  $\text{Fe-CS/DOX}$ : по оси OX — время, ч; по оси OY — количество, %

Fig. 3. Release of doxorubicin from conjugate  $\text{Fe-CS / DOX}$  along the OX axis — time, h; OY axis — quantity, %

**Исследование цитотоксичности.** Результаты изучения цитотоксичности микрочастиц представлены на рис. 4.

Из диаграммы видно, что значения выживаемости клеток в присутствии различных концентраций исследуемых микрочастиц не отличаются

от значений, наблюдаемых в контроле (значения с концентрацией микрочастиц 0 мкг/мл), что свидетельствует об отсутствии самостоятельных цитотоксических свойств разрабатываемой СДАС (при отсутствии нагруженного химиотерапевтического агента).



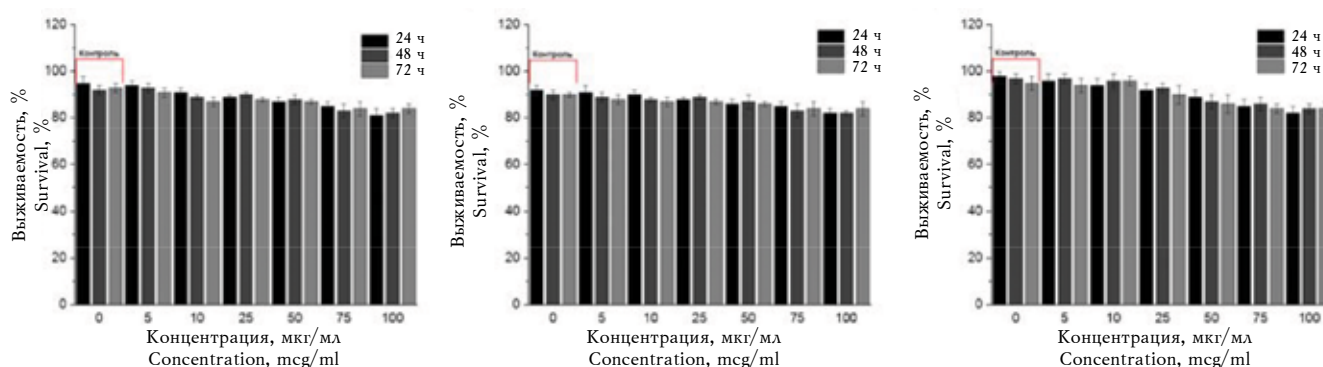


Рис. 4. Выживаемость клеточной линии HeLa в присутствии микрочастиц Fe<sup>0</sup> (a), Fe-COOH (b) и Fe-CS (c) в зависимости от их концентрации и времени культивирования клеток

Fig. 4. HeLa cell line viability in presence of Fe<sup>0</sup> (a), Fe-COOH (b) and Fe-CS (c) microparticles depending on their concentration and the time of cell cultivation

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований был разработан способ получения СДАС (Fe-CS/ДОКС) на основе микрочастиц ноль-валентного железа с ковалентно присоединенным к поверхности хитозаном. Изучена эффективность инкапсуляции химиотерапевтического агента (доксорубина) и определена емкость его загрузки (0,9 мг на 1 мг микрочастиц Fe-CS). Установлены значения контролируемого высвобождения доксорубина из конъюгата Fe-CS/ДОКС за 12 ч под воздействием ультразвукового излучения при различных значениях pH в эксперименте *in vitro* (58,8% под воздействием ультразвукового поля и 46,1 без его воздействия). Отсутствие цитотоксичности полученных микрочастиц было подтверждено в эксперименте *in vitro* на клеточной линии HeLa (ATCC® CCL-2™) для всех образцов (Fe<sup>0</sup>, Fe-COOH и Fe-CS) вне зависимости от их концентрации.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Liu F.S. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy – A quick review. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 2009; 48 (3): 239–244. DOI: 10.1016/S1028-4559(09)60296-5.
- Wang D., Zhou J., Shi R., Wu H., Chen R., Duan B., Xia G., Xu P., Wang H., Zhou S., Wang C., Wang H., Guo Z., Chen Q. Biodegradable core-shell dual-metal-organic-frameworks nanotheranostic agent for multiple imaging guided combination cancer therapy. *Theranostics*. 2017; 7 (18): 4605–4617. DOI: 10.7150/thno.20363.
- Jain R.K., Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010; 7 (11): 653–664. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.139.
- Palumbo M.O., Kavan P., Miller W.H. Jr., Panasci L., Assouline S., Johnson N., Cohen V., Patenaude F., Pollak M., Jagoe R.T., Batist G. Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. *Front. Pharmacol.* 2013; 4 (57): 1–9. DOI: 10.3389/fphar.2013.00057.
- Sak. K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemotherapy Research and Practice*. 2012; 2012: 282570. DOI: 10.1155/2012/282570.
- Prasanna N.R., Triveni C., Soumya R., Ramana B.V., Nagarajan G. Novel Delivery Systems in Cancer Chemotherapy. *Research & Reviews in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013; 2 (1): 8–19.
- Hu Q., Sun W., Wang C., Gu Z. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016; 98: 19–34. DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.022.
- Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2007; 2 (12): 751–760. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.
- Farokhzad O.C., Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009; 3 (1): 16–20. DOI: 10.1021/nn900002m.
- Lv S., Li M., Tang Z., Song W., Sun H., Liu H., Chen X. Doxorubicin-loaded amphiphilic polypeptide-based nanoparticles as an efficient drug delivery system for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2013; 9 (12): 9330–9342. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.015.
- Lee C.S., Kim H., Yu J., Yu S.H., Ban S., Oh S., Jeong D., Im J., Baek M.J., Kim T.H. Doxorubicin-loaded oligonucleotide conjugated gold nanoparticles: a promising in vivo drug delivery system for colorectal cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 142: 416–423. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.08.063.
- Di Martino A., Guselnikova O.A., Trusova M.E., Postnikov P.S., Sedlarik V. Organic-inorganic hybrid nanoparticles controlled delivery system for anticancer drugs. *Int. J. Pharm.* 2017; 526 (1–2): 380–390. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.061.
- Kiraly R., Martin R.B. Metal ion binding to daunorubicin and quinizarin. *Inorg. Chim. Acta*. 1982; 67: 13–18.

14. Gallois L., Fiallo M., Garnier-Suillerot A. Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1998; 1370 (1): 31–40.
15. Pavinatto F.J., Caseli L., Oliveira O.N. Jr. Chitosan in nanostructured thin films. *Biomacromolecules.* 2010; 11 (8): 1897–1908. DOI: 10.1021/bm1004838.
16. Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polymer J.* 2013; 49 (4): 780–792.
17. Yang W., Fu J., Wang T., He N. Chitosan/Sodium triphosphate nanoparticles: preparation, characterization and application as drug carrier. *J. Biomed Nanotechnol.* 2009; 5 (5): 591–595.
18. Xu Y., Zhang X.Y., Hsing Y.M., Fang Y.Z. Ultrasonic-assisted synthesis of Fe nanoparticles in the presence of Poly (N-vinyl-2-pyrrolidone). *Chinese J. Chem.* 2011; 29: 1829–1836.
19. Filimonov V.D., Trusova M.E., Postnikov P.S., Krasnokutskaya E.A., Lee Y. M., Hwang H. Y., Kim H., Chi K. W. Unusually stable, versatile, and pure arene diazonium tosylates: their preparation, structures, and synthetic applicability. *Org. Lett.* 2008; 10 (18): 3961–3964. DOI: 10.1021/ol8013528.
20. Guselnikova O.A., Galanov A.I., Gutakovskii A.K., Postnikov P.S. The convenient preparation of stable aryl-coated zerovalent iron nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2015; 6: 1192–1198. DOI: 10.3762/bjnano.6.121.
21. Fang C., Kievit F.M., Veisheh O., Stephen Z.R., Wang T., Lee D., Ellenbogen R.G., Zhang M. Fabrication of magnetic nanoparticles with controllable drug loading and release through a simple assembly approach. *J. Control Release.* 2012; 162 (1): 233–241. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.028.
22. Soares P.I.P., Sousa A.I., Ferreira I.M.M., Novo C.M.M., Borges J.P. Towards the development of multifunctional chitosan-based iron oxide nanoparticles: Optimization and modelling of doxorubicin release. *Carbohydr. Polym.* 2016; 153 (20): 212–221. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.07.109.
23. Prodan A.M., Iconaru S.L., Ciobanu C.S., Chifiriuc M.C., Stoicea M., Predoi D. Iron oxide magnetic nanoparticles: characterization and toxicity evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays. *Journal of Nanomaterials.* 2013; 2013: 10. DOI: 10.1155/2013/587021.
24. Chehimi M.M., Lamouri A., Picot M., Pinson J. Surface modification of polymers by reduction of diazonium salts. The example of polymethylmethacrylate. *J. Mater. Chem. C.* 2014; 2: 356–363. DOI: 10.1039/C3TC31492H.
25. Paulusse J.M.J., Sijbesma R.P. Ultrasound in polymer chemistry: Revival of an established technique. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* 2006; 44 (19): 5445–5453. DOI: 10.1002/pola.21646.

## Вклад авторов

Ди Мартино А., Власов С.С. – проведение практической части исследования, разработка концепции, дизайна, анализ и интерпретация данных. Гурьев А.М., Юсубов М.С., Постников П.С., Белоусов М.В. – разработка концепции, дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

## Authors contribution

Di Martino A., Vlasov S.S. – carrying out the practical part of the research, development of the concept, design, analysis and interpretation of data. Gurev A.M., Yusubov M.S., Postnikov P.S., Belousov M.V. – development of the concept, design, verification of critical intellectual content, final approval for publication of the manuscript.

## Сведения об авторах

Ди Мартино Антонио, PhD, науч. сотрудник, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск; мл. науч. сотрудник, центр полимерных систем, Университет Томаша Бати, г. Злин, Чешская Республика.

Власов Сергей Сергеевич, аспирант, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск; технолог, Центр внедрения технологий, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Гурьев Артем Михайлович, д-р фарм. наук, руководитель Центра внедрения технологий, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

## Authors information

Di Martino Antonio, PhD, Researcher, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, NR TPU, Tomsk, Russian Federation; Senior Researcher, Centre of Polymer Systems, Tomas Bata University, Zlin, Czech Republic.

Vlasov Sergei S., PhD Student, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, NR TPU, Tomsk, Russian Federation; Production Engineer, Technology Implementation Centre of Central Scientific Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Guryev Artem M., DPharmSc, Head of Technology Implementation Centre of Central Scientific Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Юсубов Мехман Сулейманович**, д-р хим. наук, профессор, директор Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск; гл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

**Постников Павел Сергеевич**, канд. хим. наук, доцент, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск

**Белоусов Михаил Валерьевич**, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ; НИ ТПУ, г. Томск.

(✉) **Власов Сергей Сергеевич**, e-mail: unreal800@gmail.com.

**Yusubov Mekhman S.**, DChSc, Full Professor, Headmaster of Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, NR TPU, Tomsk, Russian Federation; Chief Researcher, Central Scientific Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Postnikov Pavel S.**, PhD, Associate Professor, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, NR TPU, Tomsk, Russian Federation;

**Belousov Mikhail V.**, DPharmSc., Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, SSMU; NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Vlasov Sergei S.**, e-mail: unreal800@gmail.com.

Поступила в редакцию 03.05.2018  
Подписана в печать 14.12.2018

Received 03.05.2018  
Accepted 14.12.2018

## Нейропротективные свойства ингибитора C-Jun N-terminal kinase (JNK) при гипоксической гипоксии

Зюзьков Г.Н., Удуд Е.В., Мирошниченко Л.А., Полякова Т.Ю.,  
Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Агафонов В.И., Жданов В.В.

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

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования** – выявить влияние ингибитора JNK на формирование нарушений психоневрологического статуса экспериментальных животных при моделировании постгипоксической энцефалопатии и вскрыть механизмы его действия, связанные с функционированием нейральных стволовых клеток (СК) головного мозга.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 96 аутбредных самцах мышей. Постгипоксическая энцефалопатия моделировалась у беспородных мышей с помощью гипоксии гермообъема. Ингибитор JNK вводили мышам однократно перед гипоксическим воздействием подкожно в дозе 15 мг/кг. Изучали психоневрологический статус, содержание нейральных СК в субвентрикулярной зоне головного мозга экспериментальных животных и прямое влияние ингибитора JNK на интактные нейральные СК в условиях *in vitro*.

**Результаты.** Выявили выраженное церебропротекторное действие фармакологического агента, заключающееся в нормализации показателей ориентировочно-исследовательского поведения и условно-рефлекторной деятельности у экспериментальных животных. Указанные эффекты развивались на фоне значительного увеличения содержания нейральных СК в субвентрикулярной зоне головного мозга. При этом в экспериментах *in vitro* обнаружено прямое стимулирующее влияние ингибитора JNK на нейральные СК.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о выраженном нейропротекторном действии ингибитора JNK. При этом в основе предупреждения развития нарушений деятельности ЦНС и их компенсации, очевидно, лежит сохранность способности нервной ткани к репарации, связанной с функционированием резидентных нейральных СК.

**Ключевые слова:** регенеративная медицина, церебропротекторные средства, ингибитор JNK, сигнальная трансдукция, энцефалопатия, нейральные стволовые клетки.

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

**Источник финансирования.** Исследование выполнено в рамках темы № 0550-2014-0207 государственного задания ФАНО России и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00013.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено комитетом по этике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ РАН (протокол № 514092017 от 14.09.2017).

**Для цитирования:** Зюзьков Г.Н., Удуд Е.В., Мирошниченко Л.А., Полякова Т.Ю., Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Агафонов В.И., Жданов В.В. Нейропротективные свойства ингибитора C-Jun

N-terminal kinase (JNK) при гипоксической гипоксии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 80–88. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-80-88>.

УДК 616.24-008.4-001.83-085.214.21

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-80-88>

## Neuroprotective properties of the C-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor in hypoxic hypoxia

Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Poljakova T.Ju.,  
Simanina E.V., Stavrova L.A., Agafonov V.I., Zhdanov V.V.

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

### ABSTRACT

**The aim** of the study was to reveal the influence of the JNK inhibitor on the induction of disturbances in the psychoneurological status of experimental animals in the modeling of posthypoxic encephalopathy and to reveal the mechanisms of its action related to the functioning of the neural stem cells of the brain.

**Materials and methods.** The experiments were performed on 64 male outbred mice. Posthypoxic encephalopathy was modeled in non-native mice with hypoxia of the hermetic volume. The JNK inhibitor was administered to mice subcutaneously at a dose of 15 mg/kg once before hypoxic exposure. We studied the neuropsychiatric status, the content of neuronal stem cells in the subventricular zone of the brain of experimental animals, and the direct effect of the JNK inhibitor on intact neural stem cells *in vitro*.

**Results.** The expressed cerebroprotective action of the pharmacological agent was revealed, which consisted of normalizing the indices of orientation and exploratory behavior and conditioned activity in experimental animals. These effects developed against a background of a significant increase in the content of neural stem cells in the subventricular zone of the brain. In the experiments *in vitro*, a direct stimulating effect of the JNK inhibitor on neural stem cells was found.

**Conclusions.** The obtained results showed a neuroprotective action of the JNK inhibitor. At the same time, the prevention and compensation of the development of disturbances in the activity of the central nervous system is based on the preservation of the ability of the nerve tissue to repair and associated with the functioning of resident neural stem cells.

**Key words:** regenerative medicine, cerebroprotective drugs, inhibitor JNK, signal transduction, encephalopathy, neural stem 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 study was performed under the task number 0550-2014-0207 of the state assignment of the Federal Agency for Scientific Organizations of Russia; and with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research under the research project No. 18-015-00013.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the ethics committee at GRIPRM, TNRMС of RAS (Protocol No. 514092017 of 14.09.2017).

**For citation:** Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Poljakova T.Ju., Simanina E.V., Stavrova L.A., Agafonov V.I., Zhdanov V.V. Neuroprotective properties of the C-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor in hypoxic hypoxia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 80–88. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-80-88>.

## ВВЕДЕНИЕ

Фармакологическое действие существующих в настоящее время церебропротекторных средств заключается, как правило, в защите либо модуляции функций сохранившихся в условиях патологических процессов в головном мозге зрелых клеточных элементов нервной ткани [1, 2]. Однако часто используемая концепция медикаментозного воздействия оказывается абсолютно несостоятельной. Несмотря на имеющийся широкий арсенал ноотропных и нейропротекторных препаратов, в ряде случаев не удается не только восстановить морфофункциональное состояние головного мозга, но и предотвратить прогрессию развития патологического процесса в нервной ткани, в том числе после перенесенных гипоксических и ишемических состояний [3–6].

В связи с этим актуальными являются разработки принципиально новых церебропротекторных средств. Выявленная нами ранее специфика внутриклеточной сигнальной трансдукции в различных типах клеток-предшественников послужила основой для разработки нового запатентованного направления таргетной терапии в регенеративной медицине – «Стратегии фармакологической регуляции внутриклеточной сигнальной трансдукции в регенераторно-компетентных клетках» [7]. Данный подход предполагает использование в качестве «мишеней» фармакологического воздействия отдельных внутриклеточных сигнальных молекул, вовлеченных в процесс реализации ростового потенциала родоначальных элементов, либо клеток-регуляторов их функций [7–9].

В НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ РАН, проведен цикл работ по выявлению роли JNK (c-Jun N-terminal kinases, c-Jun N-концевая киназа) в жизнедеятельности родоначальных клеток различных классов. На модели постгипоксической энцефалопатии обнаружено терапевтическое действие ингибитора данной сигнальной молекулы (при его введении после моделирования патологического состояния), связанное с активацией резидентных нейральных стволовых клеток (СК) субвентрикулярной зоны головного мозга экспериментальных животных [10]. В то же время представляется актуальным изучение возможности профилактического использования указанного модификатора активности JNK для предупреждения развития патологии мозга после кислородной недостаточности.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния ингибитора JNK на формирование нарушений психоневрологического статуса экс-

периментальных животных при моделировании постгипоксической энцефалопатии и изучение его действия на функционирование нейральных СК головного мозга в условиях *in vitro* и *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на 96 аутбредных самцах мышей, масса тела 18–22 г. Животные 1-й категории (конвенциональные мыши), получены из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ РАН.

Постгипоксическую энцефалопатию моделировали 54 животным путем двукратного (с промежутком перед повторным воздействием в 10 мин) помещения животных в гермокамеру объемом 500 мл. Мышей из гермокамеры извлекали после окончания генерализованных судорог и (или) остановки дыхания (определяемой визуально) в течение 10–15 с [3]. Группу 1 составили 6 интактных животных.

Ингибитор JNK (JNK inhibitor «SP600125», производство InvivoGen, США) вводили 27 мышам однократно за 60 мин перед моделированием патологического состояния подкожно в дозе 15 мг/кг (в объеме 0,2 мл растворителя) (группа 3). Контрольной группе животных ( $n = 27$ ) в аналогичном режиме вводили растворитель в эквивалентном объеме (группа 2).

Психофармакологические эффекты средства оценивали функциональными методами. На 7-, 14-, 21-е сут регистрировали ориентировочно-исследовательское поведение в тесте «открытое поле» (в течение первой и двух последующих минут раздельно), а на 14-, 21-е сут опыта проверяли сохранность условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), выработанного на 3-и сут после гипоксии [11].

С целью изучения механизмов развития церебропротекторных эффектов на 3-и и 7-е сут после гипоксии определяли содержание нейральных клеток-предшественников в головном мозге, а также прямое действие фармакологического агента (в концентрации 10 мкМ) на интактные нейральные СК. На данном этапе работы было использовано 36 животных, по шесть в каждой группе. Нервную ткань для исследования брали из субвентрикулярной зоны больших полушарий головного мозга. Взятый материал после предварительной подготовки помещали в жидкую культуральную среду специального состава, содержащую  $10^5$ /мл клеток. Для изучения состояния пула регионарных клеток-предшественников культуру инкубировали



в течение 7 сут в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С, 5%-м CO<sub>2</sub> и 100%-й влажности воздуха. После инкубации подсчитывали число нейральных колониеобразующих единиц (КОЕ-Н) – нейральных СК [1, 12].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента (при оценке функциональных расстройств ЦНС) и непараметрического критерия Манна – Уитни (при обработке данных культуральных исследований). Данные представлены в виде средней и ошибки средней  $M \pm m$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гипоксическое воздействие оказывало существенное влияние на психоневрологический статус животных. Регистрировалось значительное увеличение числа горизонтальных перемещений в открытом поле, как в первый (1-я мин), так и во второй период наблюдения (2–3-я мин) в начальные сроки исследования (7-е сут опыта) в

основном за счет их горизонтальных перемещений. При этом на 14-е сут опыта имело место падение суммарной и горизонтальной двигательной активности в 1-ю мин наблюдения, сменяющееся возрастанием на 2–3-й мин. На 21-е сут эксперимента характер изменений исследуемых параметров совпадал с таковым на 7-е сут после гипоксии (табл. 1).

Выявленная динамика двигательной активности соответствовала полученным нами ранее результатам о формировании нарушений ориентировочно-исследовательского поведения животных при постгипоксической энцефалопатии, связанной с расстройствами когнитивной, а не локомоторной функции ЦНС [10, 11]. Подтверждением этого являлось резкое снижение уровня воспроизведения УРПИ у мышей, подвергшихся гипоксии (табл. 2). При этом отмечалась спонтанная смертность животных, достигающая к 21-м сут эксперимента 34,2%.

Таблица 1  
Table 1

Показатели ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле аутбредных мышей (группа 1); у мышей после гипоксического воздействия (группа 2); у мышей, получавших ингибитор JNK на фоне моделирования постгипоксической энцефалопатии (группа 3), $M \pm m$							
Indicators of orienting-exploratory behavior in the open field of outbred mice (1); in mice after hypoxia (2); in mice receiving the JNK inhibitor before modeling posthypoxic encephalopathy (3), $M \pm m$							
Группа животных Group of animals	Суммарная двигательная активность, усл. ед. Total motor activity, conventional units	Горизонтальная активность, усл. ед. Horizontal activity, conventional units	Вертикальная активность, усл. ед. Vertical activity, conventional units	Норковый рефлекс, усл. ед. "Mink" reflex, conventional units	Обнюхивание отверстий, усл. ед. Sniffing holes, conventional units	Груминг, усл. ед. Grooming, conventional units	Коэффициент асимметрии, % Asymmetry coefficient, %
7-е сут 7 <sup>th</sup> day							
Первый период исследования, 1-я мин First study period, 1 <sup>st</sup> minute							
1, $n = 6$	7,7 ± 0,5	4,1 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,7	1,9 ± 0,5	0	30,6 ± 4,7
2, $n = 27$	12,1 ± 0,9* $p = 0,003$	8,2 ± 0,5* $p < 0,001$ ()	0,2 ± 0,2	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,8	0	44,3 ± 6,1
3, $n = 27$	5,3 ± 1,1# $p < 0,001$	2,8 ± 0,9# $p < 0,001$	0	0	0,7 ± 0,4	0	40,6 ± 4,3
Второй период исследования, 2–3-я мин Second study period, 2–3 min							
1, $n = 6$	20,8 ± 3,3	9,4 ± 2,8	0,6 ± 0,3	3,4 ± 1,1	6,3 ± 1,4	0,8 ± 0,2	35,8 ± 3,6
2, $n = 27$	36,3 ± 3,4* $p = 0,04$	19,6 ± 2,2* $p = 0,045$	1,2 ± 0,7	7,0 ± 1,5	6,1 ± 1,4	1,0 ± 0,2	44,9 ± 4,1
3, $n = 27$	17,4 ± 4,3	7,8 ± 1,3	0,8 ± 0,2	3,8 ± 1,1	2,7 ± 1,6	1,2 ± 0,3	39,9 ± 2,6
14-е сут 14 <sup>th</sup> day							
Первый период исследования, 1-я мин First study period, 1 <sup>st</sup> minute							
1, $n = 6$	3,5 ± 0,5	1,2 ± 0,0	0,7 ± 0,7	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,5	0,25 ± 0,12	23,3 ± 1,6
2, $n = 21$	0,7 ± 0,3* $p < 0,001$	0,3 ± 0,1* $p = 0,009$	0	0	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	33,3 ± 2,1* $p = 0,02$

Окончание табл. 1

End of table 1

Группа животных Group of animals	Суммарная двигательная активность, усл. ед. Total motor activity, conventional units	Горизонтальная активность, усл. ед. Horizontal activity, conventional units	Вертикальная активность, усл. ед. Vertical activity, conventional units	Норковый рефлекс, усл. ед. “Mink” reflex, conventional units	Обнюхивание отверстий, усл. ед. Sniffing holes, conventional units	Груминг, усл. ед. Grooming, conventional units	Коэффициент асимметрии, % Asymmetry coefficient, %
3, $n = 22$	$4,7 \pm 1,5\#$ $p = 0,014$	$2,2 \pm 0,3\#$ $p < 0,001$	0	$1,5 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,7$	0	$27,4 \pm 1,8\#$ $p = 0,03$
Второй период исследования, 2–3-я мин Second study period, 2–3 min							
1, $n = 6$	$14,6 \pm 2,2$	$6,7 \pm 1,6$	$1,2 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,9$	$2,6 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,2$	$34,6 \pm 3,0$
2, $n = 21$	$19,1 \pm 3,1$	$11,7 \pm 1,2^*$ $p = 0,04$	$0,7 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,5$	$3,6 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,3$	$60,3 \pm 4,9^*$ $p = 0,011$
3, $n = 22$	$16,5 \pm 2,7$	$8,3 \pm 1,1\#$ $p = 0,043$	$0,3 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,4$	$1,15 \pm 0,3$	$38,0 \pm 3,8\#$ $p < 0,001$
21-е сут 21 <sup>st</sup> day							
Первый период исследования, 1-я мин First study period, 1 <sup>st</sup> minute							
1, $n = 6$	$6,0 \pm 1,2$	$2,2 \pm 0,7$	0	$1,3 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,6$	0	$31,6 \pm 2,7$
2, $n = 17$	$13,8 \pm 1,6^*$ $p = 0,012$	$9,6 \pm 1,7^*$ $p = 0,019$	0	$1,1 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,7$	0	$66,7 \pm 3,7^*$ $p < 0,001$
3, $n = 19$	$9,5 \pm 1,2$	$4,8 \pm 1,2\#$ $p = 0,025$	$0,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$	$33,9 \pm 5,3\#$ $p < 0,001$
Второй период исследования, 2–3-я мин Second study period, 2–3 min							
1, $n = 6$	$18,5 \pm 2,2$	$5,5 \pm 1,3$	0	$4,6 \pm 1,0$	$6,8 \pm 1,4$	$1,0 \pm 0,3$	$25,0 \pm 2,3$
2, $n = 17$	$20,1 \pm 1,9$	$10,3 \pm 1,7$	$0,2 \pm 0,2$	$3,4 \pm 1,4$	$4,4 \pm 1,4$	$0,7 \pm 0,2$	$42,7 \pm 3,1^*$ $p = 0,004$
3, $n = 19$	$15,4 \pm 2,6$	$5,8 \pm 1,3\#$ $p = 0,041$	0	$3,9 \pm 1,3$	$2,6 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,3$	$26,6 \pm 3,7\#$ $p = 0,002$

\* достоверность различий показателей с аналогичными у интактных мышей (группа 1).

\* indicates statistically significant differences in comparison with the indices in intact mice (group 1).

# достоверность различий показателей с аналогичными у мышей с постгипоксической энцефалопатией (группа 2).

# indicates statistically significant differences in comparison with the indices in mice with posthypoxic encephalopathy (group 2).

Таблица 2

Table 2

Показатели выработки и воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания у аутбредных мышей (группа 1); у мышей после гипоксического воздействия (группа 2); у мышей, получавших ингибитор JNK перед моделированием постгипоксической энцефалопатии (группа 3), $M \pm m$							
Indicators of development and reproduction of the reflex of passive avoidance in outbred mice (1); in mice after hypoxia (2); in mice treated with the JNK inhibitor prior to modeling posthypoxic encephalopathy (3), $M \pm m$							
Группа животных Group of animals	14-е сут 14 <sup>th</sup> day			Группа животных Group of animals	21-е сут 21 <sup>st</sup> day		
	Латентное время рефлекса, с Latent reflex time, sec	Время нахождения в темном отсеке, с Time spent in the dark compartment, sec	Число животных с сохранившимся рефлексом, % The number of animals with preserved reflex, %		Латентное время рефлекса, с Latent reflex time, sec	Время нахождения в темном отсеке, с Time spent in the dark compartment, sec	Число животных с сохранившимся рефлексом, % The number of animals with preserved reflex, %
1, $n = 6$	$156,9 \pm 23,1$	$7,9 \pm 7,4$	84,2	1, $n = 6$	$90,1 \pm 30,2$	$11,4 \pm 6,0$	43,7
2, $n = 21$	$124,9 \pm 26,6$	$9,3 \pm 4,2$	$33,7^*$ $p = 0,014$	2, $n = 1$	$73,7 \pm 23,9$	$23,9 \pm 6,6$	$15,9^*$ $p = 0,005$

Группа животных Group of animals	14-е сут 14 <sup>th</sup> day			Группа животных Group of animals	21-е сут 21 <sup>st</sup> day		
	Латентное время рефлекса, с Latent reflex time, sec	Время нахождения в темном отсеке, с Time spent in the dark compartment, sec	Число животных с сохранившимся рефлексом, % The number of animals with preserved reflex, %		Латентное время рефлекса, с Latent reflex time, sec	Время нахождения в темном отсеке, с Time spent in the dark compartment, sec	Число животных с сохранившимся рефлексом, % The number of animals with preserved reflex, %
3, $n = 22$	161,0 $\pm$ 20,1	3,5 $\pm$ 3,3	84,2# $p = 0,039$	3, $n = 19$	132,3 $\pm$ 28,3	16,4 $\pm$ 9,9	54,7# $p = 0,018$

\* достоверность различий показателей с аналогичными у интактных мышей (группа 1).

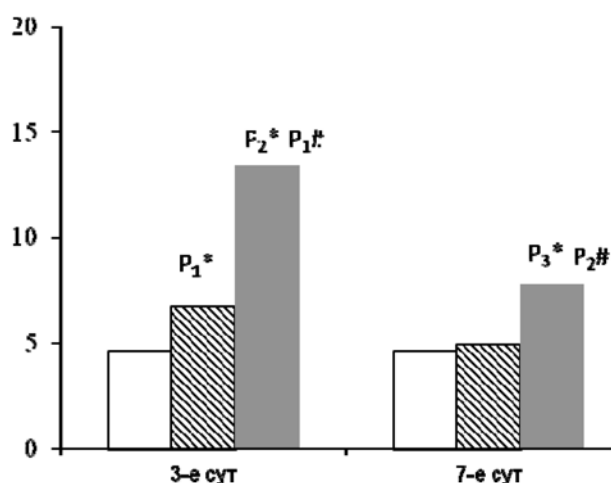
\* indicates statistically significant differences in comparison with the indices in intact mice (group 1).

# достоверность различий показателей с аналогичными у мышей с постгипоксической энцефалопатией (группа 2).

# indicates statistically significant differences in comparison with the indices in mice with posthypoxic encephalopathy (group 2).

Описанные изменения психоневрологического статуса развивались на фоне повышения содержания нейральных клеток-предшественников в субвентрикулярной области головного мозга мышей (до 145,7% от исходного уровня на 3-и сут

опыта) (рис. 1). Таким образом, моделирование гипоксической гипоксии приводило к развитию выраженной энцефалопатии, несмотря на активацию механизмов компенсации «глубокого резерва» – регионарных стволовых клеток ЦНС [3, 5].



Цифровые данные к рис. 1

Digital data to fig. 1

Срок наблюдения Observation period	Группа животных Group of animals	КОЕ-Н, М
3-и сут 3 <sup>rd</sup> day	Интактные Intact	4,6
	С гипоксией With hypoxia	6,7
	+ ингибитор JNK	13,4
7-е сут 7 <sup>th</sup> day	Интактные Intact	4,6
	С гипоксией With hypoxia	4,9
	+ ингибитор JNK + JNK inhibitor	7,8

Примечание. Доверительные интервалы при  $p \leq 0,05$ .

Note. Confidence intervals with  $p \leq 0.05$ .

Рис. 1. Количество нейральных колониеобразующих единиц в культуре клеток субвентрикулярной зоны головного мозга интактных аутбредных мышей-самцов,  $n = 12$  (белые столбики); мышей после моделирования постгипоксической энцефалопатии,  $n = 12$  (заштрихованные столбики); мышей, получавших ингибитор JNK перед моделированием постгипоксической энцефалопатии,  $n = 12$  (серые столбики). По оси абсцисс – срок исследования, сут; по оси ординат – значения показателя,  $\times 10^5$  нуклеаров.

\* достоверность различий показателей с аналогичными у интактных мышей при  $p_1 = 0,047$ ;  $p_2 < 0,001$ ;  $p_3 = 0,018$ .

# достоверность различий показателей с аналогичными у мышей с постгипоксической энцефалопатией при  $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 = 0,03$

Fig. 1. The number of neural colony-forming units in the culture of subventricular brain cells of intact outbred male mice (white bars); mice after modeling posthypoxic encephalopathy (shaded bars); mice that received the JNK inhibitor before modeling posthypoxic encephalopathy (grey bars). X-line – the time of the study (days); Y-line – the indicator values,  $\times 10^5$  nuclears.

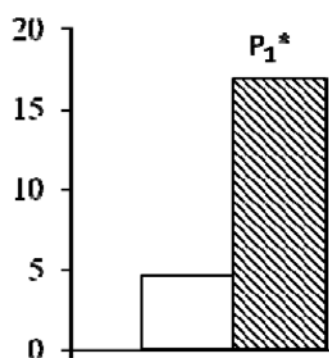
\* indicates statistically significant differences in comparison with the indices in intact animals ( $p_1 = 0.047$ ;  $p_2 < 0.001$ ;  $p_3 = 0.018$ ). # indicates statistically significant differences in comparison with the indices in mice with posthypoxic encephalopathy ( $p_1 < 0.001$ ;  $p_2 = 0.03$ )

Изучение ориентировочно-исследовательского поведения экспериментальных животных, которым перед моделированием патологии вводили ингибитор JNK, выявило практически полную нормализацию показателей психоневрологического статуса.

Имела место отмена появления признаков патологии мозга, регистрируемых у мышей, как в открытом поле, так и при воспроизведении УРПИ (см. табл. 1, 2). При этом ни одно животное в данной группе не погибло. Более того, коррекция функциональных нарушений деятельности ЦНС наблюдалась на фоне значительного увеличения количества резидентных нейральных

прогениторных клеток во все сроки исследования (см. рис. 1). Содержание КОЕ-Н в субвентрикулярной зоне головного мозга составляло 200,0% и 159,2% на 3-и и 7-е сут опыта соответственно от такового у контрольных мышей (не получавших ингибитор JNK).

Кроме того, в ходе изучения механизмов развития психофармакологических эффектов было обнаружено прямое стимулирующее действие фармакологического агента на нейральные стволовые клетки. В условиях *in vitro* отмечалось резкое возрастание выхода КОЕ-Н при внесении в культуральную среду данного модификатора активности протеинкиназы (до 367,4% от фона) (рис. 2).



Цифровые данные к рис. 2  
Digital data to fig. 2

Группа Group	КОЕ-Н, М
Интактные Intact	4,6
+ ингибитор JNK + JNK inhibitor	16,9

Рис. 2. Количество нейральных колониеобразующих единиц в культуре интактных клеток субвентрикулярной области головного мозга аутобредных мышей-самцов,  $n = 12$  (белые столбики) и при добавлении в среду ингибитора JNK (заштрихованные столбики).

\* достоверность различий показателей между группами при  $p_1 = 0,013$

Fig. 2. The number of neural colony-forming units in the culture of intact cells of the subventricular region of the brain of outbred male mice,  $n = 12$  (white bars) and the addition of JNK inhibitor (shaded bars) to the medium.

\* indicates statistically significant differences between the groups ( $p_1 = 0,013$ )

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном нейропротективном действии ингибитора JNK при тяжелой гипоксической травме. При этом ключевая роль в предупреждении им развития нарушений деятельности ЦНС и их компенсации, очевидно, принадлежит сохранению способности нервной ткани к репарации, связанной с обеспечением адекватного функционирования резидентных нейральных СК головного мозга [5, 6]. В основе реализации данного механизма лежит, по-видимому, не только прямое стимулирующее влияние блокады JNK-опосредованного сигналинга в отношении прогрессии клеточного цикла родоначальных элементов, но и требующее дальнейшего экспериментального подтверждения – торможение процессов их JNK-зависимого апоптоза [13–15].

В целом выявленные закономерности указывают на перспективность применения «Стратегии

таргетной фармакологической регуляции внутриклеточной сигнальной трансдукции в регенераторно-компетентных клетках» в неврологической практике [7] и использования JNK нейральных стволовых клеток в качестве мишени для нейропротекторных средств нового поколения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Удуд Е.В., Хричкова Т.Ю., Мирошниченко Л.А., Симанина Е.В., Ставрова Л.А. Методические рекомендации по изучению специфической активности средств для регенеративной медицины. Руководство по проведению доклинических исследований новых лекарственных средств; под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013: 776–787. [Dygai A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Udud E.V., Khrichkova T.Y., Miroshnichenko L.A., Simanina E.V., Stavrova L.A. Methodological recommendations for studying the specific activity of agents for regenerative medicine; edited by A.N. Mironova. M.: Grif i K Publ., 2013: 776–787 (in Russ.).]

2. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные и нейропротекторные средства. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2007; 70 (4): 44–58. [Voroni-na T.A., Seredenin S.B. Nootropic and neuroprotective agents. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2007; 70 (4): 44–58 (in Russ.)].
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Гипоксия и система крови. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006: 142. [Gol'dberg E.D., Dygai A.M., Zyuz'kov G.N. Hypoxia and the blood system. Tomsk: Publishing house of Tomsk State University, 2006: 142 (in Russ.)].
4. Faden A.I., Wu J.F., Stoica B.A., Loane D.J. Progressive inflammation-mediated neuro-degeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *British Journal of Pharmacology*. 2016; 173: 681–691. DOI: 10.1111/bph.13179.
5. Binan L., Ajji A., De Crescenzo G., Jolicoeur M. Approaches for neural tissue re-generation. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2014; 10 (1): 44–59. DOI: 10.1007/s12015-013-9474-z.
6. Yuan T.F., Gu S., Shan C., Marchado S., Arias-Carriyn O. Oxidative Stress and Adult Neurogenesis. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2015; 11 (5): 706–709. DOI: 10.1007/s12015-015-9603-y.
7. Зюзьков Г.Н., Жданов В.В., Данилец М.Г., Мирошниченко Л.А., Удут Е.В., Дыгай А.М. Пат. 2599289 RU. Средства, стимулирующие регенерацию тканей. № 2013156908; Заявл. 14.09.2016; Опубл. 10.10.2016. Бюл. № 28. [Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V., Danilec M.G., Miroshnichenko L.A., Udut E.V., Dygai A.M. Patent 2599289 RU, Agents that stimulate the regeneration of tissues. № 2013156908; Stated 14.09.2016; Published 10.10.2016. Bulletin № 28 (in Russ.)].
8. Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Polyakova T.Y., Simanina E.V., Stavrova L.A., Chaikovskii A.V., Agafonov V.I., Borodulina E.V., Timofeev M.S., Zyuz'kova Y.N., Danilets M.G., Zhdanov V.V., Udut V.V. Particular role of JAK/STAT3 signaling in functional control of mesenchymal progenitor cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018; 164 (3): 316–319. DOI: 10.1007/s10517-018-3980-6.
9. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции. *Патогенез*. 2011; 9 (3): 4–14. [Luk'janova L.D., Kirova Ju.I., Sukojan G.V. [New on the signal mechanisms of adaptation to hypoxia and their role in systemic regulation. *Pathogenesis*. 2011; 9 (3): 4–14 (in Russ.)].
10. Zyuz'kov G.N., Suslov N.I., Povet'eva T.N., Nesterova Y.V., Afanas'eva O.G., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Simanina E.V., Polyakova T.Y., Stavrova L.A., Chaikovskii A.V., Kul'pin P.V., Udut V.V., Dygai A.M., Zhdanov V.V. Psychopharmacological effects of JNK inhibitor in post-hypoxic encephalopathy and mechanisms of their development. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 163 (1): 18–21. DOI: 10.1007/s10517-017-3727-9.
11. Curzon P., Zhang M., Radek R.J., Fox G.B. The behavioral assessment of sensorimotor processes in the mouse: acoustic startle, sensory gating, locomotor activity, rotarod, and beam walking / in «Methods of behavior analysis in neuroscience». Second Edition, ed. J.J. Buccafusco. Boca Raton–London–New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2009: 145–178. PMID: 21204341.
12. Guo W., Patzlaff N.E., Jobe E.M., Zhao X. Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. *Nature Protocols*. 2012; 7 (11): 2005–2012. DOI: 10.1038/nprot.2012.123.
13. Zhou L., Yang Z., Lu X., Li X., An X., Chai J., Yang Q., Yan S., Li Y. JNK inhibitor alleviates apoptosis of fetal neural stem cells induced by emulsified isoflurane. *Oncotarget*. 2017; 8 (55): 94009–94019. DOI: 10.18632/oncotarget.21505.
14. Kucinski I., Dinan M., Kolahgar G., Piddini E. Chronic activation of JNK JAK/STAT and oxidative stress signaling causes the loser cell status. *Nat. Commun*. 2017; 8 (1):136. DOI: 10.1038/s41467-017-00145-y.
15. Berganticos C., Corominas M., Serras F. Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signaling. *Development*. 2010; 137 (7): 1169–1179. DOI: 10.1242/dev.045559.

## Вклад авторов

Зюзьков Г.Н. – разработка концепции и плана исследований, анализ и интерпретация данных, утверждение статьи для публикации. Удут Е.В. – проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Мирошниченко Л.А. – проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Полякова Т.Ю. – проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация данных, редактирование и оформление статьи. Симанина Е.В. – проведение экспериментальных исследований. Ставрова Л.А. – проведение

## Author contribution

Zyuzkov G.N. – development of the concept and the plan of the research, analysis and interpretation of data, approval of the article for publication. Udut E.V. – conducting experimental research, analysis and interpretation of data, writing a manuscript of the article. Miroshnichenko L.A. – conducting experimental research, analysis and interpretation of data, writing a manuscript of the article. Polyakova T.Yu. – conducting experimental research, analysis and interpretation of data, editing and design of the article. Simanina E.V. – conducting experimental research. Stavrova L.A. – conducting experimental research, statistical processing of the results of

экспериментальных исследований, статистическая обработка результатов работ. Агафонов В.И. – проведение экспериментальных исследований. Жданов В.В. – анализ и интерпретация данных.

work. Agafonov V.I. – conducting experimental research. Zhdanov V.V. – analysis and interpretation of data.

## Сведения об авторах

**Зюзьков Глеб Николаевич**, д-р мед. наук, профессор РАН, зав. лабораторией патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0384-333X.

**Удуд Елена Владимировна**, д-р мед. наук, профессор РАН, вед. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-6104-4782.

**Мирошниченко Лариса Аркадьевна**, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-3684-5510.

**Полякова Татьяна Юрьевна**, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0971-7844.

**Симанина Елена Владиславовна**, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1890-6946.

**Ставрова Лариса Александровна**, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4729-6406.

**Агафонов Владимир Иванович**, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-9800-0487.

**Жданов Вадим Вадимович**, д-р мед. наук, профессор, директор НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9516-0204.

(✉) **Зюзьков Глеб Николаевич**, e-mail: zgn@pharmso.ru.

## Author information

**Zyuz'kov Gleb N.**, DM, Professor of RAS, Head of the Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0384-333X.

**Udud Elena V.**, DM, Professor of RAS, Leading Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6104-4782.

**Miroshnichenko Larisa A.**, DM, Senior Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-3684-5510.

**Poljakova Tat'jana Ju.**, DM, Senior Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0971-7844.

**Simanina Elena V.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of pathophysiology and experimental therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1890-6946.

**Stavrova Larisa A.**, PhD, Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, ORCID iD 0000-0002-4729-6406.

**Agafonov Vladimir I.**, DM, Professor, Principal Researcher, Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9800-0487.

**Zhdanov Vadim V.**, DM, Professor, Director of GRIPRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9516-0204.

(✉) **Zyuz'kov Gleb N.**, e-mail: zgn@pharmso.ru.

Received 13.03.2018

Accepted 14.12.2018

Поступила в редакцию 13.03.2018

Подписана в печать 14.12.2018



## Обнаружение и генотипирование *Anaplasma phagocytophilum* в клещах *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, собранных в г. Томске в 2015–2016 гг.

Карташов М.Ю.<sup>1,2</sup>, Микрюкова Т.П.<sup>1</sup>, Москвитина Н.С.<sup>3</sup>, Кривошеина Е.И.<sup>1</sup>, Кузнецов А.И.<sup>1</sup>, Романенко В.Н.<sup>3</sup>, Большакова Н.П.<sup>3</sup>, Терновой В.А.<sup>1</sup>, Локтев В.Б.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор»  
Россия, 630559, Новосибирская область, р.н. Кольцово

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Новосибирский государственный университет (НГУ)  
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

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

<sup>4</sup> Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (ФИЦ ИЦиГ СО РАН)  
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** Выявление первых случаев заболевания клещевым гранулоцитарным анаплазмозом человека в Российской Федерации, обнаружение генетических маркеров анаплазмозов в иксодовых клещах, регистрация значительного количества случаев различных клещевых инфекций на юге Западной Сибири ставят вопрос о возможной циркуляции возбудителя анаплазмоза в г. Томске и его пригородах.

**Цель исследования.** Изучение распространения и видового разнообразия *A. phagocytophilum* в иксодовых клещах на территории Томской области.

**Материалы и методы.** Проведен анализ 690 индивидуальных образцов личинок и имаго иксодовых клещей видов *Ixodes persulcatus* ( $n = 530$ ) и *Dermacentor reticulatus* ( $n = 160$ ), собранных в 2015–2016 гг. на территории городских и пригородных биотопов г. Томска. Первичный скрининг клещей на наличие генетического материала *A. phagocytophilum* проводили с помощью двухраундовой полимеразной цепной реакции в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена *16S рРНК*. Для положительных изолятов осуществлялось амплифицирование фрагмента (1 220 пар нуклеотидов) *groESL*-оперона белков теплового шока с последующим определением нуклеотидной последовательности фрагмента гена и проведением филогенетического анализа.

**Результаты.** Уровень инфицированности *A. phagocytophilum* у личинок *I. persulcatus* составил  $(1,2 \pm 0,6)\%$ ; у половозрелых особей *I. persulcatus* –  $(1,8 \pm 0,7)\%$ ; у половозрелых особей *D. reticulatus* –  $(0,6 \pm 0,3)\%$ . Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента *groESL*-оперона для девяти изолятов подтвердил обнаружение генетического материала возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза. Филогенетический анализ показал, что все изоляты относятся к первой группе «нового» кластера *A. phagocytophilum*.

**Вывод.** Возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека впервые обнаружен в клещах *I. persulcatus*, собранных в городских и пригородных биотопах г. Томска, и *D. reticulatus* из городского биотопа.

**Ключевые слова:** гранулоцитарный анаплазмоз человека, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor reticulatus*.

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

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ и НИОКТР «Изучение генетического разнообразия клещевых инфекций» (AAAA-A17-117060510019-7).

**Для цитирования:** Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П., Москвитина Н.С., Кривошеина Е.И., Кузнецов А.И., Романенко В.Н., Большакова Н.П., Терновой В.А., Локтев В.Б. Обнаружение и генотипирование *Anaplasma phagocytophilum* в клещах *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, собранных в г. Томске в 2015–2016 гг. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 89–98. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-89-98](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-89-98).

УДК 579.881.3:595.421](571.16)

[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-89-98](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-89-98)

## Detection and genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* in *I. persulcatus* and *D. reticulatus* ticks collected in Tomsk (Western Siberia) in 2015–2016

Kartashov M.Yu.<sup>1,2</sup>, Mikryukova T.P.<sup>1</sup>, Moskvitina N.S.<sup>3</sup>, Krivosheina E.I.<sup>1</sup>, Kuznetsov A.I.<sup>1</sup>, Romanenko V.N.<sup>3</sup>, Bol'shakova N.P.<sup>3</sup>, Ternovoi V.A.<sup>1</sup>, Loktev V.B.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology (SRC VB) "Vector"  
Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Novosibirsk State University  
2, Pirogova Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

<sup>3</sup> National Research Tomsk State University (NR TSU)  
36, Lenina Ave., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>4</sup> Federal Research Center (FRC) Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of RAS (SB RAS)  
10, Lavrentyeva Ave., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

### ABSTRACT

**Introduction.** The detection of the first cases of tick-borne human granulocytic anaplasmosis in Russia, discovery of genetic markers for *Anaplasma spp.* in ixodid ticks and reporting of a significant number of cases of tick-borne infections in the southern part of Western Siberia give reason to suppose that causative agents of tick-borne anaplasmosis may be transmitted in Tomsk and its suburbs.

**Objective.** To study the distribution and species biodiversity of *A. phagocytophilum* in ixodid ticks in Tomsk Region.

**Materials and methods.** The analysis of 690 individual ixodid ticks (larvae and adults) was carried out for *Ixodes persulcatus* ( $n = 530$ ) and *Dermacentor reticulatus* ( $n = 160$ ) ticks collected in 2015–2016 on the territory of urban and suburban biotopes of Tomsk. Primary screening of ticks for the presence of genetic material of *A. phagocytophilum* was conducted using two-round PCR with species-specific primers for the 16S rRNA gene. The amplification (1,220 kB) of the *groESL* fragment of the heat shock protein operon was performed for positive isolates with subsequent determination of the nucleotide sequence in the gene fragment for phylogenetic analysis.

**Results.** The number of *A. phagocytophilum* positive samples for *I. persulcatus* (larvae) was  $1.2 \pm 0.6\%$ , *I. persulcatus* (adult) was  $1.8 \pm 0.7\%$ ; and *D. reticulatus* (adult) was  $0.6 \pm 0.3\%$ . Analysis of the nucleotide sequence of the gene fragments in *groESL* operon for nine isolates confirmed that the genetic material of the granulocytic anaplasmosis was detected. Phylogenetic analysis showed that all the isolates belonged to the first group of the "new cluster" of *A. phagocytophilum*.

**Conclusion.** The causative agent of human granulocytic anaplasmosis has been newly detected in *I. persulcatus* ticks collected in urban and suburban biotopes of Tomsk and in *D. reticulatus* from urban foci.

**Key words:** human granulocytic anaplasmosis, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor reticulatus*.

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

**Source of financing.** The study was supported by the Program on enhancing TSU competitiveness and the research, development and technological work “Studying the genetic diversity of tick-borne infections” (AAAA-A17-117060510019-7).

**For citation:** Kartashov M.Yu., Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Krivosheina E.I., Kuznetsov A.I., Romanenko V.N., Bol'shakova N.P., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Detection and genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* in *I. persulcatus* and *D. reticulatus* ticks collected in Tomsk (Western Siberia) in 2015–2016. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 89–98. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-89-98>.

## ВВЕДЕНИЕ

Анаплазмозы – распространенная группа заболеваний человека и животных, вызываемых представителями семейства Anaplasmataceae порядка Rickettsiales. Возбудителем гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) является *Anaplasma phagocytophilum* – облигатная внутриклеточная грамотрицательная бактерия округлой формы диаметром до 1 мкм, обладающая высоким тропизмом к лейкоцитарным гранулоцитам (в основном, нейтрофилам). Возбудитель ГАЧ широко распространен в различных регионах мира, где вызывает заболевание у человека, многих видов домашних и диких животных, а также птиц [1]. Анаплазмоз домашних животных, известный под названием «клещевая лихорадка» (tick-borne fever), приносит существенный экономический ущерб [2, 3]. Специфичными переносчиками этой инфекции являются клещи рода *Ixodes*: *I. scapularis* и *I. pacificus* в США, *I. ricinus* и *I. trianguliceps* в Европе, а также *I. persulcatus* в России и некоторых азиатских странах.

После укуса клеща возбудитель ГАЧ со слюной инфицированного клеща поступает в место укуса, далее проникает в кровь, где размножается внутри нейтрофилов. Основным лигандом, который анаплазмы используют для первичного связывания с клеткой-мишенью, является молекула PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) на мембране клетки [4]. Также описано участие  $\beta_2$ -интегрина и липидных «рафтов» в адгезии анаплазм к нейтрофилам [5]. Взаимодействие возбудителя с нейтрофилом сопровождается высвобождением ряда цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ). Принято считать, что *A. phagocytophilum* индуцирует синтез цитокинов за счет рецепторного сигнала посредством воздействия на toll-like рецептор

TLR-2 [6]. В организме человека цитокины синтезируются раньше, чем появляются первые антитела.

Именно цитокины обуславливают такие клинические проявления ГАЧ, как лихорадка, миалгии, артралгии [7]. Наибольшее значение в патогенезе анаплазмоза отводится IL-8, повышение концентрации которого угнетает продукцию гематопоеза.

Инкубационный период ГАЧ варьирует от 2 сут до 3 нед, составляя в среднем 5–10 сут. Клиника ГАЧ для человека очень разнообразна: от легких, субклинических форм до крайне тяжелых, летальных случаев. Постановку диагноза затрудняет отсутствие специфичных признаков заболевания. Клиническая картина ГАЧ включает недомогание, головные и мышечные боли, лихорадку. Менее чем у половины больных могут наблюдаться тошнота, рвота, анорексия, диарея, боли в брюшной области, боли в суставах, кашель. В большинстве случаев у больных ГАЧ отмечают лейкопению, тромбоцитопению, а также повышенный уровень аминотрансфераз печени и С-реактивного белка в сыворотке крови [8, 9]. Летальные исходы составляют 0,5–1,0%, и они обычно связаны с развитием вторичных инфекций. Дифференцировать ГАЧ необходимо со многими заболеваниями, протекающими с лихорадкой, экзантемами, в том числе с природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями, переносимыми клещами (клещевой энцефалит, иксодовый клещевой боррелиоз, клещевые риккетсиозы, туляремия, бабезиоз, моноцитарный эрлихиоз человека и др.). Специфическая иммунопрофилактика человека в отношении ГАЧ пока не разработана, хотя в ветеринарной практике широко используется вакцина против анаплазмоза крупного рогатого скота, вызываемого *A. marginale*.

Впервые случай ГАЧ у человека был зарегистрирован в США в 1994 г. В России первый случай ГАЧ выявлен в 2000 г. на Дальнем Востоке [10], серологически подтвержденные случаи заболевания отмечены также в Пермской и Новосибирской областях, на Алтае [11]. С 2013 г. введена официальная регистрация ГАЧ в Российской Федерации. За 3 года зарегистрировано 542 случая ГАЧ, причем заболевание часто выявляют у больных с клещевыми инфекциями (обычно в сочетании с клещевым энцефалитом или клещевыми боррелиозами).

Томская область и г. Томск относятся к территории с традиционно высокой заболеваемостью клещевым вирусным энцефалитом и клещевым боррелиозом. Ежегодно в весенне-летние периоды в медицинские учреждения Томской области по поводу укуса иксодовыми клещами обращаются 15–22 тыс. человек. Ранее было показано, что в иксодовых клещах, собранных в этом регионе, обнаруживается генетический материал вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила, а также *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. [12]. Выявление генетических маркеров анаплазмозов в иксодовых клещах, собранных в некоторых районах России, регистрация большого количества случаев нападения клещей на человека, изменение численности и популяционного состава иксодовых клещей в мегаполисах юга Западной Сибири ставят вопрос о возможной циркуляции возбудителей анаплазмоза в г. Томске и его пригородах и необходимости расширения исследований клещевых инфекций в этом регионе.

Цель данного исследования – изучение распространения и видового разнообразия *A. phagocytophilum* в иксодовых клещах на территории Томской области. В работе проведен молекулярно-генетический анализ выявленных изолятов *A. phagocytophilum* на основании сравнения

нуклеотидных последовательностей фрагмента *groESL*-оперона белков теплового шока.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования проведен анализ 690 индивидуальных образцов личинок и имаго иксодовых клещей видов *I. persulcatus* ( $n = 530$ ) и *D. reticulatus* ( $n = 160$ ). Сбор образцов проводился в весенне-летний период 2015–2016 гг. на территории городских и пригородных биотопов г. Томска. Сбор образцов клещей проводили с растительности методом «на флаг», а также с мелких млекопитающих. До начала исследования клещи хранились при  $-70^{\circ}\text{C}$  индивидуально. Исследования проводили с соблюдением правил биобезопасности, регламентированных в МУ 1.3.2569–09, СП 1.3.3118–13, СП 3.1.3310–15. С этой целью клещи были дважды обработаны 70%-м этанолом для инактивации инфекционных агентов и промыты фосфатно-солевым буфером. Гомогенизация клещей осуществлялась с использованием лабораторного гомогенизатора Tissue Lyser (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение нуклеиновых кислот осуществлялось методом фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора («Литех», Россия) согласно инструкции производителя.

Первичный скрининг клещей на наличие генетического материала *A. phagocytophilum* проводили с помощью двухраундовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии родоспецифичных праймеров из области гена *16S рPHK*. У выявленных изолятов осуществлялось амплифицирование фрагмента (около 1 220 пар нуклеотидов) *groESL*-оперона белков теплового шока с помощью двухраундовой ПЦР с использованием пары праймеров HS1-f/HS6-r (1-й раунд) и HS3-f/HSVR (2-й раунд).

Таблица 1  
Table 1

Характеристика олигонуклеотидных праймеров, используемых в работе Characteristics of oligonucleotide primers used				
Ген-мишень Target gene	Название Name	Структура (5'→3') Structure (5'→3')	Т отжига, °C Annealing point, °C	Ссылка Reference
16S рPHK	Ehr1	gaacgaacgctggcggaagc	57	[13]
	Ehr2	agtaycgraccagatagccgc		
	HGE1	cggattattctttatagcttgc	55	
	HGE2	cttaccgaaccgcctacatg		
groESL-operon	HS1-f	cgycagtgggctggtaatgaa	55	[14]
	HS6-r	ccwccwgggtacwacaccttc		
	HS3-f	atagtyatgaaggagagtgtat	55	[15]
	HSVR	tcaacagcagctctagtwg		

Постановка ПЦР проводилась на термоциклере T-100 (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 10 mM трис-HCl (pH = 9,0), 50 mM KCl, 0,1%-й тритон X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM каждого dNTP, по 10 pM каждого праймера, 1,5 ед. активности HS-Taq-полимеразы («Евроген», Россия) и 1-100 нг ДНК-матрицы. При постановке ПЦР использовали следующие температурные режимы: предварительная активация полимеразы – 95 °C в течение 5 мин; 38 циклов: 95 °C – 20 с, T отжига – 20 с, 72 °C – 1 мин; финальная элонгация при 72 °C – 4 мин.

Анализ продуктов амплификации выполняли посредством разделения фрагментов ДНК в 2%-м агарозном геле в трис-боратном буфере, содержащем 0,1% бромид этидия. Очистку продуктов амплификации из агарозного геля проводили с использованием набора на основе микроколонок («Биосилика», Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию Сенгера проводили с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) с каждым из праймеров. Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Определенные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программных продуктов DNA STAR Lasergene v. 7.0 [16], Unipro UGENE v. 1.27 [17] и программы NCBI BLAST v. 2.2.26. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филограммы использовали программу MEGA v. 5.1 [18]. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых фрагментов генома проводили методом объединения ближайших соседей по двухпараметрической модели Кимуры. Показатели статистической надежности узлов филогенетического дерева рассчитаны с помощью бутстреп-анализа с использованием 1 000 случайных реплик. Нуклеотидные последовательности фрагмента *groESL*-оперона депонированы в базе данных GenBank под номерами KF701460-KF701462, KY684729-KY684733 и KY379956.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ПЦР ДНК *A. phagocytophilum* была обнаружена в трех исследованных образцах от 250 личинок клещей *I. persulcatus* в пяти образцах от 280 имаго этого вида клещей. Уровень инфицированности *A. phagocytophilum* таким образом составил у личинок –  $(1,2 \pm 0,6)\%$ ; у по-

ловозрелых особей –  $(1,8 \pm 0,7)\%$ . Генетический материал возбудителя ГАЧ был обнаружен как у самок (три образца), так и у самцов (два образца) *I. persulcatus*. Уровень инфицированности клещей *I. persulcatus* возбудителем ГАЧ соответствуют литературным данным о распространении данного возбудителя в других частях ареала таежного клеща. Так, в Новосибирской области данный показатель составляет в среднем 1,7% и может колебаться в различные эпидсезоны от 0,7 до 2,6% [13]. Полученные результаты дополнительно подтверждают широкое распространение *A. phagocytophilum* в ареале *I. persulcatus* на юге Западной Сибири.

Интересно отметить, что *D. reticulatus* на территории Томской области регистрируется только с 2005 г. [19, 20], а в 2015 г. произошло резкое увеличение численности этого вида клеща в городских биотопах г. Томска. Так, в биотопе Лагерный сад *D. reticulatus* встречался в учетах только в 2012 и 2014 гг., а средняя сезонная численность в этот период составляла всего 0,17 особей на учетный километр. В сентябре 2015 г. численность *D. reticulatus* достигла 45 особей на учетный километр в этом городском биотопе. По этой причине возможное участие *D. reticulatus* в распространении клещевых инфекций непосредственно в городской черте г. Томска ранее не исследовано.

Для выявления генетических маркеров анаплазм нами было исследовано 160 имаго клещей *D. reticulatus* (98 самок и 62 самца), отловленных на территории городского биотопа Лагерный сад. ДНК *A. phagocytophilum* была обнаружена в одной пробе от самки клеща *D. reticulatus*, уровень инфицированности таким образом составил  $(0,6 \pm 0,3)\%$ . Принято считать, что иксодовые клещи способны передавать анаплазмы трансфазово (от личинок к нимфам и от нимф к имаго), но не трансовариально (через яйца новому поколению клещей). Это позволяет предположить, что, во-первых, в 2015 г. произошел занос инфицированных клещей в этот городской парк, а во-вторых, создались условия инфицирования клещей от ранее инфицированных животных в этом биотопе на фоне резкого увеличения численности *D. reticulatus* в городских условиях.

У выявленных изолятов *A. phagocytophilum* было проведено определение нуклеотидных последовательностей фрагмента *groESL*-оперона длиной примерно 1 220 пар нуклеотидов с проведением последующего филогенетического анализа (рис.). Нуклеотидные последовательности изолятов *A. phagocytophilum*, выделенные из клещей *I. persulcatus*, оказались идентичными и были

наиболее близки к последовательностям, полученным из этого вида клещей в Новосибирской области, а также от красной полевки в Омской области. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей составил 99,9% (табл. 2). Нуклеотидная последовательность изолята *A. phagocytophilum*, выделенная из клеща *D. reticulatus*, отличалась

от последовательностей изолятов, полученных из *I. persulcatus*, двумя нуклеотидными заменами. Одна из них является синонимичной, а другая приводит к аминокислотному замещению (ATG (Met) у *A. phagocytophilum* из клещей *I. persulcatus* и ACG (Tpe) у *A. phagocytophilum* из клеща *D. reticulatus*).

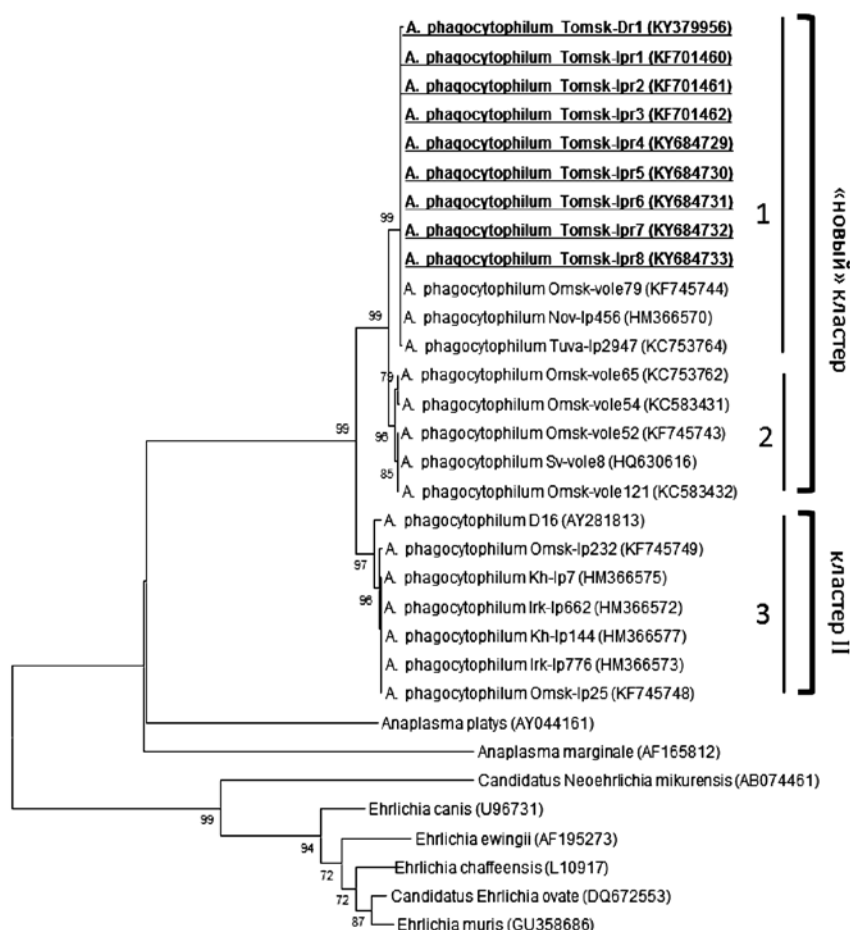


Рисунок. Дендрограмма, построенная на основе выровненных нуклеотидных последовательностей фрагмента *groESL*-оперона (1 200 пар нуклеотидов). Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием двухпараметрической модели Кимуры. Длина линии отражает генетическую дистанцию. Указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1 000 реплик. Для прототипных последовательностей указаны номера GenBank. Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены анализируемые последовательности, полученные в данной работе

Figure. A dendrogram built on the basis of aligned nucleotide sequences of the *groESL* operon fragment (1,200 base pairs). The analysis was carried out using the nearest neighbor method and Kimura's two-parameter model. The length of the line reflects the genetic distance. The indexes of the statistical node support of the nodes are indicated, the bootstrap test is calculated for 1,000 replicas. For prototype sequences, GenBank numbers are indicated. The analyzed sequences obtained in this work are highlighted in bold and underlined

Ранее было описано, что большинство последовательностей *groESL*-оперона *A. phagocytophilum* разделяются на два кластера, к одному из которых относятся последовательности от различных видов клещей и позвоночных хозяев, а ко

второму – только от клещей вида *I. ricinus* и ко-суль [21]. Сравнительно недавно был описан так называемый новый кластер, подразделяющийся на две группы [22]. Выявленные в ходе исследования изоляты входят в группу 1 «нового» кла-



стера, образованную изолятами, выделенными из клещей *I. persulcatus* в Новосибирской области и Республике Тыва, а также от мелких млекопитающих в Омской области.

В табл. 2 приведены данные сравнения уровня гомологии последовательностей *groESL*-оперона для различных известных изолятов *A. phagocytophilum*. Они подтверждают генетическую общность изолятов *A. phagocytophilum*, циркулирующих на юге Западной Сибири. При этом генетические отличия от изолятов, выделенных в других географических районах, весьма существенны и могут достигать 4–5%. Это позволяет предположить,

что генетическая вариабельность *A. phagocytophilum* связана с адаптацией возбудителя к новым климатогеографическим условиям. По всей вероятности, она может привести к изменению биологических свойств возбудителя, в том числе его патогенности для домашних животных и человека. Важно отметить, что при обнаруженном уровне инфицированности иксодовых клещей в Томской области и наличии постоянных укусов населения клещами можно ожидать значительного количества случаев инфицирования людей *A. phagocytophilum* с высокой вероятностью последующего развития заболевания у человека.

Таблица 2

Table 2

Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей <i>groESL</i> -оперона выявленных изолятов <i>A. phagocytophilum</i> в Томской области с известными изолятами				
The degree of homology among nucleotide sequences of <i>groESL</i> -operon in the newly detected isolates of <i>A. phagocytophilum</i> in Tomsk region as opposed to known isolates				
Номер прототипного изолята в GenBank Number of the prototype isolate from GenBank	Источник выделения Source of isolation	Место выделения Region of isolation	Уровень гомологии, % Degree of homology, %	
			Изолят из <i>I. persulcatus</i> Isolate from <i>I. persulcatus</i>	Изолят из <i>D. reticulatus</i> Isolate from <i>D. reticulatus</i>
KF745744	Красная полевка ( <i>Myodesrutilus</i> ) Northern red-backed vole ( <i>Myodesrutilus</i> )	Омская обл. Omsk region	99,9	99,8
HM366570	<i>I. persulcatus</i>	Новосибирская обл. Novosibirsk region	99,9	99,8
KC753764	<i>I. persulcatus</i>	Республика Тыва the Tyva Republic	99,8	99,7
KF745743	Красная полевка ( <i>Myodesrutilus</i> ) Northern red-backed vole ( <i>Myodesrutilus</i> )	Омская обл. Omsk region	98,3	98,1
KC753762	Красно-серая полевка ( <i>Myodesrufocanus</i> ) Grey-sided vole ( <i>Myodesrufocanus</i> )	Омская обл. Omsk region	98,3	98,1
HQ630616	Красная полевка ( <i>Myodesrutilus</i> ) Northern red-backed vole ( <i>Myodesrutilus</i> )	Свердловская обл. Sverdlovsk region	98,3	98,1
KC583432	Красная полевка ( <i>Myodesrutilus</i> ) Northern red-backed vole ( <i>Myodesrutilus</i> )	Омская обл. Omsk region	98,2	98,0
KC583431	Красно-серая полевка ( <i>Myodesrufocanus</i> ) Grey-sided vole ( <i>Myodesrufocanus</i> )	Омская обл. Omsk region	98,1	98,0
HM366575	<i>I. persulcatus</i>	Хабаровский край Khabarovsk Krai	94,8	94,7
KT220194	Полевая мышь ( <i>Apodemusagrarius</i> ) Striped field mouse ( <i>Apodemusagrarius</i> )	Южная Корея South Korea	94,8	94,6

Номер прототипного изолята в GenBank Number of the pro- totype isolate from GenBank	Источник выделения Source of isolation	Место выделения Region of isolation	Уровень гомологии, % Degree of homology, %	
			Изолят из <i>I. persulcatus</i> Isolate from <i>I. persulcatus</i>	Изолят из <i>D. reticulatus</i> Isolate from <i>D. reticulatus</i>
HM366577	<i>I. persulcatus</i>	Хабаровский край Khabarovsk Krai	94,8	94,6
HM366573	<i>I. persulcatus</i>	Иркутская обл. Irkutsk region	94,8	94,6
HM366572	<i>I. persulcatus</i>	Иркутская обл. Irkutsk region	94,8	94,7
KF745749	<i>I. persulcatus</i>	Омская обл. Omsk region	94,8	94,6
KF745748	<i>I. persulcatus</i>	Омская обл. Omsk region	94,8	94,6
AY281813	<i>I. ricinus</i>	Германия Germany	94,8	94,6

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека обнаружен в клещах *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, обитающих на территории Томской области и г. Томска. Полученные данные подтверждают необходимость мониторинга циркуляции возбудителя ГАЧ в природных очагах клещевых инфекций в Томской области, дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции, включая выявление возможных случаев заболевания человека гранулоцитарным анаплазмозом в данном регионе.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Atif F.A. Anaplasma marginale and Anaplasma phagocytophilum: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol. Res.* 2015; 114 (11): 3941–3957. DOI: 10.1007/s00436-015-4698-2.
- Stuen S. Anaplasma phagocytophilum – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet. Res. Commun.* 2007; 31 Suppl. 1: 79–84. DOI: 10.1007/s11259-007-0071-y.
- Grova L., Olesen I., Steinshamn H., Stuen S. Prevalence of Anaplasma phagocytophilum infection and effect on lamb growth. *Acta Vet. Scand.* 2011; 53: 30. DOI: 10.1186/1751-0147-53-30.
- Truchan H.K., Seidman D., Carlyon J.A. Breaking in and grabbing a meal: Anaplasma phagocytophilum cellular invasion, nutrient acquisition, and promising tools for their study. *Microbes Infect.* 2013; 15 (14–15): 1017–1025. DOI: 10.1016/j.micinf.2013.10.010.
- Schaff U.Y., Trott K.A., Chase S., Tam K., Johns J.L. Neutrophils exposed to A. phagocytophilum under shear stress fail to fully activate, polarize, and trans-migrate across inflamed endothelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010; 299 (1): 87–96. DOI: 10.1152/ajpcell.00165.2009.
- Loewenich F.D., Scorpio D.G., Reischl U., Dumler J.S., Bogdan C. Frontline: control of Anaplasma phagocytophilum, an obligate intracellular pathogen, in the absence of inducible nitric oxide synthase, phagocyte NADPH oxidase, tumor necrosis factor, Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4, or TLR adaptor molecule MyD 88. *Eur. J. Immunol.* 2000; 34 (7): 1789–1797.
- Ohashi N., Gaowa W., Kawamori F., Wu D., Yoshikawa Y. Human granulocytic Anaplasmosis, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19 (2): 289–292. DOI: 10.3201/eid1902.120855.
- Brouqui P., Bacellar F., Baranton G. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (12): 1108–1132. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x
- Strle F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 293 Suppl. 37: 27–35. DOI: 10.1016/s1433-1128(04)80006-8.
- Сидельников Ю.Н., Медяников О.Ю., Иванов Л.И., Здановская Н.И. Первый случай гранулоцитарного эрлихиоза на Дальнем Востоке Российской Федерации. *Клин. мед.* 2003; 81 (2): 67–68. [Sidel'nikov Yu.N., Medyannikov O.Yu., Ivanov L.I., Zdanovskaya N.I. The first case of granulocyte erlichiosis in the Far East of the Russian Federation. *Clinical Medicine.* 2003; 81 (2): 67–68 (in Russ.)].
- Леонова Г.Н., Ястребов В.К., Хазова Т.Г., Шерстнева М.Б., Шпынов С.Н., Егорова Н.В., Рудаков И.В., Федянин А.П. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане. *Мед. паразитол.* 2004; 2: 10–14. [Leonova G.N., Yastreb-ov V.K., Khazova T.G., Sherstneva M.B., Shpynov S.N.,

- Egorova N.V., Rudakov I.V., Fedyanin A.P. New data on the detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* in ixodid ticks in Russia and Kazakhstan. *Medical Parasitology*. 2004; 2: 10–14 (in Russ.).
12. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах. *Паразитология*. 2009; 43 (5): 374–388. [Chausov E.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Kononova Yu.V. The genetic diversity of infectious agents, transmitted by ixodid ticks in Tomsk and its suburbs. *Parasitology*. 2009; 43 (5): 374–388 (in Russ.).]
  13. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K. Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2010; 1 (1): 57–65. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2010.01.002.
  14. Sumner J.W., Nicholson W.L., Massung R.F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heatshock operon of *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35 (8): 2087–2092.
  15. Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (3): 1002–1007.
  16. Burland T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* 2000; 132: 71–91. DOI: 10.1385/1-59259-192-2:71.
  17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012; 28 (8): 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
  18. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24 (8): 1596–1599. DOI: 10.1093/molbev/msm092.
  19. Романенко В.Н. Мониторинг видового состава и численности иксодовых клещей (Parasitiformes: Ixodidae) в антропогенных биотопах. *Вестн. Том. гос. ун-та*. 2009; 324: 376–379. [Romanenko V.N. Monitoring of species composition and numbers of ixodid ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in anthropogenic biotopes. *Journal of Tomsk State University*. 2009; 324: 376–379 (in Russ.).]
  20. Панкина Т.М., Романенко В.Н., Истраткина С.В., Шихин А.В., Полторацкая Т.Н. Акарологическая ситуация юга Томской области. *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2013; 4 (24): 67–76. [Pankina T.M., Romanenko V.N., Istratkina S.V., Shikhin A.V., Poltoratskaya T.N. Acarological situation in the south of Tomsk region. *Journal of Tomsk State University*. 2013; 4 (24): 67–76 (in Russ.).]
  21. Rymaszewska A. Divergence within the marker region of the groESL operon in *Anaplasma phagocytophilum*. *Eu. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2008; 27 (11): 1025–1036. DOI: 10.1007/s10096-008-0539-x.
  22. Rar V.A., Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11 (8): 1013–1021. DOI: 10.1089/vbz.2010.0266.

## Вклад авторов

Карташов М.Ю. – разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, интерпретация данных и написание текста статьи. Микрюкова Т.П. – разработка дизайна исследования, интерпретация данных и написание текста статьи. Москвитина Н.С. – написание текста статьи и окончательное утверждение рукописи для публикации. Кривошеина Е.И. – проведение экспериментов и интерпретация данных. Кузнецов А.И. – проведение экспериментов и интерпретация данных. Романенко В.Н. – написание текста статьи и окончательное утверждение рукописи для публикации. Большакова Н.П. – проведение экспериментов и интерпретация данных. Терновой В.А. – анализ и интерпретация данных. Локтев В.Б. – написание текста статьи и окончательное утверждение рукописи для публикации.

## Сведения об авторах

Карташов Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0002-7857-6822.

## Authors contribution

Kartashov M.Yu. – design of the study, carrying out of experiments, interpretation of the data and drafting of the manuscript. Mikryukova T.P. – design of the study, interpretation of the data and drafting of the manuscript. Moskvitina N.S. – drafting of the manuscript and final approval of the manuscript for publication. Krivosheina E.I. – carrying out of experiments and interpretation of the data. Kuznetsov A.I. – carrying out of experiments and interpretation of the data. Romanenko V.N. – drafting of the manuscript and final approval of the manuscript for publication. Bol'shakova N.P. – carrying out of experiments and interpretation of the data. Ternovoi V.A. – analysis and interpretation of the data. Loktev V.B. – drafting of the manuscript and final approval of the manuscript for publication.

## Authors information

Kartashov Mikhail Yu., PhD, Senior Researcher, SRC VB "Vector", Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7857-6822.

**Микрюкова Тамара Петровна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0003-4350-4260.

**Москвитина Нина Сергеевна**, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой зоологии позвоночных, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-3425-7723.

**Кривошеина Екатерина Ильинична**, стажер-исследователь, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0001-5181-0415.

**Кузнецов Александр Иванович**, стажер-исследователь, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0002-4903-0708.

**Романенко Владимир Никифорович**, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой зоологии беспозвоночных, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-6971-4488.

**Большакова Наталия Павловна**, канд. биол. наук, ст. преподаватель, науч. сотрудник, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-7836-3553.

**Терновой Владимир Александрович**, канд. биол. наук, зав. лабораторией, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0003-1275-171X.

**Локтев Валерий Борисович**, д-р биол. наук, профессор, зав. отделом, ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирская обл., р.п. Кольцово. ORCID iD 0000-0002-0229-321X.

(✉) **Карташов Михаил Юрьевич**, e-mail: mikkartash@yandex.ru.

**Mikryukova Tamara P.**, PhD, Senior Researcher, SRC VB “Vector”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4350-4260.

**Moskvitina Nina S.**, DBSc, Professor, Head of the Division, NR TPU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-3425-7723.

**Krivosheina Ekaterina I.**, Graduate Scientist, SRC VB “Vector”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5181-0415.

**Kuznetsov Alexander I.**, Graduate Scientist, SRC VB “Vector”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4903-0708.

**Romanenko Vladimir N.**, DBSc, Professor, Head of the Division, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6971-4488.

**Bolshakova Nataliya P.**, PhD, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7836-3553.

**Ternovoi Vladimir A.**, PhD, Head of Laboratory, DBSc, Professor, Head of the Division, NR TSU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1275-171X.

**Loktev Valery B.**, DBSc, Professor, Head of the Department, SRC VB “Vector”, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0229-321X.

(✉) **Kartashov Mikhail Yu.**, e-mail: mikkartash@yandex.ru.

Поступила в редакцию 04.12.2017  
Подписана в печать 14.12.2018

Received 04.12.2017  
Accepted 14.12.2018

## Роль цАМФ-зависимой сигнальной системы в регуляции электрических и сократительных свойств гладких мышц мочеочника морской свинки при гипоксии

Ковалев И.В.<sup>1</sup>, Бирулина Ю.Г.<sup>1</sup>, Гусакова С.В.<sup>1</sup>, Носарев А.В.<sup>1,2</sup>, Смаглий Л.В.<sup>1</sup>, Петрова И.В.<sup>1</sup>, Рыдченко В.С.<sup>1</sup>, Лещева А.А.<sup>1</sup>, Медведев М.А.<sup>1</sup>, Суханова Г.А.<sup>1</sup>, Васильев В.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2/7

<sup>2</sup> Научный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)  
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 2

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования.** Изучение механизмов регуляции электрической активности и механического напряжения гладкомышечных клеток (ГМК) мочеочника морской свинки, опосредованных циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ), при гипоксии.

**Материалы и методы.** Методом двойного сахарозного моста исследовано действие изопреналина (100 мкМ), форсколина (1 мкМ), 3-изобутил-1-метилксантина (ИБМХ, 100 мкМ), тетраэтиламмония хлорида (ТЭА, 5 мкМ) на электрические свойства и сокращения гладкомышечных полосок мочеочника морской свинки в условиях нормоксии и гипоксии. Гипоксические условия моделировали путем помещения ГМК в гипоксигенированный раствор Кребса, содержащий  $(10,0 \pm 0,2)$  об. % кислорода.

**Результаты.** Увеличение внутриклеточного уровня цАМФ, вызванное стимулятором  $\beta$ -адренорецепторов изопреналином, активацией аденилатциклазы форсколином, неселективным ингибитором фосфодиэстераз ИБМХ, подавляло электрическую и сократительную активность ГМК мочеочника морской свинки. Снижение уровня кислорода в омывающем полоски растворе приводило к увеличению амплитуды потенциала действия и величины сокращения гладких мышц мочеочника. На фоне возрастания внутриклеточного уровня цАМФ активирующее влияние гипоксии на гладкомышечные сегменты снижалось. Угнетение калиевой проводимости мембраны ГМК мочеочника при помощи ТЭА в условиях нормоксии подавляло цАМФ-зависимые процессы, индуцированные форсколином в ГМК, но при гипоксии, наоборот, вызывало потенцирование активирующего влияния на электрическую и сократительную активность гладкомышечных сегментов морской свинки.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении цАМФ-зависимой сигнальной системы в эффекты гипоксии на электрическую и сократительную активность ГМК мочеочника. Модуляция внутриклеточного уровня цАМФ нивелировала активирующее и констрикторное влияние гипоксии на гладкие мышцы мочеочника, вызванное увеличением калиевой проводимости мембраны мышечных клеток, чем способствовала адаптации их к условиям среды.

**Ключевые слова:** гладкие мышцы, циклический аденозинмонофосфат, аденилатциклаза, гипоксия, ионные каналы.

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

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (научные проекты № 16-34-00419 и № 18-315-00296/18).

✉ Ковалев Игорь Викторович, e-mail: kovalew@mail.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 4995 от 27.10.2016).

Для цитирования: Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В., Носарев А.В., Смаглий Л.В., Петрова И.В., Рыдченко В.С., Лещева А.А., Медведев М.А., Суханова Г.А., Васильев В.Н. Роль ЦАМФ-зависимой сигнальной системы в регуляции электрических и сократительных свойств гладких мышц мочеоточника морской свинки при гипоксии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 99–106. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-99-106>.

УДК 591.462.1:591.185.23:591.12.05

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-99-106>

## The role of cAMP-dependent signaling systems in regulation of electrical and contractile properties of smooth muscles of the ureter in hypoxia in guinea pigs

Kovalev I.V.<sup>1</sup>, Birulina J.G.<sup>1</sup>, Gusakova S.V.<sup>1</sup>, Nosarev A.V.<sup>1,2</sup>, Smaglyi L.V.<sup>1</sup>, Petrova I.V.<sup>1</sup>, Rydchenko V.S.<sup>1</sup>, Leshcheva A.A.<sup>1</sup>, Medvedev M.A.<sup>1</sup>, Suhanova G.A.<sup>1</sup>, Vasiliyev V.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University (SSMU)  
2, Moskow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)  
2, Lenina Av., Tomsk, 634028, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim.** To study the features of regulating the electrical activity and mechanical tension of smooth muscle cells (SMCs) of the guinea pig ureter as modulated by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in hypoxia.

**Materials and methods.** The effects of isoprenaline (100  $\mu$ M), forskolin (1  $\mu$ M), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 100  $\mu$ M) and tetraethylammonium chloride (TEA, 5  $\mu$ M) on the contractile and electrical properties of isolated smooth muscle segments of the guinea pig ureter in normoxia and hypoxia were measured by the double sucrose bridge. Hypoxic conditions were created by placing the SMCs in Krebs solution containing (10.0  $\pm$  0.2) vol. % O<sub>2</sub>.

**Results.** It was found that an increase in the intracellular cAMP level caused by isoprenaline, the  $\beta$ -adrenergic receptor agonist, and activation of adenylate cyclase by forskolin, an inhibitor of phosphodiesterase IBMX, caused a decrease in the electrical and constrictor properties of the SMCs in the guinea pig ureter. The decrease in the level of oxygen in the perfusion solution resulted in the increase in the action potential amplitude and contraction of smooth muscles from the ureter. With an increase in the intracellular cAMP level, the activating effect of hypoxia on smooth muscle segments decreased. Inhibition of potassium conductivity of the ureteral SMCs with TEA in normoxia suppressed the cAMP-dependent processes induced by forskolin, whereas in hypoxia it caused the potentiation of an activating effect on the electrical activity and contractions of smooth muscle segments.

**Conclusion.** Thus, the results suggest the involvement of cAMP-dependent signaling system in the influence of hypoxia on the electrical and contractile properties of ureteral SMCs. Modification of the intracellular cAMP level reduced the stimulatory effect of hypoxia on the smooth muscle strips of the ureter caused by increase in the ionic conductivity of the membrane and contributed to their adaptation to environmental conditions.

**Key words:** smooth muscles, cyclic adenosine monophosphate, adenylate cyclase, hypoxia, ion channels.

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

**Source of financing.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) (research projects No. 16-34-00419 and No. 18-315-00296\18).

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the ethics committee at SSMU (Protocol No. 4995 of 27.10.2016).

**For citation:** Kovalev I.V., Birulina J.G., Gusakova S.V., Nosarev A.V., Smagliy L.V., Petrova I.V., Rydchenko V.S., Leshcheva A.A., Medvedev M.A., Suhanova G.A., Vasiliyev V.N. The role of CAMP-dependent signaling systems in regulation of electrical and contractile properties of smooth muscles of the ureter in hypoxia in guinea pigs. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 99–106. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-99-106>.

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из вторичных посредников сигнальной функции в гладкомышечных клетках (ГМК) является циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) [1]. Это обусловлено, во-первых, тем, что цАМФ образуется мембраносвязанным ферментом аденилатциклазой (АЦ), активность которого отражает регуляторное влияние различных лиганд-зависимых процессов на ГМК, а во-вторых, эффекторные системы цАМФ-зависимых протеинкиназ являются функциональными антагонистами кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Известно несколько механизмов реализации эффектов цАМФ в ГМК. С одной стороны, показано участие цАМФ в активации калиевой проводимости мембраны ГМК [2]. С другой стороны, цАМФ-зависимая сигнализация оказывает непосредственное влияние на механизмы регуляции кальциевого гомеостаза в гладких мышцах через влияние на процессы поступления и удаления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в ГМК [3].

Несомненно, представленная система взаимоотношений  $\text{Ca}^{2+}$  и цАМФ является ключевой, но и она не всегда может служить основным критерием оценки последствий влияния лиганд-зависимых отношений на сократительные свойства ГМК, в том числе в условиях патологического процесса [4, 5]. Поскольку нельзя исключить дополнительное вмешательство в процесс сопряжения возбуждения – сокращения ГМК иных внутриклеточных регуляторных каскадов, а также специфичность сигнальной функции в некоторых гладких мышцах. Примером этого могут служить ГМК мочеточника морской свинки, в которых ранее была отмечена особенность оперирования сигнальных путей и установлено усиление сократительных ответов этих гладких мышц в гипоксических условиях [6]. Это не исключает возможность того, что снижение парциального напряжения кислорода в мышечных клетках может вызывать нарушения механизмов трансдукции сигналов, опосредованных циклическими нуклеотидами, что повлечет изменение функции клеток [7].

Цель данной работы – изучение механизмов цАМФ-зависимой регуляции электрической и сократительной активности гладкой мускулатуры мочеточника при гипоксии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлись изолированные гладкомышечные препараты мочеточника морских свинок, которых умерщвляли методом цервикальной дислокации с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Для одновременного раздражения и регистрации электрических и сократительных параметров полосок ГМК использовали метод двойного сахарозного моста. Теоретической основой использования этой методики для исследования ГМК являются кабельные свойства гладкой мышцы. В качестве изолирующего осмолита использовали изотонический 0,3 М раствор сахарозы. Подготовленные гладкомышечные сегменты с удаленной адвентицией закрепляли в камере установки и отмывали физиологическим раствором Кребса (120,4 мМ) в течение 40–45 мин при 37 °С, pH 7,35–7,4 до начала эксперимента. Электрические потенциалы оценивали с помощью неполяризующихся регистрирующих электродов. Сократительную активность гладкомышечных сегментов фиксировали в изометрическом режиме. Полученные сигналы записывали и анализировали с применением программы LGraph2 (А-КАРД, Россия). Во время проведения исследования оценивали значения параметров потенциала действия (ПД) (амплитуда, длительность плато) и амплитуду механического напряжения ГМК при действии деполяризующего стимула и биологически активных веществ в солевом растворе Кребса и его модификациях.

Гипооксигенированные растворы получали путем пропускания через них газообразного азота в течение 10 мин. Уровень кислорода в растворах не превышал ( $10,0 \pm 0,5$ ) об. % и регистрировался



специализированным оксиметром HI 9146-04 (HANNA, Германия).

Исследовали действие следующих реагентов: 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX), изопреналин, тетраэтиламмония хлорид (ТЭА), форсколин (Sigma-Aldrich, США).

Статистическую значимость различий количественных показателей оценивали при помощи *U*-критерия Манна – Уитни и *T*-критерия Вилкоксона в программе IBM SPSS Statistics 21. Результаты представлены в виде медианы, межквартильного интервала *Me* ( $Q_1$ – $Q_3$ ). Различия между выборками считали статистически значимыми на уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для усиления активности аденилатциклазной системы производили воздействие на каскад ферментов, осуществляющих проведение многих внеклеточных регуляторных сигналов, вызываемых различными лиганд-рецепторными физиоло-

гическими влияниями. Известно, что связывание с мембранными адренорецепторами неселективного  $\beta$ -адреномиметика изопреналина приводит к активации АЦ и увеличению концентрации цАМФ внутри клетки [1].

Добавление изопреналина (100 мкМ) в нормоксический раствор Кребса статистически значимо подавляло электрическую и сократительную активность ГМК (табл. 1). Установлено, что в ответ на гипоксию происходило увеличение амплитуды ПД до 103,7 (98,7–111,3)%, длительности плато ПД – 108,4 (90,6–113,1)%, амплитуды сокращения – 123,7 (95,1–130,4)% ( $n = 9$ ,  $p < 0,05$ ) гладкомышечных сегментов мочеточника, соответственно, от контрольных параметров в нормоксическом растворе Кребса. При этом снижение кислорода в омывающем сегменты растворе на фоне действия активатора  $\beta$ -адренорецепторов сопровождалось уменьшением стимулирующего воздействия на величину ПД и сокращения препаратов мочеточника морской свинки.

Таблица 1  
Table 1

Влияние изопреналина электрические и сократительные свойства гладких мышц мочеточника в условиях гипоксии, <i>Me</i> ( $Q_1$ – $Q_3$ )				
The effect of isoprenaline on the electrical and contractile properties of SMCs of the ureter in hypoxia, <i>Me</i> ( $Q_1$ – $Q_3$ )				
Показатель Characteristic		Амплитуда ПД, % AP amplitude, %	Длительность плато ПД, % AP plateau duration, %	Амплитуда сокращения, % Contraction amplitude, %
Контроль, $n = 12$ Control, $n = 12$		100	100	100
+ Изопреналин (100 мкМ), $n = 12$ + Isoprenaline (100 $\mu$ M), $n = 12$		82,28* (71,45–100,85)	85,2* (77,95–101,35)	91,1* (84,8–96,3)
Гипоксия, $n = 9$ Hypoxia, $n = 9$	5 мин 5 min	103,17* (99,5–107,01)	95,77*# (82,15–105,08)	100# (94,23–104,47)
	10 мин 10 min	97,72# (102,18–109,09)	97,6# (89,9–106,14)	97,38# (87,25–102,35)

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, #  $p < 0,05$  по сравнению с гипоксией в отсутствии активатора (здесь и в табл. 2).

\*  $p < 0,05$  as opposed to the control, #  $p < 0,05$  as opposed to hypoxia in the activator-free solution (here and in the table 2).

Непосредственным и достаточно специфическим активатором цАМФ-зависимых процессов в клетке является форсколин, способный прямо стимулировать АЦ [2, 3]. Действие форсколина (1 мкМ) в нормоксическом растворе Кребса вызывало снижение амплитуды и длительности плато ПД, амплитуды сокращения гладкомышечных препаратов мочеточника. При этом на фоне стимуляции АЦ форсколином наблюдался активирующий эффект гипоксии на показатели амплитуды сокращения и параметры ПД, но прирост их был

статистически значимо меньший, чем в отсутствии активатора АЦ (табл. 2).

Ранее было показано, что на фоне блокирования калиевых каналов неселективным блокатором ТЭА (5 мМ) происходит усиление активирующего и констрикторного действия гипоксии на ГМК мочеточника морской свинки [8]. Поэтому для того, чтобы исключить влияние калиевой проводимости мембраны ГМК мочеточника на цАМФ-опосредованные эффекты гипоксии, гладкомышечные сегменты подвергали действию ТЭА.

Таблица 2

Table 2

Влияние форсколина на электрические параметры и механическое напряжение гладких мышц мочеточника при гипоксии, $Me (Q_1-Q_3)$				
The effect of forskolin on the electrical parameters and mechanical tension of the smooth muscle strips of the ureter in hypoxia, $Me (Q_1-Q_3)$				
Показатель Characteristic		Амплитуда ПД, % AP amplitude, %	Длительность плато ПД, % AP plateau duration, %	Амплитуда сокращения, % Contraction amplitude, %
Контроль, $n = 8$ Control, $n = 8$		100	100	100
+ Форсколин (1 мкМ), $n = 8$ + Forskolin (1 $\mu$ M), $n = 8$		92,5* (80,56–103,7)	83,24* (62,4–90,7)	76,84* (66,5–87,2)
Гипоксия, $n = 8$ Hypoxia, $n = 8$	5 мин 5 min	96,02# (90,63–103,72)	94,78*# (79,9–111,63)	86,73*# (74,43–96,67)
	10 мин 10 min	95,7*# (83,1–111,8)	92,7# (85,5–114,6)	89,57*# (79,49–98,56)

При угнетении калиевой проводимости мембраны ГМК мочеточника морской свинки и подавлении калий-зависимого влияния форсколина на параметры электрической и сократительной активности гладкомышечных сегментов наблюдалось дополнительное активирующее действие гипоксии (рис. 1).

Неселективный ингибитор фосфодиэстераз IBMX, как известно, вызывает увеличение концентрации циклических нуклеотидов в ГМК [9, 10]. При добавлении IBMX (100 мкМ) в нормоксический раствор Кребса наблюдалось угнете-

ние электрических и сократительных параметров гладкомышечных препаратов мочеточника: амплитуда сокращения составила 78,12 (62,5–96,55)%, амплитуда ПД – 84,32 (70,2–98,31)%, длительность плато ПД – 79,91 (66,35–96,47)% ( $n = 12$ ,  $p < 0,05$ ), что соответствует контролю в нормоксическом растворе Кребса. В условиях гипоксии IBMX также сохранял свой угнетающий эффект на параметры ПД и амплитуду сокращения ГМК мочеточника, однако он был статистически значимо меньшим, чем в нормоксическом растворе (рис. 2).

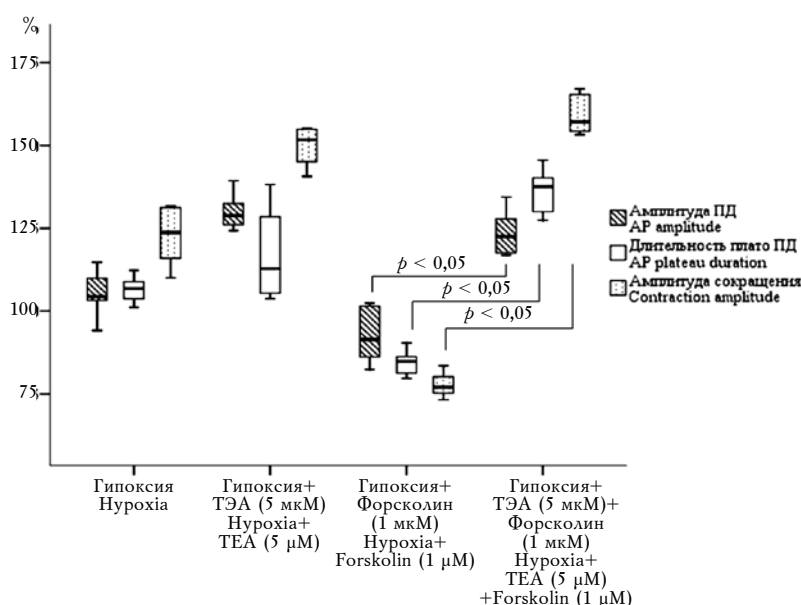


Рис. 1. Модуляция параметров электрической и сократительной активности гладких мышц мочеточника морской свинки при действии тетраэтиламмония (ТЭА) и форсколина в условиях гипоксии:  $p$  – уровень значимости различий по сравнению с параметрами в группе «Гипоксия + форсколин (1 мкМ)»

Fig. 1. Modulation of parameters of the electrical and contractile activity of smooth muscles of the guinea pig ureter under the effect of tetraethylammonium (TEA) and forskolin in hypoxia:  $p$  – statistical significance as opposed to the parameters in the group “Hypoxia + Forskolin (1  $\mu$ M)”

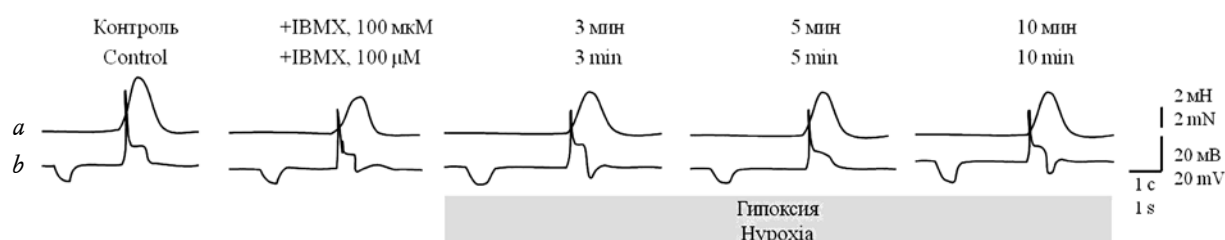


Рис. 2. Воздействие IBMX на потенциал действия (a) и механическое напряжение (b) изолированных сегментов мочеточника морской свинки в условиях гипоксии: справа – калибровочный сигнал и отметка времени

Fig. 2. The influence of IBMX on the action potential (a) and mechanical tension (b) of the isolated segments of the guinea pig ureter in hypoxia: right arrow key – calibration signal and time stamp

Таким образом, угнетение активности фосфо-диэстераз циклических нуклеотидов статистически достоверно подавляет активирующее воздействие гипоксии на показатели сократительной и электрической активности сегментов мочеточника морской свинки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование молекулярных механизмов регуляции сопряжения возбуждения-сокращения в гладких мышцах в физиологических и патологических условиях является основой для формирования представления о работе ГМК и, следовательно, двигательной функции висцеральных органов. В настоящем исследовании проводилось изучение роли цАМФ-зависимой сигнальной системы в регуляции электрических и сократительных свойств ГМК мочеточника при гипоксии.

Полученные результаты свидетельствуют, что активация аденилатциклазной системы посредством  $\beta$ -адреномиметика, форсколина, IBMX с последующим увеличением внутриклеточного содержания цАМФ приводят к подавлению активирующего действия гипоксии на параметры электрической и, в большей степени, констрикторной активности ГМК мочеточника морской свинки. Согласно литературным данным, активация цАМФ-зависимого сигнального пути, с одной стороны, связана с повышением калиевой проводимости мембраны гладких мышц [2], а с другой – уменьшением цитоплазматической концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  вследствие активации кальциевых насосов плазмалеммы, саркоплазматического ретикула и (или) натрий-кальциевого обмена в ГМК [3, 11].

На фоне подавления калиевой проводимости мембраны ГМК, как одной из ключевых эффекторных мишеней цАМФ-зависимого сигнального пути, неселективным блокаторм ТЭА активирующее действие гипоксии не только сохранялось, но и статистически достоверно увеличивалось.

По-видимому, в условиях гипоксии дополнительное угнетение калиевых каналов приводит к инвертированию цАМФ-зависимых процессов [8]. Наличие подобных изменений может быть также обусловлено и включением дополнительных механизмов регуляции сопряжения возбуждения-сокращения в гладких мышцах, направленных на деполяризацию мембраны ГМК мочеточника морской свинки и поддержание констрикции, вероятно, опосредованных изменением хлорной проводимости мембраны ГМК мочеточника [12].

Наблюдаемые изменения в функционировании цАМФ-зависимой сигнальной системы в условиях гипоксии могут лежать в основе более тонких адаптивных реакций клеток на изменение их оксигенации, затрагивающих процессы транскрипции генов и регуляции ответных реакций клеток на кислородное голодание [13, 14].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты влияния гипоксии на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника при модуляции уровня цАМФ позволяют предположить наличие неоднозначной зависимости активности сигнальных систем от парциального давления кислорода. Повышение внутриклеточного уровня цАМФ оказывает релаксирующее и реполяризующее действие на гладкомышечные сегменты, сменяющееся при гипоксии на констрикторное и активирующее, вероятно, за счет подавления калиевой проводимости мембраны.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Webb J.G., Yates P.W., Yang Q., Mukhin Y.V., Lanier S.M. Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281 (4): H1545– H1552. DOI: 10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1545.
2. Nelson C.P., Rainbow R.D., Brignell J.L., Perry M.D., Willets J.M., Davies N.W., Standen N.B., Challiss R.A. Prin-

- cial role of adenylyl cyclase 6 in  $K^+$  channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 2011; 91 (4): 694–702. DOI: 10.1093/cvr/cvr137.
3. Thorne K.S., Nelson M.T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005; 83 (3): 215–242. DOI: 10.1139/y05-016.
  4. Barman S.A., Zhu S., White R.E. Hypoxia modulates cyclic AMP activation of BKCa channels in rat pulmonary arterial smooth muscle. *Lung.* 2005; 183 (5): 353–361. DOI: 10.1007/s00408-005-2547-2.
  5. Almohanna A.M., Wray S. Hypoxic conditioning in blood vessels and smooth muscle tissues: effects on function, mechanisms, and unknowns. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2018; 315 (4): H756–H770. DOI: 10.1152/ajpheart.00725.2017.
  6. Ковалев И.В., Попов А.Г., Баскаков М.Б., Миноченко И.А., Килин А.А., Бородин Ю.А., Анфиногенова Я.Д., Капилевич Л.В., Медведев М.А. Влияние ингибиторов фосфодиэстераз циклических нуклеотидов на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2002; 133 (1): 47–50. [Kovalev I.V., Popov A.G., Baskakov M.B., Minochenko I.A., Kilin A.A., Borodin Yu.A., Anfinogenova Ya.D., Kapilevich L.V., Medvedev M.A. Effect of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases on the electrical and contractile activity of smooth muscle cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2002; 133 (1): 47–50 (in Russ.)]. DOI: 10.1023/A:1015196125469.
  7. Chan C.K., Vanhoutte P.M. Hypoxia, vascular smooth muscles and endothelium. *Acta Pharmacol. Sin. B.* 2013; 3 (1): 1–7. DOI: 10.1016/j.apsb.2012.12.007.
  8. Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Петрова И.В., Носарев А.В., Медведев М.А., Орлов С.Н. Влияние гипоксии на электрические и сократительные свойства гладких мышц мочеочника морской свинки. *Бюллетень сибирской медицины.* 2016; 15 (3): 48–54. [Kovalev I.V., Birulina Y.G., Gusakova S.V., Smaglyi L.V., Nosarev A.V., Petrova I.V., Medvedev M.A., Orlov S.N. The effect of hypoxia on electrical and contractile properties of smooth muscles of the guinea pig ureter. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016; 15 (3): 48–54 (in Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-48-54.
  9. Hasan A.U., Kittikulsuth W., Yamaguchi F., Musarrat Ansary T., Rahman A., Shibayama Y., Nakano D., Hitomi H. Tokuda M., Nishiyama A. IBMX protects human proximal tubular epithelial cells from hypoxic stress through suppressing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression. *Exp. Cell. Res.* 2017; 358 (2): 343–351. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.07.007.
  10. Rybalkin S.D., Yan C., Bornfeldt K.E., Beavo J.A. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ. Res.* 2003; 93 (4): 280–291. DOI: 10.1161/01.RES.0000087541.15600.2B.
  11. Nunes A.R., Batuca J.R., Monteiro E.C. Acute hypoxia modifies cAMP levels induced by inhibitors of phosphodiesterase-4 in rat carotid bodies, carotid arteries and superior cervical ganglia. *Br. J. Pharmacol.* 2010; 159 (2): 353–361. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00534.x.
  12. Robert R., Norez C., Becq F. Disruption of CFTR chloride channel alters mechanical properties and cAMP-dependent  $Cl^-$  transport of mouse aortic smooth muscle cells. *J. Physiol.* 2005; 568 (Pt 2): 483–495. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.085019.
  13. Sands W.A., Palmer T.M. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal.* 2008; 20 (3): 460–466. DOI: 10.1016/j.cellsig.2007.10.005.
  14. Cavadas M.A.S., Cheong A., Taylor C.T. The regulation of transcriptional repression in hypoxia. *Exp. Cell. Res.* 2017; 356 (2): 173–181. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.02.024.

## Вклад авторов

Ковалев И.В., Гусакова С.В., Медведев М.А., Суханова Г.А., Васильев В.Н. – проверка интеллектуального содержания, утверждение рукописи для публикации. Бирулина Ю.Г. – интерпретация и анализ данных, написание рукописи. Носарев А.В. – разработка концепции и дизайна, обоснование рукописи. Смаглий Л.В., Петрова И.В. – обоснование и написание рукописи. Рыдченко В.С., Лещева А.А. – выполнение экспериментальной части исследования, анализ данных.

## Authors contribution

Kovalev I.V., Gusakova S.V., Medvedev M.A., Suhanova G.A., Vasiliyev V.N. – revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Birulina Yu.G. – analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript. Nosarev A.V. – conception and design, justification of the manuscript. Smaglyi L.V., Petrova I.V. – justification and drafting of the manuscript. Rydchenko V.S., Leshcheva A.A. – carrying out of the experiments, analysis of the data.

## Сведения об авторах

Ковалев Игорь Викторович, д-р мед. наук, профессор, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9269-0170.

## Authors information

Kovalev Igor V., DM, Professor, Division of Biophysics and Functional Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9269-0170.

**Бирulina Юлия Георгиевна**, канд. биол. наук, ассистент, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1237-9786.

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

**Носарев Алексей Валерьевич**, д-р мед. наук, профессор, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ; профессор, Инженерная школа ядерных технологий, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-0119-9707.

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

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

**Рыдченко Виктория Сергеевна**, ассистент, кафедра биофизики и функциональной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-0635-6548.

**Лещева Анастасия Александровна**, студент, медико-биологический факультет, СибГМУ, г. Томск.

**Медведев Михаил Андреевич**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой нормальной физиологии, СибГМУ, г. Томск.

**Суханова Галина Алексеевна**, д-р биол. наук, профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

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

(✉) **Ковалев Игорь Викторович**, e-mail: kovalew@mail.ru.

**Birulina Julia G.**, PhD, Assistant, Division of Biophysics and Functional Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1237-9786.

**Gusakova Svetlana V.**, DM, Head of the Division of Biophysics and Functional Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5047-8668. ORCID iD 0000-0001-5047-8668.

**Nosarev Alexey V.**, DM, Professor, Division of Biophysics and Functional Diagnostics, SSMU; Professor, School of Nuclear Technology, TPU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0119-9707.

**Smagliy Lyudmila V.**, PhD, Associate Professor, Division of Biophysics and Functional Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-5263-027.

**Petrova Irina V.**, DBSc, Professor, Division of Biophysics and Functional Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9034-4226.

**Rydchenko Viktoriya S.**, Assistant, Division of Biophysics and Functional Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0635-6548.

**Leshcheva Anastasia A.**, Student, Medical Biological Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Medvedev Michail A.**, DM, Professor, Head of the Department Normal Physiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Suhanova Galina A.**, DBSc, Professor, Department of Biochemistry, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Vasiliyev Vladimir N.**, DBSc, Professor, Department of Physical Culture and Health, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Kovalev Igor V.**, e-mail: kovalew@mail.ru.

Received 20.11.2018

Accepted 14.12.2018

Поступила в редакцию 20.11.2018

Подписана в печать 14.12.2018

## Нейрокогнитивный дефицит в клиническом полиморфизме шизофрении: типология, выраженность и синдромальные перекрытия

Корнетов А.Н.<sup>1</sup>, Корнетова Е.Г.<sup>1,2</sup>, Голенкова А.В.<sup>1</sup>, Козлова С.М.<sup>2</sup>, Аржаник М.Б.<sup>1</sup>, Самойленко Ж.А.<sup>1</sup>, Бойко А.С.<sup>2</sup>, Семке А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)  
Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт (НИИ) психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук  
Россия, 634014, Томск, ул. Алеутская, 4

### РЕЗЮМЕ

**Цель:** выявление типологии, выраженности и перекрытия с позитивной и (или) негативной симптоматикой нейрокогнитивных нарушений у пациентов с шизофренией.

**Материалы и методы.** Обследованы 50 пациентов с диагнозом «шизофрения» по ICD-10 в возрасте 22–55 лет (25 женщин (50%) и 25 мужчин (50%)). Средний возраст составил  $(38,0 \pm 4,8)$  лет, средний возраст манифестации –  $(23 \pm 3,2)$  года, средняя длительность заболевания –  $(15 \pm 3,7)$  лет. Пациенты обследованы с помощью батареи тестов для количественной оценки когнитивных функций: тест на зрительно-моторную координацию; тест Струпа; тест беглости речевых ответов; тест Бентона; заучивание 10 слов; субтест «Шифровка»; субтест «Лабиринты». Оценка когнитивного дефицита проводилась с применением z-шкал. Для выяснения связи нейрокогнитивных нарушений с другими проявлениями клинической картины шизофрении использовалась Шкала позитивных и негативных синдромов. В контрольную группу по показателям когнитивной сферы включены 50 условно здоровых испытуемых из числа добровольцев. Статистическая обработка проводилась с применением непараметрического U-критерия Манна – Уитни, кластерного анализа методом К-средних, H-критерия Краскала – Уоллиса.

**Результаты.** Пациенты с шизофренией и здоровые лица имели значимые различия по тесту Струпа (вторая часть), тесту беглости речевых ответов (обе части), среднему баллу теста Бентона, тесту на заучивание 10 слов (за пять предъявлений), шифровке и лабиринтам с уровнем  $p < 0,05$ ; по тесту на зрительно-моторную координацию (модификация «В») при  $p < 0,01$ . Получен когнитивный профиль выборки, который сопоставлен с показателями PANSS. Обнаружено значимое преобладание выраженности симптоматики по всем ее шкалам при нарушениях внимания, зрительной памяти, исполнительской функции и ориентации и (или) координации по сравнению с остальными проявлениями когнитивного дефицита ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Нейрокогнитивный дефицит образует синдромальные перекрытия с позитивными и негативными синдромами шизофрении, а наличие нарушения внимания, зрительной памяти, исполнительской функции и ориентации и (или) координации ассоциировано с тяжестью шизофрении в целом.

**Ключевые слова:** шизофрения, психоз, нейрокогнитивный дефицит, клинический полиморфизм, позитивные симптомы, негативные симптомы.

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

---

✉ Корнетов Александр Николаевич, [alkornetov@gmail.com](mailto:alkornetov@gmail.com).



**Источник финансирования.** Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 18-315-20019 «Новые подходы к генетике клинического полиморфизма и нейрокогнитивного дефицита при шизофрении».

**Соответствие принципам этики.** Все лица, входившие в основную и контрольную группы, дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ РАН (протокол № 99 от 17.04.2017, дело № 99/1.2017).

**Для цитирования:** Корнетов А.Н., Корнетова Е.Г., Голенкова А.В., Козлова С.М., Аржаник М.Б., Самойленко Ж.А., Бойко А.С., Семке А.В. Нейрокогнитивный дефицит в клиническом полиморфизме шизофрении: типология, выраженность и синдромальные перекрытия. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 107–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-107-118>.

УДК 616.895.8-008-071

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-107-118>

## Neurocognitive deficits in clinical polymorphism of schizophrenia: typology, expression and syndromal overlaps

Kornetov A.N.<sup>1</sup>, Kornetova E.G.<sup>1,2</sup>, Golenkova A.V.<sup>1</sup>, Kozlova S.M.<sup>2</sup>, Arzhanik M.B.<sup>1</sup>, Samoylenko Zh.A.<sup>1</sup>, Boiko A.S.<sup>2</sup>, Semke A.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University (SSMU)

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

### ABSTRACT

**Objective.** The authors tried to identify the typology, severity and overlap of neurocognitive deficits with positive/negative symptoms in patients with schizophrenia.

**Materials and methods.** Fifty patients aged 22–55 years (25 women (50%) and 25 men (50%)) with schizophrenia diagnosed according to ICD-10 were examined. The average age was  $38.0 \pm 4.8$  years, the average age of onset was  $23 \pm 3.2$  years, the average disease duration was  $15 \pm 3.7$  years. The patients were examined using battery tests to quantify their cognitive functions: Trail Making Test A&B; Stroop Color Word Interference Test; Verbal Fluency; Benton Visual Retention Test; 10 words learning; WAIS Digit Symbol Test; and WAIS Trail Making Test. The evaluation of cognitive deficits was carried out using z-scales. Association of neurocognitive deficits with other schizophrenia symptoms was also estimated using PANSS. The control group that was formed on the basis of the cognitive sphere parameters included 50 healthy volunteers. Statistical processing was carried out using the Mann-Whitney U test, k-means clustering, and the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance.

**Results.** The patients with schizophrenia and healthy individuals had significant differences in the second part of the Stroop Color Word Interference Test, both parts of the Verbal Fluency, average score of Benton Visual Retention Test, 10 words learning based on 5 reiterations, WAIS Digit Symbol Test and WAIS Trail Making Test with  $p < 0.05$ ; in the Trail Making Test B with  $p < 0.01$ . The cognitive sampling profile was determined and compared with the PANSS scores. The significant predominance ( $p < 0.05$ ) of the symptoms across all scales was found with impaired attention, visual memory, performance function, and/or orientation/coordination, as opposed to the other manifestations of cognitive deficits.

**Conclusion.** Neurocognitive deficits form syndromal overlaps with positive and negative schizophrenia syndromes, and the presence of attention, visual memory, performance and orientation / coordination disturbances is associated with the severity of schizophrenia in general.

**Key words:** schizophrenia, psychosis, neurocognitive deficits, clinical polymorphism, positive symptoms, negative symptoms.



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

**Source of financing.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant 18-315-20019 “New approaches to genetics of clinical polymorphism and neurocognitive deficits in schizophrenia”.

**Conformity with the principles of ethics.** All individuals that were included in the two groups gave informed consent for taking part in the study. The study was approved by the ethics committee at Mental Health Research Institute, TNRMC RAS (Protocol No. 99 of 17.04.2017, case No. 99/1.2017).

**For citation:** Kornetov A.N., Kornetova E.G., Golenkova A.V., Kozlova S.M., Arzhanik M.B., Samoylenko Zh.A., Boiko A.S., Semke A.V. Neurocognitive deficits in clinical polymorphism of schizophrenia: typology, expression and syndromal overlaps. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 107–118. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-107-118>.

## ВВЕДЕНИЕ

Первое систематизированное описание раннего слабоумия Е. Краепелин [1] включало в себя несколько клинически разнообразных форм, объединяющихся постепенной психической деградацией по мере течения болезни, уже в молодом возрасте. В современной терминологии психическая деградация при раннем слабоумии рассматривается как нейрокогнитивный дефицит при шизофрении, в основе которого лежат нарушения памяти и внимания, что подтверждается данными экспериментальных исследований [2, 3], а также следует из мета-анализов [4–6], аналитических [7, 8] и нарративных [9, 10] обзоров специальной литературы. Вместе с тем нейрокогнитивный дефицит не является специфическим клиническим проявлением шизофрении [11, 12] и встречается в том числе в соматической медицине [13], то есть его наличие при отсутствии патогномичных симптомов [14, 15] хотя бы в анамнезе не может быть основанием для ее диагностики. Поэтому любые нарушения памяти и внимания не являются основными критериями диагностики шизофрении в действующих пересмотрах двух главных систематик [16, 17]. Тем не менее в настоящее время все чаще ставится вопрос о включении когнитивного дефицита в отдельный домен для диагностики шизофрении наряду с общепринятыми позитивным и негативным [18].

Когнитивный дефицит среди лиц с шизофренией, по разным оценкам, составляет приблизительно 1,5–3 стандартных отклонения ниже нормы [19]. Однако в отличие от предположения Е. Краепелин [1] этот дефицит довольно стабилен, и нет никаких свидетельств прогрессивного нейрокогнитивного снижения после первого эпизода болезни [20, 21]. Проявления нейрокогнитивного дефицита часто можно обнаружить еще в инициальный период наряду с другими специфиче-

скими для шизофрении изменениями, например редукцией энергетического потенциала. Также существует мнение, что ухудшение нейрокогнитивного функционирования может выступать в качестве фактора риска данного расстройства, особенно проявляющегося негативным симптомокомплексом и (или) дезорганизацией, а также более тяжелого течения [22, 23]. С середины 1990-х гг. в ряде исследований [24–26] появились предположения, что выраженный нейрокогнитивный дефицит в сочетании с социальным когнитивным дефицитом, иногда не проявляющимся заметно [27], ухудшают течение расстройства и снижают эффективность терапии. Соответственно планирование лечебных вмешательств должно учитывать когнитивный компонент в клинической картине [28] как в медикаментозной терапии [29], так и в немедикаментозной, включая прежде всего когнитивную ремедиацию [30, 31].

В настоящее время нейрокогнитивный дефицит при шизофрении рассматривается как одно из ключевых нарушений, которое в значительной степени ухудшает возможности социального функционирования и реабилитационный потенциал пациентов [32, 33]. Когнитивные нарушения встречаются у 75–84% больных шизофренией [19]. Нейрокогнитивный дефицит появляется уже на ранних стадиях заболевания и сохраняется в ремиссии. Чаще всего он манифестирует ухудшениями внимания и восприятия, разных видов памяти (рабочей, вербальной, автобиографической), мышления или исполнительских функций и проблемно-решающего поведения. Наиболее выраженными и частыми признают нарушения вербальной и пространственной памяти, слухового и зрительного гнозиса, недостаток устойчивости и избирательности внимания, сниженный контроль мыслительной деятельности, ее организации [34, 35].

Цель исследования – выявление типологии, выраженности и перекрытия с позитивной и (или) негативной симптоматикой нейрокогнитивных нарушений у пациентов с шизофренией.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие пациенты с диагнозом «шизофрения» в возрасте 22–55 лет, находившиеся на лечении в клиниках Научно-исследовательского института психического здоровья, Томский НИМЦ РАН. Исследование осуществлено с учетом этических стандартов, разработанных в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266.

Всего были обследованы 50 человек, из них 25 женщин (50%) и 25 мужчин (50%). Средний возраст составил  $(38,0 \pm 4,8)$  лет. Средний возраст манифестации шизофренического процесса –  $(23 \pm 3,2)$  года. Средняя длительность заболевания –  $(15 \pm 3,7)$  лет. Указанный возрастной промежуток для обследованных лиц является допустимым в пределах одной выборки по оценке когнитивной сферы. Диагностика проводилась по исследовательским диагностическим критериям (DCR-10) классификации психических и поведенческих расстройств ICD-10 [36]. Пациенты распределились по четырем подтипам: параноидная шизофрения – 33 человека (66%), недифференцированная шизофрения – 1 (2%), резидуальная шизофрения – 5 (10%), простая шизофрения – 11 (22%). Уровень образования пациентов оказался следующим: высшее – 16 человек (32%), неполное высшее – 6 (12%), среднее специальное – 17 (34%), среднее – 11 (22%). В процессе течения болезни у ряда пациентов отмечено социально-трудовое снижение, что оказало влияние на их социальный и профессиональный статус: инвалидов по психическому заболеванию на момент обследования было 34 (68%), безработных – 5 (10%), работников бюджетной сферы – 6 (12%), промышленных работников – 3 (6%), студентов – 1 (2%), предпринимателей – 1 (2%). Среди пациентов исследуемой выборки большинство не состояли в браке – 35 человек (70%), состояли – 10 (20%), были разведены 2 (4%), в гражданском браке – 1 (2%), вдовых – 2 человека (4%). У 15 больных (30%) расстройство отягощено наследственностью по шизофрении. Все пациенты получали антипсихо-

тические препараты в стандартных терапевтических дозировках.

Пациенты обследованы с помощью батареи адаптированных русских версий тестов для количественной оценки когнитивных функций [37]: тест на зрительно-моторную координацию для оценки внимания, пространственной ориентации и моторной координации – часть А, рабочей памяти и исполнительской функции – часть Б (Trail Making Test A&B) [38]; тест Струпа (Stroop Color Word Interference Test) для оценки рабочей памяти и избирательного внимания [39]; тест беглости речевых ответов (Verbal Fluency) для оценки вербальной ассоциативной продуктивности и нарушений лексической системы [40]; тест Бентона (Benton Visual Retention Test) для оценки зрительной памяти [41]; тест на заучивание 10 слов для оценки состояния памяти испытуемых, утомляемости, активности внимания [42]; субтест «Шифровка» для оценки внимания и рабочей памяти [43]; субтест «Лабиринты» для оценки исполнительских функций [43].

Оценка когнитивного дефицита у больных проводилась с применением z-шкал. Значения z-шкал были получены на основе имеющихся нормативных показателей как разность показателя больного с нормативным средним, отнесенным к нормативному стандартному отклонению

$$z = \frac{x - \bar{X}}{S_x},$$

где  $x$  – показатель больного,  $\bar{X}$  – нормативное среднее значение,  $S_x$  – стандартное отклонение. Значения вычислялись индивидуально для каждого больного. В результате оценка проводилась с учетом следующего правила: чем меньше z-значения, тем больше дефицит. Бездефицитарным (нормой) принято считать диапазон  $-1 \leq z \leq 1$  ( $\pm 1$  стандартное отклонение),  $-2 \leq z \leq -1$  – умеренный дефицит (на 1–2 стандартных отклонения),  $z < -2$  – выраженный дефицит (более 2 стандартных отклонений). Затем высчитывалось среднее значение для всех испытуемых по сумме баллов в каждой пробе. Идентичная процедура проводилась с контрольной группой. В относительных величинах оценка когнитивного дефицита проводилась на основе степени (%) отклонения показателей обследуемого от нижнего порога нормы: отклонение от нормы до 30% – легкие когнитивные нарушения, 30–60% – умеренные, более 60% – выраженные нарушения.

Для выяснения связи нейрокогнитивных нарушений с другими проявлениями клинической картины расстройства использовалась Шкала по-

зитивных и негативных синдромов (Positive and Negative Syndrome Scale – PANSS) [44] в адаптированной русской версии SCI-PANSS [37].

В контрольную группу включены 50 условно здоровых испытуемых из числа добровольцев, никогда не обращавшихся за помощью в службы психического здоровья, включая специализированные психиатрические, не предъявлявших жалоб на психическое здоровье, не имевших психиатрического анамнеза и адаптированных профессионально, семейно и социально. Лица, включенные в контрольную группу, в целом совпадали по своим социально-демографическим характеристикам (пол, возраст, образование) с основной выборкой, не имея значимых статистических различий. С учетом того, что шизофрения, будучи хроническим, прогрессивным психическим расстройством, во многих случаях приводящим к ухудшению адаптационных возможностей и, соответственно, социальному и трудовому снижению [45], сравнение основной и контрольной группы по уровням социального и профессионального статусов не проводилось.

Основная и контрольная группы сравнивались по средним показателям тестов. Для подтверждения различий между контрольной и опытной группами был применен непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни. Для выделения вариантов когнитивного дефицита (особенностей нейрокогнитивного дефицита) был применен кластерный

анализ методом *K*-средних. Для установления различий между выделенными вариантами нейрокогнитивного дефицита использовался *H*-критерий Краскела – Уоллиса ANOVA с процедурой множественных сравнений. С помощью *H*-критерия сравнивались средние показатели по нейропсихологическим пробам, а также результаты, полученные по PANSS. Статистическая обработка материала осуществлялась с помощью пакета компьютерных программ Statistica for Windows 9.0. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения  $M \pm m$ ; медианы и интерквартильного диапазона  $Me (Q_1; Q_3)$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные прошли проверку на тип распределения с помощью критериев Колмогорова – Смирнова (с поправкой Лиллиефорса) и критерия Шапиро – Уилка. В результате проверки было выявлено, что данные не соответствуют закону нормального распределения.

При сравнительном анализе когнитивных функций пациентов, составляющих основную группу, с контрольной группой здоровых лиц, с помощью *U*-критерия Манна – Уитни статистически значимые отличия выявлены в средних суммарных баллах по нейропсихологическим тестам, свидетельствующие, что в основной выборке по большинству использованных методик отмечены когнитивные нарушения (табл. 1).

Таблица 1  
Table 1

Сравнение показателей когнитивных тестов у представителей основной и контрольной групп, $Me (Q_1; Q_3)$ Comparison of indicators of cognitive tests in patients and control group subjects, $Me (Q_1; Q_3)$			
Тест Test	Оцениваемый показатель Assessed indicator	Основная группа, $n = 53$ Treatment group, $n = 53$	Контрольная группа, $n = 50$ Control group, $n = 50$
Тест на зрительно-моторную координацию Trail Making Test A&B	Среднее время, затраченное на выполнение модификации «А», с Average time spend on performing “A” modification, sec	43,5 (39; 60)	35,0 (32,0; 39,0)
	Среднее время, затраченное на выполнение модификации «В», с Average time spend on performing “B” modification, sec	144,0 (132,0; 155,0)*	54,0 (51,0; 58,0)
Тест Струпа Stroop Color Word Interference Test	Среднее время выполнения первой части теста, с Average time spent on completing the first part of the test, sec	28,5 (23,5; 30,3)	23,0 (20,0; 27,8)
	Среднее время выполнения второй части теста, с Average time spent on completing the second part of the test, sec	89,0 (65,5; 120,5)*	54,0 (55,0; 58,0)
Тест беглости речевых ответов Verbal Fluency	Среднее количество слов, названных в категорийной части Average number of words said in the categorical part	27,0 (24,0; 30,5)*	50,0 (47,0; 55,0)

Окончание табл. 1

End of table 1

Тест Test	Оцениваемый показатель Assessed indicator	Основная группа, $n = 53$ Treatment group, $n = 53$	Контрольная группа, $n = 50$ Control group, $n = 50$
Тест беглости речевых ответов Verbal Fluency	Среднее количество слов, названных в буквенной части Average number of words said in the letter part	27,0 (20,0; 29,0)*	48,0 (45,0; 56,0)
Тест Бентона Benton Visual Retention Test	Средний балл Average score	4,0 (3,0; 5,0)*	8,0 (8,0; 8,8)
	Среднее количество допущенных ошибок Average number of errors	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (1,0; 1,0)
Заучивание 10 слов 10 words learning	Среднее количество слов, запомненных после 1 предъявления Average number of words memorized after the first demonstration	7,5 (4,0; 9,0)	6,5 (5,3; 7,0)
	Среднее количество запомненных слов за 5 предъявлений Average number of words memorized after five presentations	6,5 (4,0; 7,0)*	10,0 (10,0; 10,0)
Шифровка Coding	Среднее число верно зашифрованных слов Average number of correctly encoded words	5,5 (5,0; 6,0)*	17,5 (16,0; 19,0)

\* уровень статистической значимости различий между основной и контрольной группами при  $p < 0,05$ .\* statistical significance of the differences between the treatment and control groups at  $p < 0.05$ .

Основным критерием для выявления клинического полиморфизма нейрокогнитивных нарушений явилась оценка уровня различных когнитивных функций на фоне других, регистрируемых нейропсихологическими методиками. Для этого был применен кластерный анализ (метод  $K$ -средних). Кроме того, средние баллы выполнения у пациентов с различными вариантами когнитивных нарушений были переведены в значения степени нейрокогнитивного дефицита с помощью шкалы Z. Полученные данные графически представлены по шкале от 0 до 2 (где 0–1 – выраженный нейрокогнитивный дефицит, 1–2 – умеренный, 2 – нормативные показатели) для формирования «когнитивного профиля» обнаруженных вариантов в сравнении с контрольной группой. При проведении кластерного анализа были получены три кривые (рис.), характеризующие особенности когнитивных нарушений при трех вариантах когнитивных нарушений по сравнению с нормативными показателями когнитивных функций (четвертая линия).

На основании кластеризации когнитивных нарушений пациенты были объединены в три группы в зависимости от варианта нейрокогнитивных нарушений.

Первый вариант нейрокогнитивных нарушений: 36% обследованных пациентов,  $n = 18$ . В эту группу вошли лица, у которых преимущественно

регистрировались выраженные нарушения лексической системы, вербальной ассоциативной продуктивности, внимания, а также рабочей памяти и исполнительской функции при относительно меньшем нарушении показателей зрительной, вербальной памяти и ориентации и (или) координации. Это может свидетельствовать о синдроме нарушения срединных неспецифических структур головного мозга – центральные симптомы [46], сочетанным с синдромом «гипофронтальности». В мета-анализе M. Johnson-Selfridge, C. Zalewski [47] было выявлено, что нарушение деятельности фронтальной области коры головного мозга приводит к гиперактивации подкорковых систем и в дальнейшем влечет нарушения передачи импульсов, замедляя активность психических процессов у больных шизофренией.

Второй вариант нейрокогнитивных нарушений: 30% обследованных больных,  $n = 15$ . Эту группу составили пациенты, у которых в сравнении с первым вариантом нейрокогнитивных нарушений отмечалось более выраженное ухудшение внимания, зрительной памяти, исполнительской функции, ориентации и (или) координации. Меньше, чем в первой группе, но также находясь в рамках выраженной степени нарушений, выявился дефицит вербальной ассоциативной продуктивности и лексической системы на фоне умеренной степени расстройства рабочей памяти.

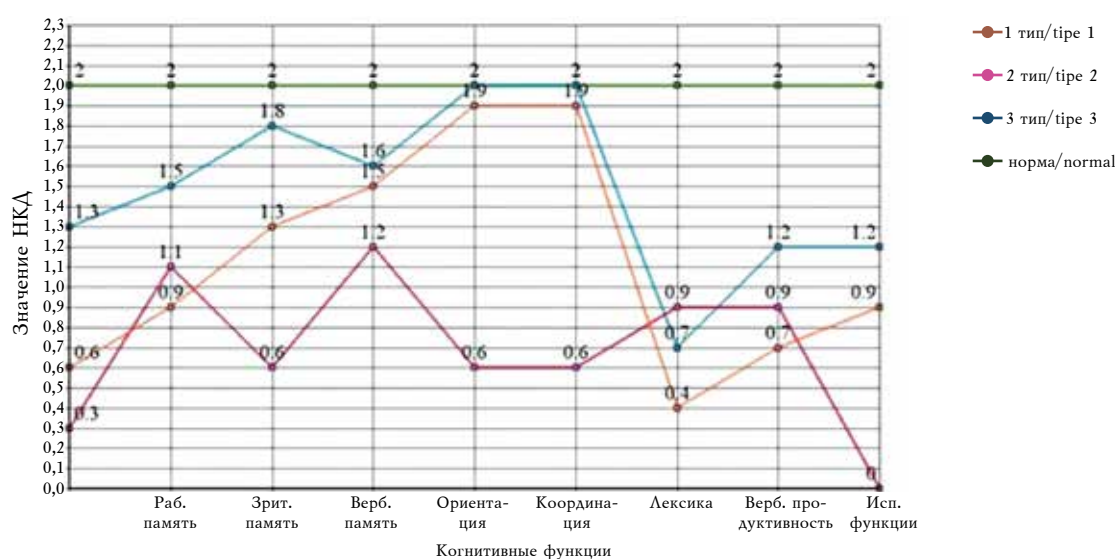


Рисунок. «Когнитивный профиль» выделенных вариантов клинического полиморфизма когнитивных нарушений: НКД – нейрокогнитивный дефицит; 0–1 – выраженный нейрокогнитивный дефицит, 1–2 – умеренный нейрокогнитивный дефицит, 2 – нормативные показатели

Figure. “Cognitive profile” of the variants of clinical polymorphism of cognitive impairments: NCD – neurocognitive deficits; 0–1 – pronounced neurocognitive deficits, 1–2 – moderate neurocognitive deficits, 2 – standard indicator

Анализ структуры когнитивных нарушений в этой группе больных позволяет предположить сочетанное поражение фронтальных отделов (феномен «гипофронтальности») и нарушение деятельности теменно-височно-затылочных областей головного мозга [48].

Третий вариант нейрокогнитивных нарушений: 34% обследованных лиц,  $n = 17$ . В нее вошли пациенты с выраженным снижением лексической системы на фоне меньшего нарушения внимания, рабочей, зрительной, вербальной памяти, вербальной ассоциативной продуктивности, исполнительских функций и почти сохраненных ориентации и (или) координации. Такая структура когнитивных нарушений может быть обусловлена вовлечением заднего отдела верхней височной извилины. Так, в одном из исследований [49] была определена частота выявления нарушений в различных областях головного мозга при ши-

зофрении. При этом нарушения в левой верхней височной извилине были обнаружены в 55% случаев, в правой – у 38% больных.

Наиболее распространенной клинической концепцией шизофрении является дихотомическая [50], выделяющая два синдрома – позитивный и негативный, причем последний коррелирует с более выраженными когнитивными симптомами. Тем не менее в последние годы когнитивные нарушения все чаще рассматриваются как третья ключевая группа симптомов шизофрении [18]. В этой связи нами предпринята попытка связать выраженность позитивных, негативных и общепсихопатологических симптомов, зарегистрированных по PANSS, с выделенными в рамках данного исследования клиническими вариантами когнитивных нарушений, показав проблему перекрытия симптоматики, если рассматривать нейрокогнитивный дефицит как мета-синдром (табл. 2).

Таблица 2  
Table 2

Средние значения PANSS при различных когнитивных нарушениях, $Me (Q_1; Q_3)$ PANSS average values in different cognitive disturbances, $Me (Q_1; Q_3)$				
PANSS	I вариант когнитивных нарушений, $n = 15$ Variant I of cognitive disturbances, $n = 15$	II вариант когнитивных нарушений, $n = 18$ Variant II of cognitive disturbances, $n = 18$	III вариант когнитивных нарушений, $n = 17$ Variant III of cognitive disturbances, $n = 17$	$p < 0,05$
Шкала позитивных синдромов Scale of positive symptoms	16,0 (14,0; 18,5)	22,0 (20,0; 27,0)	11,0 (9,0; 14,0)	I–III, II–I, II–III

Окончание табл. 2

End of table 2

PANSS	I вариант когнитивных нарушений, $n = 15$ Variant I of cognitive disturbances, $n = 15$	II вариант когнитивных нарушений, $n = 18$ Variant II of cognitive disturbances, $n = 18$	III вариант когнитивных нарушений, $n = 17$ Variant III of cognitive disturbances, $n = 17$	$p < 0,05$
Шкала негативных синдромов Scale of negative symptoms	22,0 (20,5; 23,5)	26,0 (24,0; 34,0)	19,0 (16,0; 20,0)	I–III, II–I, II–III
Шкала общей психопатологии Scale of general psychopathology	41,0 (39,0; 44,0)	54,0 (47,0; 60,0)	32,0 (30,0; 38,0)	I–III, II–I, II–III

По всем отдельным шкалам PANSS выявлено значимое преобладание выраженности симптоматики при II варианте когнитивных нарушений над I и III, а также I над III. Это свидетельствует о связи тяжести состояния, прежде всего, с выраженностью нарушений внимания, зрительной памяти, исполнительской функции и ориентации и (или) координации.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование посвящено поиску клинических особенностей нейрокогнитивных нарушений при шизофрении. Самостоятельность данного синдрома до сих пор является дискуссионным вопросом, поэтому он не классифицирован как один из ведущих доменов шизофрении в DSM-5 [17]. Верификация нейрокогнитивного дефицита у пациентов изученной выборки и контрольной группы проводилась с применением современных наиболее чувствительных инструментов исследования, позволяющих охватить всю палитру когнитивных нарушений, обычно наблюдающихся при шизофрении [18, 37]. Это позволило систематизировать выявленные симптомы и провести их кластеризацию с выделением трех наиболее частых комбинаций и сопоставить их с клинической картиной в целом. Ранее неоднократно предпринимались попытки классифицировать нейрокогнитивный дефицит, в результате было получено множество разрозненных результатов и усредненный «когнитивный профиль» пациентов [51]. Параллельно с помощью методов нейровизуализации выявлено, что при шизофрении нарушение функционирования головного мозга затрагивает различные его области, в том числе фронтальную область. Результаты данного исследования демонстрируют три «когнитивных профиля», зарегистрированных с помощью нейропсихологических тестов, поражение фронтальной области головного мозга («синдром гипофронтальности»), височно-теменно-затылочной зоны и левой верхней височной извилины. Нарушение деятельности указанных областей головного мозга также зафиксировано

в ранее проведенных исследованиях с помощью методов визуализации [52] и путем нейропсихологической диагностики, хотя эти данные часто разнятся, что, вероятно, зависит от применяемых тестовых методик [53].

Поскольку в исследовании не ставился вопрос о клинической самостоятельности нейрокогнитивного дефицита в рамках шизофрении, наибольший интерес представляло изучение перекрытия симптоматики между когнитивными нарушениями, с одной стороны, и позитивным, негативным синдромами, а также с общепсихопатологическими проявлениями – с другой. Такой подход вносит вклад в понимание клинической картины шизофрении, диагностические границы которой меняются с вводом каждого пересмотра классификаций. В еще большей мере это важно в нынешнюю эпоху плавного перехода от категориального подхода в диагностике к дименсиональному.

Раскрывая клинический полиморфизм нейрокогнитивного дефицита и его связь с другими проявлениями шизофрении, данная работа показывает терапевтические точки приложения. Речь идет в первую очередь о когнитивной ремедиации, которая представляет собой управляемое восстановление утраченных в результате болезни высших психических функций, а также заместительный тренинг сохранных функций, позволяющий адекватно функционировать в условиях нейрокогнитивного дефицита. Помимо этого современный арсенал препаратов позволяет персонализировать подбор базисной и комбинированной терапии с учетом поражения тех или иных когнитивных функций у пациента.

В настоящем исследовании не рассматривались проявления социально-когнитивного дефицита, который представляет собой отдельный вопрос как в плане идентификации, так и в реабилитационном аспекте. Безусловно, синдромальные границы между нарушениями социальных когнитивных и нейрокогнитивным дефицитом весьма относительны, равно как и его самостоятельность по от-



ношению к позитивным и негативным симптомам шизофрении не является очевидной. Тем не менее активно совершенствующаяся нейропсихиатрическая и нейропсихологическая база диагностических методик позволяет выводить когнитивные дисфункции в отдельную клиническую субъединицу в рамках шизофрении, что в конечном счете обеспечивает возможность разработки персонализированных лечебно-реабилитационных программ с учетом диагностируемых нарушений по каждому симптомокомплексу.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании не выявлены статистически значимые различия средних суммарных показателей основной и контрольной групп следующих нейропсихологических методик: тест на зрительно-моторную координацию (модификация «А»), тест Струпа (первая часть), тест Бентона (среднее количество допущенных ошибок), тест на заучивание 10 слов (после первого предъявления). По остальным измерениям между группами отмечены статистически значимые различия, демонстрирующие наличие нейрокогнитивного дефицита у больных шизофренией. Так, по тесту Струпа (вторая часть), тесту беглости речевых ответов (обе части), среднему баллу теста Бентона, тесту на заучивание 10 слов (за пять предъявлений), шифровке и лабиринтам группы различались с уровнем  $p < 0,05$ , а по тесту на зрительно-моторную координацию (модификация «В») при  $p < 0,01$ .

Анализируя полученный в данном исследовании «когнитивный профиль» клинического полиморфизма нейрокогнитивного дефицита, можно заметить некоторое сходство I и III вариантов кластеризации. Эти данные дают повод задуматься о наличии перекрытий симптомов в рамках самих когнитивных нарушений. Необходимо также уточнить, что выделенные варианты нейрокогнитивного дефицита могут зависеть от конкретной выборки и не являются единственно возможными.

Сопоставление выявленного «когнитивного профиля» с показателями PANSS выявило значимое преобладание выраженности симптоматики по всем ее шкалам при нарушениях внимания, зрительной памяти, исполнительской функции и ориентации и (или) координации по сравнению с остальными проявлениями когнитивного дефицита ( $p < 0,05$ ). Таким образом, наличие указанных признаков когнитивного снижения ассоциировано с тяжестью шизофренического процесса в целом.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kraepelin E. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Leipzig: J.A. Barth, 1899.
2. Hartmann-Riemer M.N., Hager O.M., Kirschner M., Bischof M., Kluge A., Seifritz E., Kaiser S. The association of neurocognitive impairment with diminished expression and apathy in schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2015; 169 (1–3): 427–432. DOI: 10.1016/j.schres.2015.10.032.
3. Nehra R., Grover S., Sharma S., Sharma A., Kate N. Neurocognitive functioning in schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: A Comparison. *Indian journal of psychological medicine*. 2016; 38 (1): 50–55. DOI: 10.4103/0253-7176.175114.
4. Heinrichs R.W., Zakzanis K.K. Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence. *Neuropsychology*. 1998; 12 (3): 426–445. DOI: 10.1037//0894-4105.12.3.426.
5. Keefe R.S., Silva S.G., Perkins D.O., Lieberman J.A. The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Schizophrenia Bulletin*. 1999; 25 (2): 201–222. DOI: 10.1093/oxfordjournals.schbul.a033374.
6. Fatouros-Bergman H., Cervenka S., Flyckt L., Edman G., Farde L. Meta-analysis of cognitive performance in drug-naïve patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2014; 158 (1–3): 156–162. DOI: 10.1016/j.schres.2014.06.034.
7. Green M.F. Cognitive impairment and functional outcome in schizophrenia and bipolar disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2006; 67 (Suppl. 9): 3–8. DOI: 10.4088/jcp.1006e12.
8. Reichenberg A. The assessment of neuropsychological functioning in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2010; 12 (3): 383–392.
9. Kalkstein S., Hurford I., Gur R.C. Neurocognition in schizophrenia. *Current topics in behavioral neurosciences*. 2010; 4: 373–390.
10. Schaefer J., Giangrande E., Weinberger D.R., Dickinson D. The global cognitive impairment in schizophrenia: consistent over decades and around the world. *Schizophrenia Research*. 2013; 150 (1): 42–50. DOI: 10.1016/j.schres.2013.07.009.
11. Moritz S., Heeren D., Andresen B., Krausz M. An analysis of the specificity and the syndromal correlates of verbal memory impairments in schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2001; 101 (1): 23–31. DOI: 10.1016/S0165-1781(00)00241-9.
12. Moritz S., Birkner C., Kloss M., Jahn H., Hand I., Haasen C., Krausz M. Executive functioning in obsessive-compulsive disorder, unipolar depression, and schizophrenia. *Archives of Clinical Neuropsychology*. 2002; 17 (5): 477–483. DOI: 10.1016/S0887-6177(01)00130-5.
13. Лебедева Е.В., Горохов А.С., Счастный Е.Д., Репин А.Н., Симуткин Г.Г., Шишнев Е.В., Перчаткин В.А., Суrowцева А.К., Винтер Ш., Карпов Р.С., Бохан Н.А. Динамика когнитивной дисфункции и биохимического

- маркера повреждения ЦНС белка S100 $\beta$  при коронарном шунтировании. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (4): 72–84. [Lebedeva E.V., Gorokhov A.S., Schastnyy E.D., Repin A.N., Simutkin G.G., Shishneva E.V., Perchatkin V.A., Surovtseva A.K., Vinter S., Karpov R.S., Bokhan N.A. Time course of cognitive dysfunction and the biochemical marker of CNS lesions S100 $\beta$  in coronary artery bypass graft. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (4): 72–84 (in Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-72–84.
14. Bora E., Yucel M., Pantelis C. Cognitive functioning in schizophrenia, schizoaffective disorder and affective psychoses: meta-analytic study. *The British Journal of Psychiatry: the Journal of Mental Science*. 2009; 195 (6): 475–482. DOI: 10.1192/bjp.bp.108.055731.
15. Palmer B.W., Dawes S.E., Heaton R.K. What do we know about neuropsychological aspects of schizophrenia? *Neuropsychology Review*. 2009; 19 (3): 365–384. DOI: 10.1007/s11065-009-9109-y.
16. World Health Organization ICD-10: classification of mental and behavioural disorders – clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: WHO, 1992.
17. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, 5<sup>th</sup> ed.: Arlington, VA, USA: American Psychiatric Association, 2013. DOI: 10.1176/appi.books.9780890425596.x00diagnosticclassification.
18. Шмуклер А.Б. Шизофрения. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2017: 176. [Shmukler A.B. Schizophrenia. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2017: 176 (in Russ.)].
19. Саркисян Г.Р., Гурович И.Я., Киф Р.С. Нормативные данные для российской популяции и стандартизация шкалы «Краткая оценка когнитивных функций у пациентов с шизофренией». *Социальная и клиническая психиатрия*. 2010; 20 (3): 13–19. [Sarkisyan G.R., Gurovich I.Ya., Keefe R.S. Normative data for the Russian population and standardization of the Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia (BACS) Scale. *Social and clinical Psychiatry*. 2010; 20 (3): 13–19 (in Russ.)].
20. Mesholam-Gately R.I., Giuliano A.J., Goff K.P., Faraone S.V., Seidman L.J. Neurocognition in first-episode schizophrenia: a meta-analytic review. *Neuropsychology*. 2009; 23 (3): 315–336. DOI: 10.1037/a0014708.
21. Bora E., Murray R.M. Meta-analysis of cognitive deficits in ultra-high risk to psychosis and first-episode psychosis: do the cognitive deficits progress over, or after, the onset of psychosis? *Schizophrenia bulletin*. 2014; 40 (4): 744–755. DOI: 10.1093/schbul/sbt085.
22. Brewer W.J., Wood S.J., Phillips L.J., Francey S.M., Pantelis C., Yung A.R., Cornblatt B., McGorry P.D. Generalized and specific cognitive performance in clinical high-risk cohorts: a review highlighting potential vulnerability markers for psychosis. *Schizophrenia bulletin*. 2006; 32 (3): 538–555. DOI: 10.1093/schbul/sbj077.
23. Carlsson R., Nyman H., Ganse G., Cullberg J. Neuropsychological functions predict 1- and 3-year outcome in first-episode psychosis. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2006; 113 (2): 102–111. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00661.x.
24. Green M.F. What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia? *The American journal of psychiatry*. 1996; 153 (3): 321–330. DOI: 10.1176/ajp.153.3.321.
25. Green M.F., Kern R.S., Braff D.L., Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the “right stuff”? *Schizophrenia bulletin*. 2000; 26 (1): 119–136. DOI: 10.1093/oxfordjournals.schbul.a033430.
26. Green M.F., Kern R.S., Heaton R.K. Longitudinal studies of cognition and functional outcome in schizophrenia: implications for MATRICS. *Schizophrenia research*. 2004; 72 (1): 41–51. DOI: 10.1016/j.schres.2004.09.009.
27. Fett A.K., Maat A., Kahn R.S., Linszen D.H., van Os J., Wiersma D., Bruggeman R., Cahn W., de Haan L., Krabbendam L., Myin-Germeys I. Social cognitive impairments and psychotic symptoms: what is the nature of their association? *Schizophrenia bulletin*. 2013; 39 (1): 77–85. DOI: 10.1093/schbul/sbr058.
28. Kurtz M.M., Mueser K.T., Thime W.R., Corbera S., Wexler B.E. Social skills training and computer-assisted cognitive remediation in schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2015; 162 (1–3): 35–41. DOI: 10.1016/j.schres.2015.01.020.
29. Lypez-Mucoz F., Blamo C. Neurobiological background for the development of new drugs in schizophrenia. *Clinical neuropharmacology*. 2011; 34 (3): 111–126. DOI: 10.1097/WNF.0b013e318215c2f7.
30. Wykes T., Spaulding W.D. Thinking about the future cognitive remediation therapy—what works and could we do better? *Schizophrenia bulletin*. 2011; 37 (Suppl. 2): S80–90. DOI: 10.1093/schbul/sbr064.
31. Cella M., Reeder C., Wykes T. Group cognitive remediation for schizophrenia: Exploring the role of therapist support and metacognition. *Psychology and psychotherapy*. 2016; 89 (1): 1–14. DOI: 10.1111/papt.12062.
32. Moritz S., Klein J.P., Desler T., Lill H., Gallinat J., Schneider B.C. Neurocognitive deficits in schizophrenia. Are we making mountains out of molehills? *Psychological medicine*. 2017; 47 (15): 2602–2612. DOI: 10.1017/S0033291717000939.
33. Kaneko K. Negative Symptoms and cognitive impairments in schizophrenia: two key symptoms negatively influencing social functioning. *Yonago acta medica*. 2018; 61 (2): 91–102.
34. Bora E. Differences in cognitive impairment between schizophrenia and bipolar disorder: Considering the role of heterogeneity. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 2016; 70 (10): 424–433. DOI: 10.1111/pcn.12410.
35. Немытых Д.Н. Соотношение когнитивных нарушений при параноидной шизофрении с клиническими проявлениями, типами компенсаторно-приспособительной защиты и уровнем социальной адаптации больных.

- Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2005; 3(37): 68–71. [Nemytykh D.N. Correlation of cognitive disturbances in paranoid schizophrenia with clinical manifestations, types of compensatory-adjustment defense and level of social adaptation of patients. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2005; 3(37): 68–71 (in Russ.)].
36. World Health Organization: The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders – diagnostic criteria for research. Geneva: WHO, 1993.
  37. Мосолов С.Н. Шкалы психометрической оценки симптоматики шизофрении и концепция позитивных и негативных расстройств. Москва, 2001: 238. [Mosolov S.N. Psychometric rating scales of symptoms of schizophrenia and concept of cognitive and negative disorders. Moscow, 2001: 238 (in Russ.)].
  38. Reitan R.M., Wolfson D. The Halstead-Reitan Neuropsychological Test Battery. The neuropsychology handbook: Behavioral and clinical perspectives. Ed. D. Wedding, A.M. Horton Jr., J.S. Webster. New York: Springer Publishing Co, 1986: 134–160.
  39. Stroop J. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology*. 1935; 18 (6): 643–662. DOI: 10.1037/h0054651.
  40. Lezak M.D. Neuropsychological assessment. 3th ed. Oxford: Oxford University Press, 1995.
  41. Benton A. Manuel pour l'application clinique du test de retention visuelle. Saint-Amand: Editions du Centre de psychologie appliquee, 1953.
  42. Лурия А.Р. Высшие корковые функции человека и их нарушения при локальных поражениях мозга. Москва: Издательство Московского университета, 1962: 432. [Luria A.R. Higher cortical functions in the man and their disturbances in local brain lesions. Moscow: Moscow University Press Publ., 1962: 432 (in Russ.)].
  43. Wechsler D. Manual for the Wechsler Adult Intelligence scale. Oxford: Psychological Corp., 1955: 110.
  44. Kay S.R., Opler L.A., Fiszbein A. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*. 1987; 13 (2): 261–276. DOI: 10.1093/schbul/13.2.261.
  45. Зинчук М.С., Семке А.В. Влияние негативной симптоматики на динамику социального статуса больных параноидной шизофренией. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2013; 4 (79): 34–39. [Zinchuk M.S., Semke A.V. Influence of negative symptoms on the dynamics of the social status in patients with paranoid schizophrenia. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2013; 4 (79): 34–39 (in Russ.)].
  46. Thakurathi N., Vincenzi B., Henderson D.C. Assessing the prospect of donepezil in improving cognitive impairment in patients with schizophrenia. *Expert opinion on investigational drugs*. 2013; 22 (2): 259–265. DOI: 10.135437841517/.2013.750650.
  47. Johnson-Selfridge M., Zalewski C. Moderator variables of executive functioning in schizophrenia: meta-analytic findings. *Schizophrenia bulletin*. 2001; 27 (2): 305–316. DOI: 10.1093/oxfordjournals.schbul.a006876.
  48. Гурович И.Я., Шмуклер А.Б., Зайцева Ю.С. Нейрокогнитивный дефицит у больных шизофренией. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2012; S2: 75–78. [Gurovich I.Ya., Shmukler A.B., Zaitseva Yu.S. Neurocognitive deficit in patients with schizophrenia. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2012; S2: 75–78 (in Russ.)]. DOI: 10.14412/2074-2711-2012-2514.
  49. Honea R.A., Meyer-Lindenberg A., Hobbs K.B., Pezawas L., Mattay V.S., Egan M.F., Verchinski B., Passingham R.E., Weinberger D.R., Callicott J.H. Is gray matter volume an intermediate phenotype for schizophrenia? A voxel-based morphometry study of patients with schizophrenia and their healthy siblings. *Biological psychiatry*. 2008; 63 (5): 465–474. DOI: 10.1016/j.biopsych.2007.05.027
  50. Crow T.J. The two-syndrom concept: origins and current status. *Schizophrenia bulletin*. 1985; 11 (3): 471–488. DOI: 10.1093/schbul/11.3.471.
  51. Heinrichs R.W., Zakzanis K.K. Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence. *Neuropsychology*. 1998; 12 (3): 426–445. Doi: 10.1037//0894-4105.12.3.426.
  52. Reichenberg A., Harvey P.D. Neuropsychological impairments in schizophrenia: Integration of performance-based and brain imaging findings. *Psychological bulletin*. 2007; 133 (5): 833–858. DOI:10.1037/0033-2909.133.5.833.
  53. Zaytseva Y., Fajnerová I., Dvořáček B., Bourama E., Stamou I., Šulcová K., Motýl J., Horáček J., Rodriguez M., Španiel F. Theoretical modeling of cognitive dysfunction in schizophrenia by means of errors and corresponding brain Networks. *Frontiers in psychology*. 2018; 9: 1027. DOI: 10.3389/fpsyg.2018.01027.

## Вклад авторов

Корнетов А.Н. – разработка концепции исследования, написание статьи. Корнетова Е.Г. – разработка дизайна исследования, клинико-психопатологическое и психометрическое обследование выборки, проверка критически важного интеллектуального содержания, написание статьи. Голенкова А.В. – нейропсихологическое обследование выборки, обработка и анализ данных, написание статьи.

## Authors vontribution

Kornetov A.N. – conception, drafting of the manuscript. Kornetova E.G. – design of the study, clinical and psychopathological examination of the patients, critical revision of the manuscript for important intellectual content, drafting of the article. Golenkova A.V. – neuropsychological examination of the patients, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript. Kozlova S.M. –

Козлова С.М. – нейропсихологическое обследование выборки. Аржаник М.Б. – анализ и интерпретация данных. Самойленко Ж.А. – нейропсихологическое обследование выборки, написание статьи. Бойко А.С. – анализ данных, обоснование рукописи. Семке А.В. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

neuropsychological examination of the patients. Arzhanik M.B. – analysis and interpretation of the data. Samoylenko Zh.A. – neuropsychological examination of the patients, drafting of the manuscript. Boiko A.S. – analysis of the data, justification of the manuscript. Semke A.S. – final approval of the manuscript for publication.

## Сведения об авторах

**Корнетов Александр Николаевич**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальной психологии и поведенческой медицины, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-2342-7504.

**Корнетова Елена Георгиевна**, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение эндогенных расстройств, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ; психиатр-консультант, клиники СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-5179-9727.

**Голенкова Анна Валерьевна**, студент, медико-биологический факультет, СибГМУ, г. Томск.

**Козлова Светлана Михайловна**, клинический психолог, 2-е клиническое отделение, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск.

**Аржаник Марина Борисовна**, канд. пед. наук, доцент, кафедра физики с курсом высшей математики, СибГМУ, г. Томск.

**Самойленко Жанна Александровна**, ассистент, кафедры фундаментальной психологии и поведенческой медицины, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-7639-1779.

**Бойко Анастасия Сергеевна**, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория молекулярной генетики и биохимии, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск.

**Семке Аркадий Валентинович**, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной и лечебной работе, зав. отделением эндогенных расстройств, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ; профессор, кафедра психиатрии, наркологии, и психотерапии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-8698-0251.

(✉) **Корнетов Александр Николаевич**, e-mail: [alkornetov@gmail.com](mailto:alkornetov@gmail.com).

## Authors information

**Kornetov Alexander N.**, DM, Head of Basic Psychology and Behavioral Medicine Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2342-7504.

**Kornetova Elena G.**, DM, Leading Research Officer, Endogenous Disorders Department, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC RAS; Consultant Psychiatrist, Hospital of the SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-5179-9727.

**Golenkova Anna V.**, Student, Medical and Biological Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Kozlova Svetlana M.**, Clinical Psychologist, 2nd Clinical Department, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Arzhanik Marina B.**, PhD, Associate Professor, Division of Physics and Higher Mathematics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Samoylenko Zhanna A.**, Assistant, Basic Psychology and Behavioral Medicine Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7639-1779.

**Boiko Anastasiya S.**, PhD, Research Officer, Molecular Genetics and Biochemistry Laboratory, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Semke Arkadi V.**, DM, Professor, Deputy Director for Scientific and Medical Work, Head of the Endogenous Disorders Department, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC RAS; Professor, Division of Psychiatry, Narcology and Psychotherapy, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8698-0251.

(✉) **Kornetov Alexander N.**, e-mail: [alkornetov@gmail.com](mailto:alkornetov@gmail.com).

Поступила в редакцию 18.02.2019

Подписана в печать 15.04.2019

Received 18.02.2019

Accepted 15.04.2019

## Пролиферация и апоптоз лимфоцитов у экспериментальных животных после многократной трансплантации клеток иммунной системы, проведенной в ювенильный период развития

Маркова Е.В., Савкин И.В., Анисеева О.С., Козлов В.А.

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

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования** – определение субпопуляционного состава, пролиферативной активности и уровня апоптоза Т-лимфоцитов у половозрелых мышей-реципиентов, подвергнутых в ювенильный период развития многократной трансплантации иммунных клеток с различными функциональными показателями, характерными для животных с оппозиционными типами поведения.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на самцах мышей (СВАхС57BL/6) F1 ( $n = 190$ ), которым, начиная с 4–5-недельного возраста, была проведена трехкратная трансплантация иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками. У сингенных реципиентов в половозрелом возрасте проводилось фенотипирование клеток селезенки методом проточной цитофлуориметрии с моноклональными антителами против CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, оценивались пролиферативная активность и апоптоз спленоцитов.

**Результаты.** Животные, подвергнутые в ювенильный период развития многократной трансплантации иммунных клеток от сингенных доноров с оппозиционными типами поведения, в половозрелом возрасте характеризуются различными функциональными свойствами лимфоцитов селезенки. Причем наиболее выраженные изменения выявлены у животных, получивших трансплантат от доноров с пассивным типом поведения, лимфоциты которых характеризовались относительно низкой пролиферативной активностью и чувствительностью к Т-клеточному митогену, снижением доли апоптоза CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> клеток, находящихся в условиях обедненной культуральной среды и повышением уровня активационного и дексаметазон-индуцированного апоптоза CD4<sup>+</sup> лимфоцитов.

**Ключевые слова:** трансплантация, иммунные клетки, субпопуляции лимфоцитов, пролиферативная активность, апоптоз.

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

**Источник финансирования.** Финансирование исследований производилось за счет средств субсидий, предоставляемой НИИФКИ на оказание государственных услуг, установленных государственным заданием.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 106 от 13.04.2018).

**Для цитирования:** Маркова Е.В., Савкин И.В., Анисеева О.С., Козлов В.А. Пролиферация и апоптоз лимфоцитов у экспериментальных животных после многократной трансплантации клеток иммунной системы, проведенной в ювенильный период развития. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 119–126. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-119-126](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-119-126).

УДК 612.116.3:616-008.853.2-091.818]-053.6/.7-092.9  
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-119-126](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-119-126)

## Proliferation and apoptosis of experimental animal's lymphocytes after multiple transplantation of immune cells from opposite behavioral types of donors carried out in the juvenile period

Markova E.V., Anikeeva O.S., Savkin I.V., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)  
14, Yadrintsevskaya Str., 630099, Novosibirsk

### ABSTRACT

**The aim of the study** was to determine subpopulation content, proliferative activity and T-lymphocyte apoptosis level in adult mice-recipients that in the juvenile period underwent multiple transplantation of immune cells with different functional properties from opposite behavioral types of donors.

**Materials and methods.** The study was carried out on male mice (CBAx57BL/6) F1 ( $n = 190$ ), which underwent transplantation of immune cells with definite functional properties three times starting from the age of 4–5-weeks. Phenotyping of recipients' spleen cells was carried out by flow cytometry with monoclonal antibodies against CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>. Splenocyte proliferation and apoptosis were estimated.

**Results.** Animals that underwent threefold transplantation of immune cells from singeing opposite behavioral types of donors in the juvenile period revealed different functional properties of spleen lymphocytes in adults. The most pronounced changes were detected in the animals receiving the immune cells from donors with passive behavior type. The lymphocytes of these recipients were characterized by relatively low proliferative activity and T-mytogen sensitivity, decreased CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> apoptosis level under deficient medium conditions and increased level of activation and dexamethasone-induced apoptosis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes.

**Key words:** transplantation, immune cells, lymphocytes subpopulations, proliferation, apoptosis.

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

**Source of financing.** The study was supported by the government aid granted to RIFCI for providing public services specified in the government order.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the ethics committee at RIFCI (Protocol No. 106 of 13.04.2018).

**For citation:** Markova E.V., Anikeeva O.S., Savkin I.V., Kozlov V.A. Proliferation and apoptosis of experimental animal's lymphocytes after multiple transplantation of immune cells from opposite behavioral types of donors carried out in the juvenile period. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 119–126. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-119-126](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-119-126).

### ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз и пролиферация в качестве составляющих ряда фундаментальных иммунологических процессов являются формой ответа зрелых лимфоцитов на внешние сигналы. Назначение апоптоза, как запрограммированной, активной формы гибели клеток, состоит в поддержании постоянства численности клеток, обеспечении правильного соотношения различных клеточных

субпопуляций, удалении генетически дефектных клеток, что обеспечивает нормальное развитие и функционирование организма [1–5]. Роль апоптоза возрастает в условиях активации клеток (активационный апоптоз), когда он выступает в роли процесса, альтернативного пролиферации [6–8]. На ранних стадиях дифференцировки лимфоциты весьма чувствительны к сигналам, индуцирующим апоптоз, избежать которого клеткам удается



при достаточной концентрации ростовых факторов или при действии стимулов, приводящих к экспрессии bcl-2 или bcl-xL [9–12]. Характер функциональной активности иммунной системы в целом и лимфоцитов в частности, сформированный в процессе постнатального онтогенеза, в том числе и вследствие воздействия внешних факторов, определяет индивидуально-типологические особенности организма [13]. Ранее нами и другими исследователями установлено, что иммунные клетки животных с активным и пассивным типами поведения различаются по функциональной активности. Так, показано, что спленоциты мышей (СВА х С57BL/6)F1 с оппозитными типами поведения различны по фенотипическим характеристикам, спонтанной и митоген-индуцированной пролиферативной активности, уровню синтеза и продукции основных регуляторных цитокинов и экспрессии их генов [14–17]. Также продемонстрирована возможность направленного изменения параметров функциональной активности иммунной и нервной систем организма у половозрелых животных трансплантацией иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками [18–20].

Целью настоящего исследования было определение субпопуляционного состава, пролиферативной активности и апоптоза Т-лимфоцитов у половозрелых реципиентов, подвергнутых в ювенильный период развития многократной трансплантации иммунных клеток с различными функциональными показателями, характерными для животных с оппозитными типами поведения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на самцах мышей (СВА х С57BL/6)F1 ( $n = 190$ ), полученных из лаборатории экспериментальных животных (моделей) НИИФКИ (г. Новосибирск). Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, не менее 2 нед до начала эксперимента на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме. Содержание экспериментальных животных соответствовало правилам, принятым Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003, № 267).

Ориентировочно-исследовательское поведение (ОИП) половозрелых 3-месячных животных

(интактных – доноров и реципиентов после клеточной трансплантации) оценивали в тесте «открытое поле» [21]. Регистрировалась моторная и исследовательская активность мышей в течение 5 мин с интервалом в 1 мин. В качестве доноров для клеточной трансплантации использовали мышей с оппозитными (активным и пассивным) типами поведения, иммунные клетки которых характеризуются различной функциональной активностью [17, 18].

Выделение спленоцитов проводилось в стерильных условиях, согласно описанной ранее методике [16]. Далее иммунциты доноров с активным (группа 1) либо пассивным (группа 2) типами поведения трехкратно внутривенно вводили сингенным реципиентам, начиная с 4–5-недельного возраста, в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток в объеме 0,4 мл среды RPMI-1640 на одно животное с интервалом в 1 нед. Контрольной группе мышей в аналогичных условиях эксперимента вводилась среда RPMI-1640.

У сингенных реципиентов в половозрелом возрасте оценивались субпопуляционный состав, пролиферативная активность и уровень апоптоза лимфоцитов селезенки. Фенотипирование спленоцитов проводилось методом проточной цитофлуориметрии с помощью аналитической системы FACS Calibur (Becton Dickinson, США) согласно инструкции по эксплуатации, прилагаемой к прибору, с моноклональными антителами против CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (eBioscience, США), помеченными флуорохромами с отличающимися спектрами эмиссии.

Пролиферативный ответ спленоцитов оценивали общепринятым методом реакции бластной трансформации лимфоцитов, как это было описано ранее [17]. В качестве митогенов использовались субоптимальные концентрации ЛПС *E. coli* 0111:B4 (Sigma, США) и конкавалина А (Pharmacia, США), которые составляли соответственно 20 и 3 мкг/мл.

Для определения уровня апоптоза Т-лимфоцитов стерильно выделенную из суспензии спленоцитов на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) лимфоцитарную фракцию (по  $2 \times 10^5$  кл./150,0 мкл обедненной (1% FSC) среды в нативных, индуцированных антиCD3 антителами (1 мкг/ $2 \times 10^5$  кл./150,0 мкл) и стимулированных дексаметазоном ( $1 \times 10^{-4}$  М) вариантах помещали в 96-луночный планшет на 96 ч при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Далее производилось поверхностное маркирование клеток моноклональными антителами, различающимися по спектру эмиссии: aCD8<sup>+</sup>, меченных PE-Cy5 и aCD4<sup>+</sup>, меченных

фикоэритрином (PE). После проведения фиксации и пермеабилзации относительное содержание клеток с гиподиплоидным (апоптотические клетки) набором ДНК определяли по степени флуоресценции внутриядерного красителя 7-актиноаминомицина D(7-AAD). Исследование проводилось на проточном цитометре FACS CantoII (Becton Dickinson, США) с использованием программы BD FACS Diva. Результаты представлены в процентах (%).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью компьютерной программы SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Для попарного сравнения показателей применяли непараметрический  $U$ -критерий Ман-

на – Уитни (для независимых выборок), для множественного сравнения показателей использовали критерий Краскела – Уоллиса. Результаты представляли в виде медианы, первого и третьего квартилей  $Me (Q_1-Q_3)$ . Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки мышей-реципиентов, выросших в условиях многократной трансплантации клеток иммунной системы с различными функциональными показателями, характерными для животных с оппозиционными типами поведения, представлен в табл. 1.

Таблица 1  
Table 1

Субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки мышей-реципиентов (CBAx57Bl/6)F1, подвергнутых в ювенильный период онтогенеза трехкратной трансплантации спленоцитов от половозрелых доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типами поведения, %, $Me (Q_1-Q_3)$ Spleen lymphocyte subpopulation content of mouse-recipient (CBAx57Bl/6)F1 that underwent threefold transplantation of splenocytes from mature donors with active (group 1) and passive (group 2) behavioral types in the juvenile period, %, $Me (Q_1-Q_3)$			
Показатель Indicator	Контроль, $n = 10$ Control, $n = 10$	Группа 1, $n = 10$ Group 1, $n = 10$	Группа 2, $n = 10$ Group 2, $n = 10$
CD4 <sup>+</sup>	25,4 (23,8–26,0)	22,75 (21,35–24,5) $p_1 = 0,050$	26,7 (25,9–27,1) $p_1 = 0,049$ $p_2 = 0,044$ $p_3 = 0,048$
CD8 <sup>+</sup>	16,6 (12,7–18,3)	14,05 (13,3–14,9)	17,0 (15,5–17,0) $p_2 = 0,048$ $p_3 = 0,049$

Примечание. Здесь и в табл. 2: уровень значимости при сравнении показателей по критерию Краскела – Уоллиса:  $p_1$  – в группе контроля;  $p_2$  – в группах 1 и 2,  $p_3$  – во всех группах.

Note. Here and in Table 2: statistical significance when comparing indicators according to the Kruskal – Wallis test:  $p_1$  – in the control group;  $p_2$  – in groups 1 and 2,  $p_3$  – in all groups.

Полученные результаты демонстрируют уменьшение доли CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в группе 1 и увеличение доли CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в группе 2 по сравнению с контрольными животными. При этом выявлено более низкое содержание CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в селезенке мышей группы 1 по сравнению с таковыми в селезенке группы 2. Результаты исследования пролиферативной активности спленоцитов мышей-реципиентов, которым были трансплантированы иммунные клетки от доноров с оппозиционными типами поведения, представлены в табл. 2.

Выявлен более высокий уровень спонтанной пролиферативной активности спленоцитов мышей – реципиентов группы 1 (доноры с активным типом поведения) и более низкий уровень спонтан-

ной пролиферации указанных клеток у мышей – реципиентов группы 2 (доноры с пассивным типом поведения) по сравнению с контрольными животными. По сравнению с последними у животных группы 2 был также показан низкий ответ лимфоцитов на Т-клеточный митоген (КонА). При этом различий в уровне ответа селезеночных лимфоцитов всех исследуемых реципиентов на В-клеточный митоген не выявлено.

Результаты исследования чувствительности CD4<sup>+</sup> лимфоцитов селезенки указанных выше групп мышей-реципиентов к индукции апоптоза в обедненной культуральной среде в присутствии антиCD3антител (aCD3) и дексаметазона представлены в табл. 3.

Таблица 2

Table 2

Проллиферативная активность спленоцитов мышей-реципиентов CBAx57Bl/6)F1, подвергнутых в ювенильный период онтогенеза трехкратной трансплантации спленоцитов от половозрелых доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типами поведения, имп/мин,  $Me (Q_1-Q_3)$

Proliferative activity of splenocytes of mouse-recipients (CBAx57Bl/6)F1 that underwent threefold transplantation of splenocytes from mature donors with active (group 1) and passive (group 2) behavioral types in the juvenile period, impulse/min,  $Me (Q_1-Q_3)$

Показатель Indicator	Контроль, $n = 36$ Control, $n = 36$	Группа 1, $n = 45$ Group 1, $n = 45$	Группа 2, $n = 45$ Group 2, $n = 45$
Спонтанная Spontaneous	496,0 (276,0–796,0)	562,5 (444,5–1 909,5) $p_1 = 0,050$	264,0 (163,0–593,0) $p_1 = 0,049$ $p_2 = 0,049$ $p_3 = 0,046$
Кон А ConA	16 944,0 (12 001,0–19 230,0)	14 560,0 (10 192,0–18 848,0)	11 216,0 (7 923,0–15 106,0) $p_1 = 0,008$ $p_2 = 0,044$ $p_3 = 0,027$
ЛПС LPS	23 563,0 (16 520,5–27 542,0)	24 805,0 (18 194,0–30 806,0)	26 175,0 (20 051,0–30 078,0)

Таблица 3

Table 3

Уровень апоптоза  $CD4^+$  лимфоцитов в культурах клеток селезенки мышей-реципиентов, подвергнутых в ювенильный период онтогенеза трехкратной трансплантации спленоцитов от половозрелых доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типами поведения, % от общего числа  $CD4^+$ ,  $Me (Q_1-Q_3)$

$CD4^+$  lymphocyte apoptosis level (% of total  $CD4^+$ ) in spleen cell cultures of mice-recipients (CBAx57Bl/6)F1 that underwent threefold transplantation of splenocytes from mature donors with active (group 1) and passive (group 2) behavioral types in the juvenile period, % from the total number of  $CD4^+$ ,  $Me (Q_1-Q_3)$

Группа животных Group of animals	Спонтанный Spontaneous	aCD3	Дексаметазон Dexamethasone
Контроль, $n = 9$ Control, $n = 9$	40,1 (39,2–41,7)	10,6 (9,5–12,3)	28,3 (26,7–30,2)
Группа 1, $n = 9$ Group 1, $n = 9$	38,7 (34,9–42,1)	10,4 (9,8–12,0)	22,4 (20,0–28,3)
Группа 2, $n = 9$ Group 2, $n = 9$	31,6 (25,5–38,2) $p_1 = 0,045$ $p_3 = 0,044$	16,0 (15,2–17,1) $p_1 = 0,044$ $p_3 = 0,046$	31,8 (30,6–34,1) $p_1 = 0,049$ $p_3 = 0,045$

Примечание. Здесь и в табл. 4: уровень значимости  $p_1$  – по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе,  $p_3$  – при сравнения соответствующих показателей в всех группах по критерию Краскела – Уоллиса.

Note. Here and in Table 4: statistical significance  $p_1$  – as opposed to the corresponding indicator in the control group;  $p_3$  – when comparing corresponding indicators in all the groups according to the Kruskal – Wallis test.

Таблица 4

Table 4

Апоптоз  $CD8^+$  лимфоцитов в культурах клеток селезенки мышей-реципиентов, подвергнутых в ювенильный период онтогенеза трехкратной трансплантации спленоцитов от половозрелых доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типами поведения, % от общего числа  $CD8^+$ , % от общего числа  $CD8^+$ ,  $Me (Q_1-Q_3)$

$CD8^+$  lymphocyte apoptosis level in spleen cell cultures of mice-recipients (CBAx57Bl/6)F1 that underwent threefold transplantation of splenocytes from mature donors with active (group 1) and passive (group 2) behavioral types in the juvenile period, % from the total  $CD8^+$ ,  $Me (Q_1-Q_3)$

Группа животных Group of animals	Спонтанный Spontaneous	aCD3	Дексаметазон Dexamethasone
Контроль, $n = 9$ Control, $n = 9$	45,8 (43,5–48,3)	6,9 (6,2–7,8)	28,0 (25,9–31,1)
Группа 1, $n = 9$ Group 1, $n = 9$	47,5 (45,6–50,2)	5,2 (4,6–7,1)	27,9 (22,7–33,0)
Группа 2, $n = 9$ Group 2, $n = 9$	30,2 (28,9–32,6) $p_1 = 0,021$ $p_3 = 0,031$	6,7 (6,1–8,3)	36,3 (35,3–39,2) $p_1 = 0,044$ $p_3 = 0,046$

Установлено, что в группе 2 реципиентов доля апоптоза  $CD4^+$  клеток, находящихся в условиях обедненной культуральной среды, ниже по сравнению с таковой у контрольных животных; при этом выявлен более высокий уровень апоптоза в присутствии аCD3 или при дополнительной стимуляции дексаметазоном. Результаты исследования чувствительности  $CD8^+$  лимфоцитов селезенки мышей-реципиентов к индукции апоптоза в обедненной культуральной среде в присутствии аCD3 и дексаметазона представлены в табл. 4.

Установлено значимое снижение доли апоптоза  $CD8^+$  клеток, находящихся в условиях обедненной культуральной среды в группе 2 мышей-реципиентов (доноры с пассивным типом поведения) относительно животных, которым были трансплантированы иммуноциты от доноров с активным типом поведения и животных контрольной группы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунная и нервная системы, функционируя в тесном взаимодействии, играют важнейшую роль в поддержании гомеостаза на всех этапах онтогенеза. Причем характер их взаимодействия определяет особенности психофизиологического статуса индивидуумов, в том числе поведенческий фенотип и особенности функциональной активности клеточных элементов иммунной системы [22–24]. Ранее нами показано, что у подавляющей части половозрелых мышей-реципиентов, подвергнутых в ювенильный период развития многократной трансплантации иммунных клеток с различными функциональными показателями, характерными для животных с оппозитивными типами поведения, преимущественно формируется поведенческий фенотип, свойственный животным – донорам клеток, сопряженный с интенсивностью клеточного иммунного ответа [25].

Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о том, что животные, выросшие в условиях многократной трансплантации иммуноцитов от сингенных доноров с оппозитивными типами поведения, в половозрелом возрасте характеризуются различными функциональными свойствами лимфоцитов. При этом функциональная активность лимфоцитов реципиентов, выросших в условиях многократной трансплантации иммуноцитов от доноров с активным типом поведения сходна с таковой у контрольной группы мышей, за исключением более высокой спонтанной пролиферативной активности клеток. Наиболее выраженные изменения выявлены у животных, получивших трансплантат от

доноров с пассивным типом поведения, проявляющиеся в снижении уровня спонтанной пролиферации спленоцитов, снижении чувствительности спленоцитов к Т-клеточному митогену, снижении доли апоптоза  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  клеток, находящихся в условиях обедненной культуральной среды и повышении уровня апоптоза  $CD4^+$  лимфоцитов в присутствии аCD3 или при стимуляции дексаметазоном.

Количество клеток в ткани регулируется двумя процессами – пролиферацией клеток и их физиологической гибелью (апоптозом). Оба процесса находятся в организме под контролем стимулирующих и ингибирующих факторов, в том числе цитокинов. Важное место в этих процессах принадлежит фактору некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), биологические функции которого реализуются путем взаимодействия с двумя типами специфических мембраносвязанных рецепторов. При этом взаимодействие цитокина с рецептором 1-го типа стимулирует апоптоз, а передача сигнала через рецепторы 2-го типа – клеточную пролиферацию, хотя в некоторых случаях стимуляция рецепторов 2-го типа также может приводить к апоптозу клеток [26, 27]. Нами показано, что у реципиентов двух исследуемых групп различное содержание указанного цитокина в головном мозге и селезенке, равно как и его низкая спонтанная и стимулированная митогеном продукция спленоцитами реципиентов, выросших в условиях многократной трансплантации иммуноцитов от доноров с пассивным типом поведения [28], может быть одним из механизмов низкой пролиферативной активности и сниженного апоптоза лимфоцитов у этих животных.

Выявленные особенности функциональной активности лимфоцитов указанной группы реципиентов могут также служить одним из механизмов регистрируемого у этих мышей низкого клеточного иммунного ответа, оцениваемого по высоте реакции гиперчувствительности замедленного типа [20, 25]. Принимая во внимание одностороннее действие нейроактивных стероидных гормонов на клетки иммунной и нервной систем, показанная повышенная чувствительность лимфоцитов к дексаметазону может в какой-то мере обуславливать формирующийся у этих животных преимущественно пассивный тип поведения.

Можно предполагать, что реципиенты, выросшие в условиях многократной трансплантации клеток иммунной системы с функциональными характеристиками особей с пассивным типом поведения, будут обладать сниженными резервными возможностями организма с повышенным

риском развития соматической и психической патологии, которые обусловлены сформированными к половозрелому возрасту особенностями функциональной активности основных адаптационных систем организма – иммунной и нервной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Животные, подвергнутые в ювенильный период развития многократной трансплантации иммунных клеток от сингенных доноров с оппозитивными типами поведения, в половозрелом возрасте характеризуются различными функциональными свойствами лимфоцитов селезенки. Причем наиболее выраженные изменения выявлены у животных, получивших трансплантат от доноров с пассивным типом поведения, лимфоциты которых характеризовались сниженной пролиферативной активностью, чувствительностью к Т-клеточному митогену, сниженной долей апоптоза CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> клеток, находящихся в условиях обедненной культуральной среды и повышением уровня активационного и дексаметазон-индуцированного апоптоза CD4<sup>+</sup> лимфоцитов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hildeman D., Jorgensen T., Kappler J., Marrack P. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Current Opinion in Immunology*. 2007; 19: 516–521. DOI: 10.1016/j.coi.2007.05.005/
- Kaur M., Velmurugan B., Rajamanickam S., Agarwal R., Agarwal C. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharmaceutical Research*. 2009; 26 (9): 2133–2140. DOI: 10.1007/s11095-009-9926-y.
- You B.R., Moon H.J., Han Y.H., Park W.H. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48 (5): 1334–1340. DOI: 10.1016/j.fct.2010.02.034.
- Yoon C.H., Chung S.J., Lee S.W., Park Y.B., Lee S.K., Park M.C. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine*. 2013; 80 (3): 274–279. DOI: 10.1016/j.jbspin.2012.08.010.
- You B.R., Kim S.Z., Kim S.H., Park W.H. Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2011; 357 (1–2): 295–303. DOI: 10.1007/s11010-011-0900-8.
- Riou C., Yassine-Diab B., van Grevenynghe J., Somogyi R., Greller L.D., Gagnon D., Gimmig S., Wilkinson P., Shi Y., Cameron M.J. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4<sup>+</sup> central memory T cells. *J. Exp. Med.* 2007; 204 (1): 79–91. DOI: 10.1084/jem.20061681.
- Sabbagh L., Srokowski C.C., Pulle G., Snell L.M., Sedgmen B.J., Liu Y., Watts T. A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103 (49): 18703–18708. DOI: 10.1073/pnas.0602919103.
- Tripathi P., Mitchell T.C., Finkelman F., Hildeman D.A. Cutting Edge: Limiting amounts of IL-7 do not control contraction of CD4<sup>+</sup> T cell responses. *The Journal of Immunology*. 2007; 178 (7): 4027–4031. DOI: 10.4049/jimmunol.178.7.4027.
- Adams J.M., Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*. 2007; 19 (5): 488–496. DOI: 10.1016/j.coi.2007.05.004.
- Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E., Swanson P.E. Cell death. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361 (16): 1570–1583. DOI: 10.1056/NEJMr0901217.
- Szegezdi E., MacDonald D.C., Ní Chonghaile T., Gupta S., Samali A. Bcl-2 family on guard at the ER. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2009; 296 (5): C941–953. DOI: 10.1152/ajpcell.00612.2008.
- Mérino D., Giam M., Hughes P.D., Siggs O.M., Heger K., O'Reilly L.A., Bouillet P. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *The Journal of Cell Biology*. 2009; 186 (3): 355–362. DOI: 10.1083/jcb.200905153.
- Литвинова Л.С., Тодосенко Н.М., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Юрова К.А. Клеточные реакции CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на дексаметазон в норме и при ревматоидном артрите в системе *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 207–219. [Litvinova L.S., Todosenko N.M., Khaziakhmatova O.G., Malinina I.P., Yurova K.A. Cellular reactions of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-lymphocytes on dexamethasone in healthy patients and patients with rheumatoid arthritis *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 207–219 (in Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-207-219.
- Markova E.V., Knyazeva M.A., Kozlov V.A. Immune parameters in mice with aggressive- and depressive-like behavior. In: Applied and Fundamental Studies; Proceedings of the 1st International Academic Conference. Ed. by Yan Maximov. 2012, 21–27.
- Viveros M.P., Fernandes B., Guayerbas N., Fuente M.D. Behavioral characterization of mouse model of premature immunosenescence. *J. Neuroimmunol.* 2001; 114 (1–2): 80–88. DOI: 10.1016/S0165-5728(00)00457-4.
- Poveshchenko A.F., Markova E.V., Korotkova N.A., Yakushenko E.V., Abramov V.V., Kozlov V.A. Cytokine gene expression in cerebral hemispheres and behavioral reactions of (CBA/C57Bl) F1 mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2002; 133 (1): 65–67.
- Маркова Е.В., Княжева М.А., Рюмина Т.В., Козлов В.А. Особенности функционирования клеток иммунной

- системы у особей с агрессивно- и депрессивноподобным типами поведения. *В мире научных открытий*. 2014; 8 (56): 131–147. [Markova E.V., Knyazheva M.A., Ryumina T.V., Kozlov V.A. Functional peculiarities of immune cells in animals with aggressive- and depressive-like types of behavior. *In the World of Scientific Discoveries*. 2014; 8 (56): 131–147 (in Russ.)].
18. Markova E.V., Abramov V.V., Ryabicheva T.G., Kozlov V.A. Effect of transplantation of splenic lymphoid cells on functional activity of the immune and nervous system in experimental animals. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009; 147 (4): 453–457.
19. Маркова Е.В., Абрамов В.В., Козлов В.А. Регуляция ориентировочно-исследовательского поведения у животных путем трансплантации иммунокомпетентных клеток. *Успехи современной биологии*. 2009; 129 (4): 348–354. [Markova E.V., Abramov V.V., Kozlov V.A. Regulation of Exploratory Behavior in Animals by Transplantation of Immunocompetent Cells. *Advances In Current Biology*. 2009; 129 (4): 348–354 (in Russ.)].
20. Маркова Е.В. Механизмы нейроиммунных взаимодействий в реализации поведенческих реакций. Красноярск: Научно-инновационный центр; 2012: 235. [Markova E.V. Mechanisms of neuroimmune interactions in behavior expression. Krasnoyarsk: Publishing House Science and Innovation Center Publ., 2012: 236 (in Russ.)].
21. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991: 399. [Buresh Ya., Bureshova O., Houston J.P. Methods and Basic experiments in Studies of the Brain and Behavior. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1991: 399 (in Russ.)].
22. Ader R. Psychoneuroimmunology. University of Chicago Press; 2007: 1: 1269.
23. Straub R.H., Cutolo M. Psychoneuroimmunology-developments in stress research. *Wien Med. Wochenschr*. 2018; 168 (3–4): 76–84. DOI: 10.1007/s10354-017-0574-2.
24. Rotenberg V.S. Search activity concept: relationship between behavior, health and brain functions. *Activitas Nervosa Superior*. 2009; 51 (1): 12–44. DOI: 10.1007/BF03379921.
25. Маркова Е.В., Аникеева О.С. Влияние иммунокомпетентных клеток на формирование поведенческого стереотипа в онтогенезе. *В мире научных открытий*. Серия Б. 2015; 2 (62): 154–170. [Markova E.V., Anikeeva O.S. Immune cells influence on the behavioral stereotypes formation in ontogenesis. *In the World of Scientific Discoveries*. Series B. 2015; 2 (62): 154–170 (in Russ.)].
26. Cabal-Hierro L., Lazo P.S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*. 2012; 24 (6): 1297–1305. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006.
27. Cabal-Hierro L., Artime N., Iglesias J., Prado M.A., Ugarte-Gil L., Casado P., Fernández-García B., Darnay B.G., Lazo P.S. A TRAF2 binding independent region of TNFR2 is responsible for TRAF2 depletion and enhancement of cytotoxicity driven by TNFR1. *Oncotarget*. 2014; 5 (1): 224–236.
28. Аникеева О.С., Маркова Е.В. Содержание цитокинов и нейростероидных гормонов у животных после многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками. *Российский иммунологический журнал*. 2018; 12 (4): 602–605. [Anikeeva O.S., Markova E.V. Level of cytokines and neurosteroid hormones in animals after multiple transplantation of immune cells with certain functional characteristics. *Russian J. of Immunology*. 2018; 12 (4): 602–605 (in Russ.)].

## Сведения об авторах

Маркова Евгения Валерьевна, д-р мед. наук, зав. лабораторией нейроиммунологии, гл. науч. сотрудник, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Аникеева Ольга Сергеевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория нейроиммунологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Савкин Иван Владимирович, науч. сотрудник, лаборатория нейроиммунологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный консультант НИИФКИ, г. Новосибирск.

(✉) Маркова Евгения Валерьевна, e-mail: evgeniya\_markova@mail.ru.

## Authors information

Markova Evgeniya V., DM, Head of the Neuroimmunology Laboratory, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Anikeeva Olga S., Junior Researcher, Neuroimmunology Laboratory, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Savkin Ivan V., Researcher, Neuroimmunology Laboratory, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Consultant of the RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) Markova Evgeniya V., e-mail: evgeniya\_markova@mail.ru.

Поступила в редакцию 07.06.2018  
Подписана в печать 14.12.2018

Received 07.06.2018  
Accepted 14.12.2018

## О возможности омегоэлектроэнцефалографии в оценке функционального и метаболического состояния нервной ткани головного мозга при гипервентиляции

Мурик С.Э.

*Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1*

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы** – исследовать возможности нового электрофизиологического метода омегоэлектроэнцефалографии в оценке изменений функционального и метаболического состояния клеток нервной ткани головного мозга в процессе адаптации к ишемии.

**Материал и методы.** Ишемия головного мозга моделировалась с помощью гипервентиляционной пробы (ГП). Проведены регистрация и анализ содружественных изменений уровня постоянного потенциала (УПП) и электроэнцефалограммы в 38 отведениях у одного и того же испытуемого в процессе четырехкратного повторения ГП.

**Результаты.** Ишемическое состояние головного мозга, формирующееся в процессе волевой гипервентиляции, первоначально сопровождалось негативизацией УПП (0,5–1 мВ) и увеличением амплитуды ритмов ЭЭГ всех диапазонов. После прекращения ГП и возвращения УПП к исходному уровню развивалась следовая позитивизация УПП (около 1 мВ), сочетающаяся также с повышенной амплитудой ритмов ЭЭГ. Адаптация к гипоксии и ишемии, моделируемая повторением ГП, и повышение резистентности мозга к данным неблагоприятным факторам проявились сначала в появлении кратковременного электропозитивного отклонения УПП на старте пробы и редукции следовой позитивизации УПП, а затем в полной замене в течение всей пробы электронегативного ответа на позитивный (около 0,5 мВ).

**Заключение.** Анализ характера содружественных изменений УПП и ЭЭГ в процессе гипервентиляции и после нее, а также литературных данных позволяет предполагать, что первоначально в ответ на ГП в неокортексе развивается деполяризация клеток нервной ткани, сочетающаяся с усилением нейрональной активности. Активация компенсаторных механизмов, приводящая к повышению устойчивости клеток нервной ткани к условиям ишемии, сопровождается развитием после ишемической деполяризации следовой гиперполяризации, а само повышение адаптационных возможностей клеток мозга проявляется в замене деполяризации клеточных мембран в ответе на неблагоприятный фактор гиперполяризацией, сочетающейся также с повышенной нейрональной активностью.

**Ключевые слова:** омегоэлектроэнцефалография, омегоЭЭГ, гипервентиляционная ишемия, гипервентиляционная проба, гипервентиляция, уровень постоянного потенциала, ЭЭГ, функциональное состояние, метаболическое состояние.

**Конфликт интересов.** Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Автор заявляет об отсутствии финансирования при проведении исследования.

**Благодарности.** Эта работа стала возможна благодаря финансовой поддержке Европейской программы Эразмус Мундус (Triple2009212) и профессору Уолтеру Паулюсу (W. Paulus, Department of Clinical Neurophysiology, University of Getttingen, Германия).

---

✉ Мурик Сергей Эдуардович, e-mail: sergey\_murik@mail.ru.



Для цитирования: Мурик С.Э. О Возможности омегаэлектроэнцефалографии в оценке функционального и метаболического состояния нервной ткани головного мозга при гипервентиляции. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 127–145. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-127–145](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-127-145).

УДК 616.831-018.8-073.97

[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-127–145](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-127-145)

## About the use of omega-electroencephalography to estimate functional and metabolic state of nervous tissue of the brain during hyperventilation

Murik S.E.

*Irkutsk State University*

*1, K. Marx Str., Irkutsk, 664003, Russian Federation*

### ABSTRACT

**Objectives.** The aim of this study was to investigate diagnostic capabilities of a new electrophysiological method of omega-electroencephalography in the estimation of change in functional and metabolic state of the cells of nervous tissue during ischemic adaptation.

**Materials and methods.** Brain ischemia was modeled based on a hyperventilation test (HVT). Recording and analysis were made on concomitant changes in direct current potential level (DCPL) and EEG in 38 derivations for the same test person in a fourfold-replicated HVT.

**Results.** Brain ischemia that occurs during volitional hyperventilation was initially followed by DCPL negativation (negative shift) (0.5–1 mV) and increase in amplitude of all EEG waves. Cessation of HVT and return to initial DCPL were followed by positivation (positive shift) of DCPL (about 1 mV), combined also with high-amplitude EEG waves. Adaptation to hypoxia and ischemia, modeled using replication-based HVT, and improvement of brain resistance to these unfavorable factors manifested themselves first in a short-term electropositive deviation of DCPL at the start of the test followed by DCPL positivation reduction and then in complete substitution of electronegative response to positive shift in DCPL (about 0.5 mV) during the test.

**Conclusion.** The analysis of concomitant changes in DCPL and EEG during and after hyperventilation and literature data analysis suggests that HVT was initially responded to by depolarization in neocortical nerve cells, combined with intensification of neuronal activity. Activation of compensatory mechanisms, resulting in improvement of nerve cell resistance to ischemic conditions, is associated with ischemic depolarization followed by hyperpolarization, and enhancing adaptive capabilities of brain cells manifest themselves in substitution of cell membrane depolarization to hyperpolarization in response to unfavorable factor, also combined with intense neuronal activity.

**Key words:** omega-electroencephalography, omega-EEG, hyperventilation ischemia, hyperventilation test, hyperventilation, direct current potential level, EEG, functional state, metabolic state.

**Conflict of interest.** The author declares the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** The author states that there is no funding for the study.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the ethics committee under National Research Ogarev Mordovia State University (Protocol No. 53 of 17.04.2015).

**Acknowledgements.** This work was made possible owing to the financial support of the European Program Erasmus Mundus (Triple2009212) and Professor Walter Paulus (W. Paulus, Department of Clinical Neurophysiology, University of Gettingen, Germany).

**For citation:** Murik S.E. About the use of omega-electroencephalography to estimate functional and metabolic state of nervous tissue of the brain during hyperventilation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 127–145. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-127-145>.

## ВВЕДЕНИЕ

Омегаэлектроэнцефалография – новый макроелектродный метод регистрации и анализа биоэлектрической активности головного мозга [1–3]. Особенностью данного метода является регистрация омегаэлектроэнцефалограммы (омегаЭЭГ) – суммарной электрической активности мозга в диапазоне частот 0–100 Гц. Примененный нами метод обработки омегаЭЭГ позволил получить данные о содружественных изменениях уровня постоянного потенциала (УПП) головного мозга и классической электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Метод был апробирован на крысах на моделях ишемии головного мозга разной тяжести [4], введении нейропротекторных средств [1, 2], а также при формировании мотивационно-эмоционального состояния типа страха [5] и продемонстрировал высокие диагностические возможности в оценке функционального и метаболического состояния клеток нервной ткани. На людях данный метод был испытан на моделях волевой гипер- и гиповентиляции легких [6] и показал возможность дифференцировать качественные отличия метаболического и функционального состояния клеток нервной ткани, развивающееся в условиях данных проб, что неспособна делать классическая электроэнцефалография или какой-либо другой неинвазивный метод. Данный способ оценки функционального и метаболического состояния нервной ткани головного мозга защищен двумя патентами [7, 8].

Одной из актуальных проблем неврологии сегодня остается раннее выявление ишемических явлений в нервной ткани. Развитие ишемических процессов, связанных с ухудшением функционального и метаболического состояния головного мозга, сопровождается неоднозначными изменениями ЭЭГ [9]. Ишемические процессы могут проявляться как в повышении мощности всех ритмов ЭЭГ [4, 10] либо в повышении только медленных ритмов [11], так и в возрастании в медленноволновой, но снижении в альфа- и бета-активности [12] или в возрастании амплитуды альфа- и бета-ритмов [13, 14], а также

при определенных условиях и в общей депрессии ЭЭГ-ритмов [15]. Разные виды ЭЭГ ответов на ишемические условия могут быть связаны с разной тяжестью создаваемой ишемии, но выстроить их в упорядоченный ряд в зависимости от степени ишемии сегодня не представляется возможным. Многие из указанных ЭЭГ-паттернов могут быть также и в условиях, далеких от ишемических, связанных с нормальной психической деятельностью, с нахождением, например, в мотивационно-эмоциональных состояниях или приемом фармакологических средств [2, 4]. В итоге использование только ЭЭГ не позволяет однозначно обнаруживать ишемические явления в мозге, особенно на ранних стадиях.

Одной из моделей относительно слабой ишемии может быть гипервентиляционная проба [16, 17]. Гипервентиляция, как известно [6, 18], снижает уровень углекислого газа в крови и вызывает явление гипокании и алкалоза, а это, в свою очередь, приводит по механизму метаболической саморегуляции к сужению мозговых сосудов и уменьшению мозгового кровотока.

Цель настоящей работы – исследование содружественных изменений УПП и ЭЭГ в процессе адаптации к условиям гипервентиляционной ишемии (ГИ) и оценка диагностических возможностей омегаэлектроэнцефалографии для выявления происходящих при этом функциональных и метаболических явлений в нервной ткани головного мозга.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Техника регистрации омегаЭЭГ у человека во время гипервентиляции была апробирована нами ранее на шести испытуемых и подробно описана [6]. Один из испытуемых в возрасте 51 года был использован в тех экспериментах с гипервентиляционной пробой несколько раз. Данные этих экспериментов и представлены в настоящей статье.

### *Техника регистрации омегаЭЭГ*

Регистрация омегаЭЭГ проводилась по униполярной методике с помощью компьютерного 64-канального электроэнцефалографа на уси-

телях постоянного тока фирмы ANT (asa-lab EEG system, Голландия). Биоэлектрические данные оцифровывались со скоростью 512 Гц. Индифферентные электроды крепились к мочкам ушей. Для регистрации омегаЭЭГ использовались стандартные Ag/AgCl электроды, вмонтированные в ЭЭГ шлем, поставляемый фирмой-изготовителем вместе с ЭЭГ-системой (ANT, Голландия). Регистрацию омегаЭЭГ осуществляли от 38 электродов, расположенных по системе 5–10 в следующих отведениях: Fp1, Fp2, Fz, F3, F4, F7, F8, FCz, FC1, FC2, FC3, FC4, FC5, FC6, Cz, C1, C2, C3, C4, C5, C6, T7, T8, CPz, CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6, Pz, P3, P4, P7, P8, Oz, O1, O2.

Запись омегаЭЭГ начиналась сразу после измерения импеданса и осуществлялась на протяжении всего эксперимента, занимавшего около 2 ч и включавшего несколько этапов. В течение всего времени эксперимента испытуемый находился в ЭЭГ-кресле, а его голова опиралась на головодержатель. На первом этапе длительностью 1 ч и именуемом этапом «спокойного бодрствования» испытуемый должен был приспособиться к обстановке эксперимента. В течение первых 10–15 мин испытуемый получал инструкцию о ходе эксперимента и особенностях поведения. В течение главной части эксперимента, включавшей функциональные пробы, он не должен разговаривать и стараться совершать каких-либо движений конечностями, головой и телом. Говорить можно было только в крайнем случае, если ему становилось плохо. Перед началом регистрации омегаЭЭГ перед испытуемым на стене на расстоянии 2 м помещалась мишень в виде небольшого креста (4 × 4 см), нарисованного на листе бумаги формата А4. Во время главной части эксперимента испытуемый должен был стараться смотреть на мишень и ограничить поле зрения площадью листа бумаги.

### *Функциональные пробы*

В главной части эксперимента по команде экспериментатора испытуемый должен был начать совершать глубокие дыхательные движения с частотой 30 в минуту. Частота дыхания задавалась командами экспериментатора: «Вдох» и «Выдох». Общая длительность гипервентиляции могла составлять 1 или 3 мин.

Всего было проведено четыре эксперимента в три опытных дня. В первый опытный день испытуемый выполнил две 3-минутные гипервентиляционные пробы с интервалом в 30 мин. Третья гипервентиляционная проба длительностью 1 мин была проведена спустя 3 сут после первых двух,

а четвертая длительностью 1 мин – спустя 4 сут после третьей.

### *Обработка омегаЭЭГ*

Для получения данных о содружественных изменениях УПП и ЭЭГ использовалась нативная омегаЭЭГ, содержащая постоянный потенциал головного мозга и его колебания в диапазоне 0,016–205 Гц. Для получения информации о посекундных значениях УПП с помощью специальной программы проводилось усреднение амплитудных значений нативной омегаЭЭГ за секундные промежутки времени. Для получения информации об амплитуде ритмов ЭЭГ за эти же промежутки времени всю нативную омегаЭЭГ с помощью программы BrainVision Analaser (Brain Products GmbH, Германия) разбивали на 1-секундные интервалы и с помощью быстрого преобразования Фурье получали посекундные значения спектра мощности ритмов в четырех диапазонах: дельта (0,5–4 Гц), тета (4–8), альфа (8–12) и бета (12–30 Гц). В результате такой первичной обработки исходной омегаЭЭГ мы имели данные за каждую секунду времени как об амплитуде ритмов ЭЭГ в четырех частотных диапазонах, так и о величине УПП.

Для дальнейшей обработки из такой комплексной омегаЭЭГ, содержащей посекундные данные об УПП и ЭЭГ, вырезались участки, имевшие место к функциональным пробам. Для последующего анализа и графического представления данных брался непрерывный участок, включающий 3-минутный период, предшествовавший началу ГП, 1- или 3-минутный период гипервентиляции и 5–20-минутный период, следовавший после окончания пробы. Значение УПП в начале 3-минутного периода, предшествовавшего пробе, принималось за ноль.

### *Статистическая обработка данных*

Для статистической оценки влияния функциональных проб на УПП и ЭЭГ посекундные значения УПП и амплитуды ритмов ЭЭГ усредняли за 30-секундную эпоху, предшествовавшую началу функциональным пробам. Полученные значения принимали за исходные, с которыми сопоставляли значения УПП и амплитуды ритмов ЭЭГ за 15- или 30-секундные эпохи во время гипервентиляции, а также после нее.

Обработку данных осуществляли первоначально по отдельным отведениям, затем усредняли по всем отведениям. Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – стандартная ошибка. Математическая и статистическая обработка данных осуществлялась

в программе Microsoft Excel. Достоверность различий оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента, а также с помощью T-критерия Вилкоксона для зависимых и независимых выборок. При множественном сравнении использовалась поправка Холма – Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Гипервентиляция I

Усредненная по 38 каналам содружественная динамика УПП и амплитуды ритмов ЭЭГ во время первой 3-минутной гипервентиляционной пробы показана на рис. 1. Видно, что с самого старта пробы началась негативизация УПП, которая достигла своего максимума через  $(91,6 \pm 4,2)$  с и составила  $(396,7 \pm 38,0)$  мкВ ( $p < 0,01$ ). В отдельных отведениях негативизация приближалась к 900 мкВ и более (например, в отведении F4 составила 972 мкВ, в P8 – 941 мкВ, в O2 – 886 мкВ). Параллельно негативизации УПП происходило изменение также и амплитуды ритмов ЭЭГ (табл. 1). В течение первых 30 с достоверное увеличение амплитуды было только в бета-диапазоне и составило 24% ( $p < 0,001$ ). К 90-й с пробы, когда наступила максимальная негативизация УПП, увеличение амплитуды всех ритмов стало достоверным (см. табл. 1). Если УПП после достижения максимальной негативизации в последующие 90 с гипервентиляции мало менялась, или отмечалась даже небольшая тенденция к его позитивизации, то амплитуда ритмов ЭЭГ продолжала возрастать и достигла своего максимума к 120–150-й с пробы, когда увеличение для дельта-ритма составило 192% ( $p < 0,001$ ), для тета-ритма – 344% ( $p < 0,001$ ), альфа-ритма – 224% ( $p < 0,001$ ) и 92% для бета-ритма ( $p < 0,001$ ). В последние 30 с пробы амплитуда ЭЭГ ритмов немного упала, но оставалась существенно больше, чем до начала пробы.

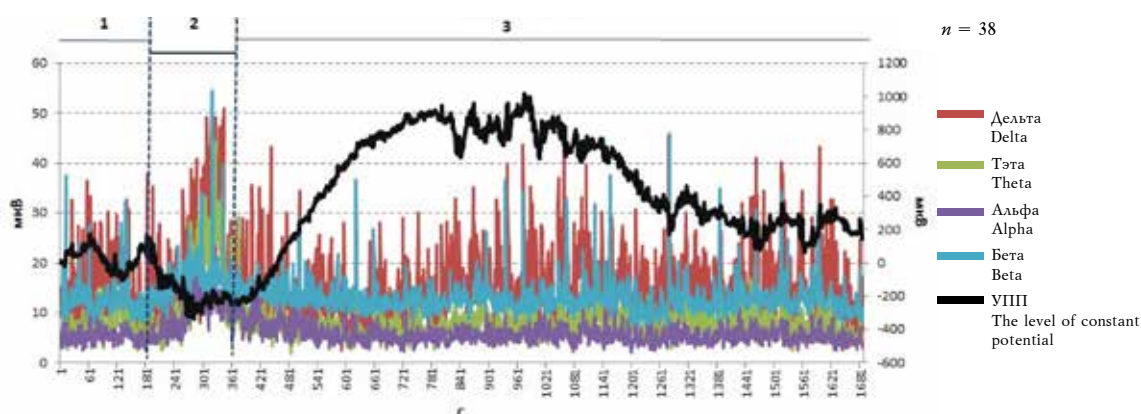


Рис. 1. Изменения УПП и амплитуды ЭЭГ в разных частотных диапазонах, усредненные по всем отведениям: 1 – до 1-минутной гипервентиляции I, 2 – во время; 3 – после 1-минутной гипервентиляции I. Здесь и на рис. 2–4: на левой оси ОУ – амплитуда ритмов ЭЭГ, на правой – УПП

Fig. 1. Changes in the level of constant potential and EEG amplitude in different frequency ranges, averaged over all leads: 1 – before 1-minute hyperventilation I, 2 – during; 3 – after 1-minute hyperventilation I. Here and in fig. 2–4: on the left axis OY – the amplitude of EEG rhythms, on the right – the level of constant potential

Таблица 1  
Table 1

Амплитуда ЭЭГ по всем отведениям в разных частотных диапазонах за 30-секундные эпохи до, во время и после гипервентиляции I, мкВ, $M \pm m$ , $n = 38$								
EEG amplitude over all leads in different frequency ranges for 30-second epochs before, during and after hyperventilation I, $\mu V$ , $M \pm m$ , $n = 38$								
Время, с Time, s	Дельта Delta	%	Тэта Theta	%	Альфа Alpha	%	Бета Beta	%
До пробы, 30 30 s before testing	$11,4 \pm 0,75$	100	$5,9 \pm 0,35$	100	$4,5 \pm 0,19$	100	$10,4 \pm 0,29$	100
Гипервентиляция I Hyperventilation I								
1–30	$16,0 \pm 1,48$	140	$5,9 \pm 0,36$	100	$5,0 \pm 0,18$	112	$12,9 \pm 0,34^{***}$	124

Окончание табл. 1

End of table 1

Время, с Time, s	Дельта Delta	%	Тэта Theta	%	Альфа Alpha	%	Бета Beta	%
31–60	14,3 ± 0,81	125	6,7 ± 0,41	114	6,6 ± 0,33***	148	14,8 ± 0,51***	142
61–90	17,6 ± 1,31**	154	8,8 ± 0,84***	150	8,4 ± 0,53***	188	17,0 ± 0,58***	163
91–120	25,3 ± 1,57***	221	20,9 ± 0,82***	356	14,5 ± 0,56***	324	20,0 ± 0,82***	192
121–150	33,4 ± 2,16***	292	26,1 ± 0,95***	444	12,2 ± 0,43***	273	18,6 ± 1,31***	179
151–180	26,7 ± 2,40***	233	18,7 ± 1,61***	318	11,4 ± 0,52***	255	16,7 ± 0,88***	161

После гипервентиляции

After hyperventilation

1–30	15,8 ± 1,16*	138	9,8 ± 0,83***	167	10,4 ± 0,48***	232	15,1 ± 0,30***	145
31–60	16,5 ± 1,27*	144	7,9 ± 0,32***	134	9,4 ± 0,48***	210	15,2 ± 0,36***	146
61–90	16,0 ± 1,46	140	7,8 ± 0,38**	132	7,1 ± 0,27***	158	14,4 ± 0,27***	138
91–120	14,0 ± 0,92	123	7,0 ± 0,35	119	7,4 ± 0,33***	164	14,5 ± 0,46***	140
121–150	11,9 ± 1,07	104	6,2 ± 0,36	106	7,6 ± 0,5***	169	14,1 ± 0,78***	136
151–180	11,9 ± 0,78	104	6,1 ± 0,27	104	6,8 ± 0,4***	152	13,8 ± 0,46***	133
181–210	14,7 ± 0,91	129	7,1 ± 0,29	120	5,4 ± 0,24*	121	12,4 ± 0,26***	119
211–240	13,1 ± 0,86	114	6,8 ± 0,52	115	5,6 ± 0,31*	125	13,4 ± 0,52***	129
241–270	9,9 ± 1,02	86	5,6 ± 0,42	96	5,0 ± 0,26	113	13,5 ± 0,93**	130
271–300	11,4 ± 0,91	99	5,8 ± 0,31	99	4,9 ± 0,91	109	12,0 ± 0,62**	116
301–330	13,6 ± 0,88	119	6,9 ± 0,39	118	5,4 ± 0,24	121	12,2 ± 0,23*	117

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (в сравнении с исходными значениями, здесь и в табл. 2–4).\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (compared to baseline values, here and in Tables 2–4).

После окончания пробы с латентным периодом около 30 с началось возвращение УПП к исходному уровню, что заняло примерно 100 с, однако мощность ритмов в большинстве диапазонов в это время оставалась еще по-прежнему достоверно больше, чем до начала пробы. Позитивизация УПП не прекратилась и после достижения исходного уровня, т.е. предшествовавшего гипервентиляции, а продолжилась и достигла своего максимума через (391,4 ± 17,7) с (примерно 6,5 мин) после окончания гипервентиляционной пробы, когда составила (1014,1 ± 89,6) мкВ относительно уровня, предшествовавшего пробе ( $p < 0,001$ ). В момент достижения следовой позитивизацией максимальной величины амплитуда ЭЭГ ритмов оставалась повышенной, особенно в быстроволновой части (см. табл. 1). Спустя примерно 6,5 мин после окончания пробы амплитуда альфа-ритма оставалась больше на 21% ( $p < 0,01$ ), а бета-ритма на 17% ( $p < 0,001$ ) по сравнению со значениями, предшествовавшими пробе. Общая же длительность следовой позитивизации УПП составила около 16 мин. На протяжении всего этого времени амплитуда ЭЭГ оставалась повышенной, особенно на быстрых частотах.

### Гипервентиляция II

Динамика УПП и амплитуды ритмов ЭЭГ во время второй гипервентиляционной пробы длительностью 3 мин имела некоторые отличия (рис. 2).

Так, негативизация УПП началась не сразу, а спустя примерно 30 с. Более того, в первые 30 с имела место даже небольшая достоверная позитивизация УПП на (127,1 ± 13,5) мкВ ( $p < 0,01$ ). Затем наступил период быстрой негативизации УПП, которая достигла своего максимума примерно через 60 с от начала гипервентиляции и составила (603,8 ± 55,8) мкВ ( $p < 0,01$ ). Негативизация УПП во время второй пробы была достоверно больше, чем в первой ( $p < 0,01$ ). Изменения ЭЭГ в течение второй гипервентиляционной пробы были следующими: в первые 15 с, когда имела место небольшая позитивизация УПП, достоверные изменения наблюдались только в одном частотном диапазоне, а именно на 18% увеличилась амплитуда бета-ритма ( $p < 0,05$ ). В течение 60 с, совпадающих с периодом быстрой негативизации УПП, амплитуда ЭЭГ была увеличенной в бета-диапазоне на 27% ( $p < 0,001$ ) и альфа-диапазоне на 25% ( $p < 0,001$ ). В тета-диапазоне она, напротив, в это время достоверно снизилась на 29% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с периодом, предшествовавшим гипервентиляционной пробе (табл. 2).

В течение второй гипервентиляционной пробы УПП, достигнув максимальной негативизации к середине пробы, в следующие 90 с имел отчетливую тенденцию к позитивизации еще во время пробы (см. рис. 2), сочетающуюся с повышением амплитуды ритмов ЭЭГ во всех частотных диапазонах (см. табл. 2).

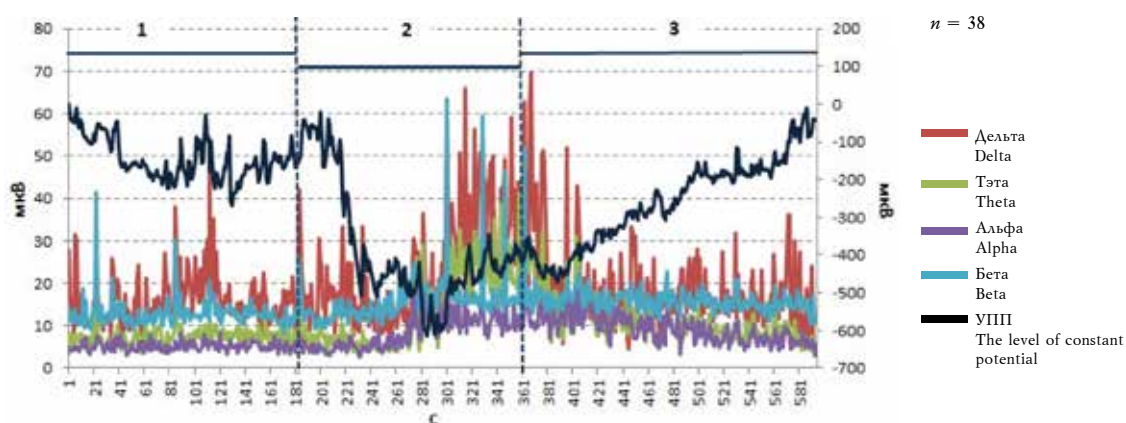


Рис. 2. Изменения УПП и амплитуды ЭЭГ в разных частотных диапазонах, усредненные по всем отведениям: 1 – до 3-минутной гипервентиляции II, 2 – во время; 3 – после 3-минутной гипервентиляции II

Fig. 2. Changes in the level of constant potential and EEG amplitude in different frequency ranges, averaged over all leads: 1 – before 3-minute hyperventilation II, 2 – during; 3 – after 3-minute hyperventilation II

Таблица 2  
Table 2

Амплитуда ЭЭГ по всем отведениям в разных частотных диапазонах за 30-секундные эпохи до, во время и после гипервентиляции II, мкВ, $M \pm m$ , $n = 38$								
EEG amplitude in all leads in different frequency ranges for 30-second epochs before, during and after hyperventilation II, $\mu V$ , $M \pm m$ , $n = 38$								
Время, с Time, s	Дельта Delta	%	Тэта Theta	%	Альфа Alpha	%	Бета Beta	%
30 с до пробы 30 s before testing	$14,1 \pm 0,73$	100	$7,5 \pm 0,34$	100	$4,9 \pm 0,18$	100	$11,9 \pm 0,28$	100
Гипервентиляция II, с Hyperventilation II, s	1–30	$17,7 \pm 1,34$	126	$7,2 \pm 0,60$	97	$4,7 \pm 0,21$	95	$12,4 \pm 0,60$
	31–60	$16,4 \pm 1,21$	116	$6,2 \pm 0,35^*$	83	$5,0 \pm 0,21$	102	$13,2 \pm 0,30^{**}$
	61–90	$11,8 \pm 0,62$	83	$5,3 \pm 1,4^{***}$	71	$6,1 \pm 0,32^{**}$	125	$15,0 \pm 0,54^{***}$
	91–120	$22,0 \pm 1,95^{**}$	156	$14,4 \pm 1,59^{***}$	192	$12,1 \pm 0,66^{***}$	247	$19,8 \pm 1,59^{***}$
	121–150	$35,5 \pm 2,12^{***}$	251	$24,8 \pm 0,89^{***}$	331	$11,8 \pm 0,47^{***}$	242	$17,8 \pm 1,46^{***}$
	151–180	$35,1 \pm 1,97^{***}$	249	$23,7 \pm 1,23^{***}$	316	$11,1 \pm 0,44^{***}$	228	$16,9 \pm 1,07^{***}$
После гипервентиляции, с After hyperventilation, s	1–30	$30,4 \pm 3,10^{***}$	215	$19,7 \pm 1,34^{***}$	264	$12,0 \pm 0,49^{***}$	245	$17,3 \pm 1,24^{***}$
	31–60	$19,2 \pm 1,87$	136	$15,3 \pm 1,13^{***}$	204	$13,2 \pm 0,58^{***}$	271	$17,4 \pm 0,43^{***}$
	61–90	$16,6 \pm 1,41$	118	$11,1 \pm 0,51^{***}$	149	$10,6 \pm 0,47^{***}$	216	$16,2 \pm 0,36^{***}$
	121–150	$16,0 \pm 0,69$	113	$9,7 \pm 0,54^{**}$	130	$9,1 \pm 0,45^{***}$	186	$15,9 \pm 0,46^{***}$
	151–180	$18,5 \pm 0,90^{**}$	131	$9,7 \pm 0,35^{***}$	130	$8,5 \pm 0,44^{***}$	173	$15,8 \pm 0,35^{***}$
	181–210	$15,6 \pm 0,86$	111	$8,3 \pm 0,32$	111	$7,0 \pm 0,34^{***}$	142	$15,2 \pm 0,37^{***}$
	211–240	$16,5 \pm 1,11$	117	$8,6 \pm 0,39$	115	$6,9 \pm 0,29^{***}$	141	$14,8 \pm 0,31^{***}$
	241–270	$14,0 \pm 1,60$	99	$6,1 \pm 0,39$	82	$5,9 \pm 0,23^{**}$	121	$14,4 \pm 0,39^{***}$

Так, максимальное возрастание амплитуды альфа- и бета-ритма произошло к 120-й с (142%,  $p < 0,001$  и 67%,  $p < 0,001$  соответственно), а дельта- и тета-ритма – к 150-й с (151%,  $p < 0,001$  и 231%,  $p < 0,001$  соответственно).

После окончания второй пробы, восстановление УПП началось не сразу, а спустя небольшое

время (около 30 с), когда повышенная мощность ритмов ЭЭГ сохранялась на уровне, близком к показателю, имевшемуся в конце пробы. Последующее развитие следовой позитивизации УПП проходило на фоне остаточной повышенной мощности ритмов ЭЭГ, особенно в высокочастотных диапазонах – альфа и бета (см. табл. 2).



Амплитуда и длительность следовой позитивизации УПП после второй трехминутной пробы были существенно меньшими, чем после первой.

Таким образом, основным отличием в характере содружественных изменений УПП и ЭЭГ во время второй гипервентиляционной пробы, следовавшей через 30 мин после первой, было появление сразу после старта гипервентиляции позитивного сдвига УПП. Эта позитивизация УПП сочеталась с повышением мощности бета-ритма. Сам же период негативизации УПП, начавшийся только через 30 с после старта второй пробы, сначала сопровождался разнонаправленными изменениями в амплитуде ритмов ЭЭГ: медленные ритмы (тета) уменьшились, а быстрые (бета и альфа) увеличились по амплитуде, чего не было в первой пробе, величина негативизации УПП, в конечном итоге, была почти в 2 раза больше. Особенностью изменений УПП было также то, что еще в середине второй пробы негативизация УПП сменилась на процесс его медленной позитивизации, который, однако, оборвался с прекращением пробы и вновь продолжился только спустя 30 с. Особенностью было также меньшая выраженность следовой позитивизации УПП. Таким образом, налицо изменение характера биоэлектрических показателей в ответ на условия гипервентиляции после второй пробы, которые могут быть связаны с адаптацией организма к этим условиям.

### Гипервентиляция III

Третья гипервентиляционная проба была проведена через 3 сут после первых двух. Длительность этой пробы составляла только 1 мин. Как видно из рис. 3, в начале пробы сразу наблю-

далась небольшая позитивизация УПП ( $106,1 \pm 26,3$ ) мкВ,  $p < 0,05$ , которая длилась около 15 с. Амплитуда ритмов ЭЭГ в это время достоверно увеличилась только в дельта-диапазоне на 44% ( $p < 0,01$ , табл. 3). Стартовая позитивизация затем перешла в быструю негативизацию УПП. Переходной период длился около 15 с и сочетался с достоверным повышением амплитуды ЭЭГ-ритмов в большинстве частотных диапазонов – в дельта, альфа и бета. В дельта-диапазоне максимальное увеличение амплитуды на 82% ( $p < 0,001$ , см. табл. 3) наблюдалось к 30-й с гипервентиляции, когда закончился переходной период. В альфа- и бета-диапазонах максимальное увеличение амплитуды на 43% отмечалось к концу 1-минутной пробы в том и другом случае ( $p < 0,001$ ).

Негативизация УПП достигла своего максимума к концу 60-секундной гипервентиляции и составила ( $705,2 \pm 58,3$ ) мкВ, что было близко к уровню максимальной негативизации УПП во время второй гипервентиляции, но достоверно больше, чем во время первой гипервентиляции ( $p < 0,001$ ).

Возвращение УПП к исходному уровню началось сразу после окончания 1-минутной гипервентиляции, было значительно быстрее, чем после первых двух проб и заняло около 40 с. Следовая позитивизация УПП после минутной гипервентиляции была выражена слабо (см. рис. 3). Прекращение гипервентиляции привело к быстрому восстановлению амплитуды ритмов ЭЭГ во всех диапазонах, за исключением альфа-ритма, в котором амплитуда волн оставалась повышенной еще какое-то время (см. табл. 3).

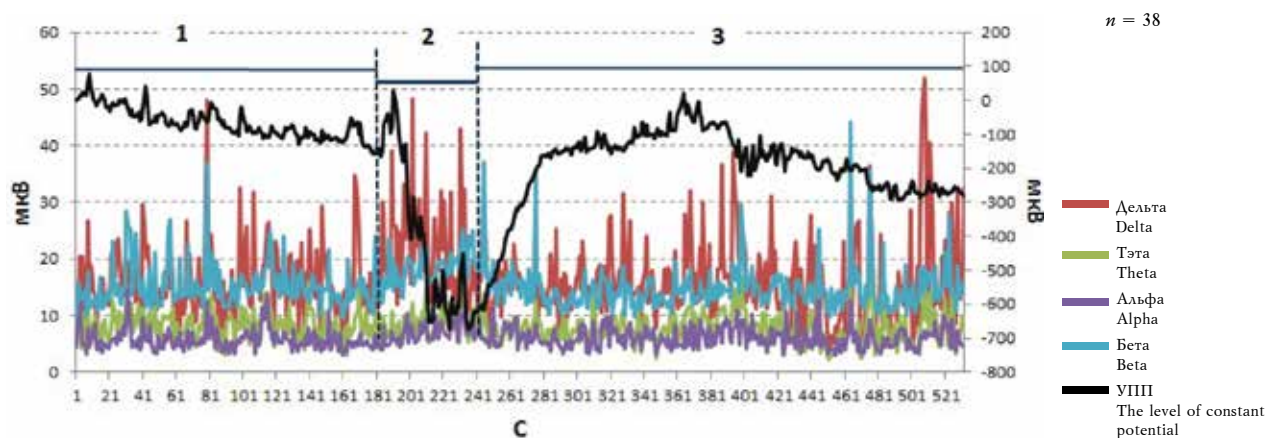


Рис. 3. Изменения УПП и амплитуды ЭЭГ в разных частотных диапазонах, усредненные по всем отведениям: 1 – до 1-минутной гипервентиляции III, 2 – во время; 3 – после 1-минутной гипервентиляции III

Fig. 3. Changes in the level of constant potential and EEG amplitude in different frequency ranges, averaged over all leads: 1 – before 1-minute hyperventilation III, 2 – during; 3 – after 1-minute hyperventilation III



Таблица 3

Table 3

Амплитуда ЭЭГ по всем отведениям в разных частотных диапазонах за 15- и 30-секундные эпохи до, во время и после гипервентиляции III, мкВ,  $M \pm m$ ,  $n = 38$

EEG amplitude in all leads in different frequency ranges for 15 and 30 second epochs before, during and after hyperventilation III,  $\mu V$ ,  $M \pm m$ ,  $n = 38$

Время, с Time, s	Дельта Delta	%	Тэта Theta	%	Альфа Alpha	%	Бета Beta	%
30 с до пробы 30 s before testing	$14,4 \pm 1,13$	100	$7,8 \pm 0,43$	100	$5,2 \pm 0,27$	100	$14,3 \pm 0,61$	100
Гипервентиляция III, с Hyperventilation III, s	1–15	$20,8 \pm 1,59^{***}$	$7,5 \pm 0,46$	96	$5,4 \pm 0,32$	102	$15,9 \pm 0,77$	111
	16–30	$26,2 \pm 2,44^{***}$	$9,1 \pm 0,59$	118	$7,2 \pm 0,40^{***}$	136	$18,4 \pm 0,55^{**}$	128
	31–45	$21,2 \pm 1,69$	$8,6 \pm 0,50$	112	$7,4 \pm 0,38^{***}$	142	$18,4 \pm 0,43^{***}$	128
	46–60	$18,8 \pm 2,22$	$8,6 \pm 0,65$	111	$7,5 \pm 0,47^{***}$	143	$20,5 \pm 0,68^{***}$	143
После гипервентиляции, с After hyperventilation, s	1–30	$15,7 \pm 0,82$	$7,6 \pm 0,46$	98	$6,4 \pm 0,33^{**}$	122	$16,3 \pm 0,82$	114
	31–60	$15,0 \pm 0,78$	$7,4 \pm 0,80$	96	$5,4 \pm 0,22$	103	$13,7 \pm 0,80$	96
	61–90	$20,6 \pm 2,18$	$8,2 \pm 0,41$	105	$6,6 \pm 0,36^{**}$	125	$14,2 \pm 0,45$	99
	91–120	$15,6 \pm 1,33$	$7,0 \pm 0,38$	91	$5,6 \pm 0,23$	107	$13,2 \pm 0,39$	92
	121–150	$18,1 \pm 1,21$	$9,4 \pm 0,31^*$	121	$6,5 \pm 0,34^{**}$	124	$14,2 \pm 0,32$	99
	151–180	$18,7 \pm 1,24$	$9,3 \pm 0,50$	120	$6,7 \pm 0,33^{**}$	128	$16,0 \pm 0,63$	112
	181–210	$13,3 \pm 1,03$	$6,1 \pm 0,49$	79	$5,8 \pm 0,43$	111	$13,9 \pm 0,51$	97
	211–240	$14,6 \pm 1,62$	$7,3 \pm 0,78$	94	$5,3 \pm 0,40$	102	$15,6 \pm 1,29$	109
	241–270	$17,7 \pm 2,31$	$7,3 \pm 0,57$	94	$5,6 \pm 0,24$	106	$14,0 \pm 0,56$	98
	271–300	$19,0 \pm 1,85$	$7,6 \pm 0,51$	98	$6,4 \pm 0,31^*$	122	$16,1 \pm 1,03$	112
	301–330	$14,4 \pm 1,01$	$7,7 \pm 0,37$	99	$6,8 \pm 0,4^*$	130	$13,7 \pm 0,46$	96
	331–360	$15,4 \pm 0,90$	$8,3 \pm 0,52$	107	$5,8 \pm 0,27$	111	$13,5 \pm 0,52$	94

### Гипервентиляция IV

Четвертая гипервентиляционная проба была проведена через 4 сут после третьей. Длительность этой пробы, как и предыдущей, составляла 1 мин. Как видно из рис. 4, в течение всей гипервентиляции наблюдалась позитивизация УПП ( $409,0 \pm \pm 69,9$ ) мкВ,  $p < 0,01$ ), сочетающаяся с достоверным повышением амплитуды ритмов во всех диапазонах. В первые 15 с гипервентиляции наибольшее усиление было у дельта-ритма (118%,  $p < 0,001$ , табл. 4). Для тета-, альфа- и бета-ритмов максимальное увеличение амплитуды было к концу пробы и равнялось 128, 151 и 73% соответственно ( $p < 0,001$  во всех случаях). По окончании 1-й мин гипервентиляции восстановление УПП произошло примерно через 90 с, когда восстановилась и амплитуда ЭЭГ в дельта- и тета-диапазонах (см. табл. 4), а вот повышенная амплитуда бета-ритма и особенно альфа- оставались такими еще на протяжении как минимум 4,5 мин.

Таким образом, особенностью четвертой гипервентиляции было замещение негативного сдвига УПП, имевшего место рано или поздно,

в течение всех предыдущих проб на позитивный. Индивидуальный анализ сдвигов УПП по отведениям показал, что в некоторых отведениях, однако, и во время четвертой гипервентиляции не произошло полного замещения негативного отклонения УПП на позитивное и это были, как правило, лобно-центральные отведения (Fp1, Fp2, Fz, F3, F4, FCz, FC1, FC2, Cz, C1, C2, CP1, CP2). Вот как, например, выглядели содружественные изменения УПП и ЭЭГ в отведении Cz (рис. 5) во время четвертой гипервентиляционной пробы.

Таким образом, многократное применение ГП привело к постепенному изменению биоэлектрического ответа головного мозга на нее. Первоначальная реакция заключалась в негативизации УПП и увеличении амплитуды ритмов ЭЭГ. Повторные пробы привели к постепенному замещению негативного отклонения УПП на позитивный, при сохранении общего характера ЭЭГ ответа в виде увеличения амплитуды ритмов. Адаптация к условиям ГИ проявилась также в уменьшении выраженности следовой позитивизации УПП головного мозга после проб.

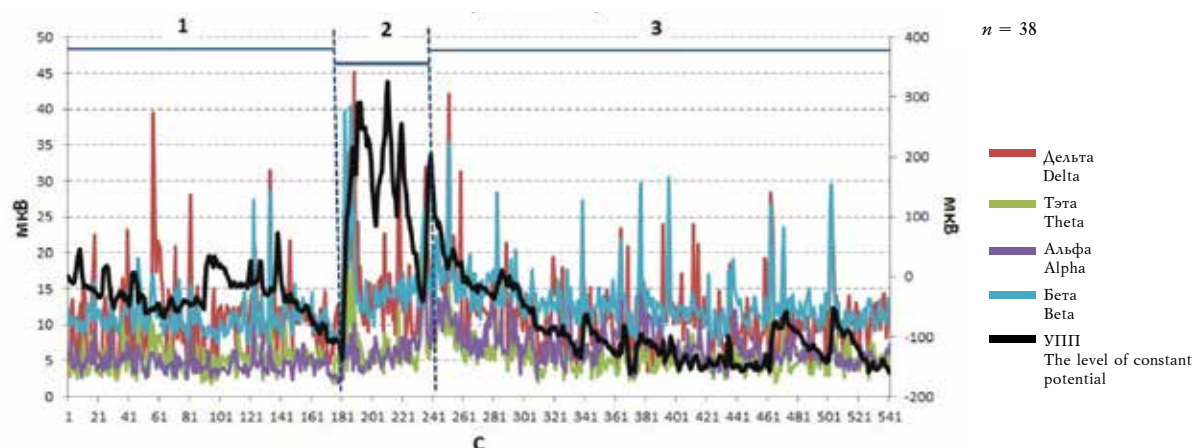


Рис. 4. Изменения УПП и амплитуды ЭЭГ в разных частотных диапазонах, усредненные по всем отведениям: 1 – до 1-минутной гипервентиляции IV, 2 – во время; 3 – после 1-минутной гипервентиляции IV

Fig. 4. Changes in the level of constant potential and EEG amplitude in different frequency ranges, averaged over all leads: 1 – before 1-minute hyperventilation IV, 2 – during; 3 – after 1-minute hyperventilation IV

Таблица 4  
Table 4

Амплитуда ЭЭГ по всем отведениям в разных частотных диапазонах за 15- и 30-секундные эпохи до, во время и после гипервентиляции IV, мкВ, $M \pm m$ , $n = 38$								
EEG amplitude over all leads in different frequency ranges for 15 and 30 second epochs before, during and after hyperventilation IV, $\mu V$ , $M \pm m$ , $n = 38$								
Время, с Time, s	Дельта Delta	%	Тэта Theta	%	Альфа Alpha	%	Бета Beta	%
30 с до пробы 30 s before testing	$9,4 \pm 0,55$	100	$4,7 \pm 0,25$	100	$4,2 \pm 0,27$	100	$10,6 \pm 0,36$	100
Гипервентиляция IV, С Hyperventilation IV, s	1–15	$20,5 \pm 2,73^{***}$	218	$9,1 \pm 1,46^{***}$	196	$5,7 \pm 0,61^*$	135	$19,8 \pm 2,33^{***}$
	16–30	$14,1 \pm 0,87^{***}$	150	$5,4 \pm 0,38$	115	$5,6 \pm 0,28^{**}$	132	$13,2 \pm 0,44^{***}$
	31–45	$13,8 \pm 1,85^*$	147	$6,1 \pm 0,52$	130	$6,7 \pm 0,37^{***}$	158	$14,7 \pm 0,39^{***}$
	46–60	$16,9 \pm 1,59^{***}$	180	$10,6 \pm 1,4^{***}$	228	$10,6 \pm 0,97^{***}$	251	$18,4 \pm 1,01^{***}$
После гипервентиляции, С After hyperventilation, s	1–30	$15,9 \pm 1,27^{***}$	169	$8,4 \pm 0,37^{***}$	180	$9,3 \pm 0,49^{***}$	219	$16,7 \pm 0,8^{***}$
	61–90	$12,4 \pm 0,66^{**}$	132	$6,3 \pm 0,61^{***}$	136	$8,5 \pm 0,45^{***}$	201	$15,1 \pm 0,61^{***}$
	91–120	$9,9 \pm 0,77$	105	$5,0 \pm 0,29$	107	$6,9 \pm 0,53^{***}$	162	$13,0 \pm 0,37^*$
	121–150	$9,3 \pm 0,84$	99	$4,7 \pm 0,27$	101	$7,1 \pm 0,31^{***}$	167	$12,8 \pm 0,58^*$
	151–180	$9,8 \pm 1,02$	104	$5,1 \pm 0,30$	109	$8,4 \pm 0,59^{***}$	198	$13,2 \pm 0,76^*$
	181–210	$12,1 \pm 0,66^*$	128	$5,6 \pm 0,26$	119	$6,4 \pm 0,27^{***}$	152	$12,7 \pm 0,71$
	211–240	$9,1 \pm 0,60$	97	$4,9 \pm 0,25$	105	$6,3 \pm 0,43^{***}$	149	$11,9 \pm 0,53$
	241–270	$11,1 \pm 1,03$	118	$5,0 \pm 0,42$	107	$6,0 \pm 0,25^{***}$	142	$12,9 \pm 0,67^*$
	271–300	$10,8 \pm 0,96$	115	$5,2 \pm 0,35$	112	$5,8 \pm 0,21^{***}$	137	$12,8 \pm 0,82$
	301–330	$10,9 \pm 0,42$	116	$5,1 \pm 0,23$	110	$5,1 \pm 0,19^*$	121	$11,2 \pm 0,26$

Проведенное нами исследование также показало возможность разных сочетаний содружественных изменений УПП и ЭЭГ при ГП и после нее. Во время гипервентиляции могла наблюдаться негативизация УПП, сочетающаяся с повышением ам-

плитуды ритмов ЭЭГ во всех частотных диапазонах (гипервентиляция I и II); негативизация УПП, сочетающаяся с повышением амплитуды ритмов ЭЭГ во всех частотных диапазонах кроме тета-ритма (гипервентиляция III); позитивизация УПП,

сочетающаяся с повышением мощности только бета-ритма (гипервентиляция II); позитивизация УПП, сочетающаяся с повышением мощности ритмов во всех частотных диапазонах (гипервентиляция IV). Переход от стартовой позитивизации к

негативизации во время ГП (гипервентиляция II) мог также сочетаться с разнонаправленными изменениями в амплитуде ЭЭГ-ритмов: понижением амплитуды медленных (тета-) и повышением быстрых (альфа- и бета-) ритмов.

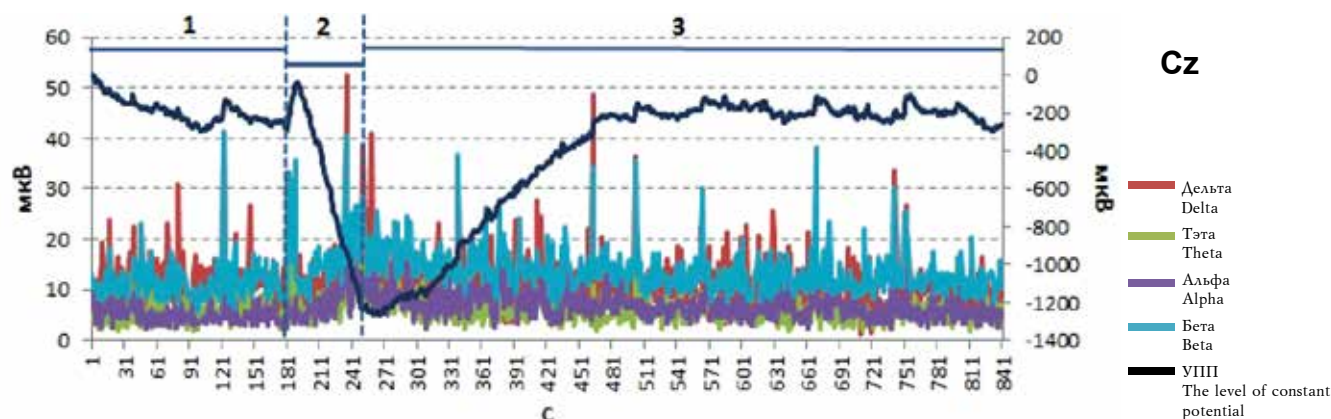


Рис. 5. Содружественные изменения УПП и амплитуды ЭЭГ в разных частотных диапазонах в отведении Cz: 1 – до 1-минутной гипервентиляции IV, 2 – во время; 3 – после 1-минутной гипервентиляции IV

Fig. 5. Concomitant changes of the level of constant potential and EEG amplitude in different frequency ranges in Cz lead: up to 1 – before 1-minute hyperventilation IV, 2 – during; 3 – after 1-minute hyperventilation IV

Следовые процессы сопровождалась обычно позитивизацией УПП, сочетающейся с повышенной мощностью всех ритмов (гипервентиляция I), но дольше всего повышение амплитуды ЭЭГ-ритмов при следовой позитивизации наблюдалось в альфа- и бета-диапазонах. Скорее всего, за всеми этими разными комплексами изменений УПП и ЭЭГ лежат разные функциональные и метаболические изменения в нервной ткани.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ранние исследования влияния гипервентиляции на УПП и ЭЭГ проводились, как правило, по отдельности: регистрировали либо только УПП [19, 20], либо только ЭЭГ [12]. В тех же работах, где параллельно исследовались УПП и ЭЭГ, регистрация УПП и ЭЭГ во время гипервентиляции осуществлялась разными электродами, расположенными на некотором удалении друг от друга [11]. В нашем исследовании регистрация УПП и ЭЭГ осуществлялась в каждом отведении от одного и того же электрода. Полученные нами результаты (гипервентиляция I) в целом соответствуют уже имеющимся данным: во время гипервентиляции имели место негативизация УПП [11, 12, 20] и увеличение мощности ритмов ЭЭГ в нескольких диапазонах, но больше всего в медленно-волновой части [10–12].

ГП обычно рассматривается как модель ишемии [17]. Считается, что в условиях усиленной

вентиляции легких снижение содержания углекислого газа в крови и сдвиг pH в щелочную сторону, как и имеющая место гипероксия, приводят к срабатыванию механизма метаболической саморегуляции [21], проявляющейся в вазоконстрикции мозговых сосудов и снижении мозгового кровотока. По литературным данным, наиболее быстрое падение парциального давления углекислого газа отмечается в течение первых 5–20 дыхательных движений. Гипокапния, связанная с гипервентиляцией, у здоровых молодых испытуемых редуцирует мозговой кровоток на 33–40% [22].

Известно также [23], что в условиях мозговой ишемии и гипоксии развивается деполяризация клеток нервной ткани (нейронов и глиальных клеток). Одним из индикаторов ишемической деполяризации, как и деполяризации вообще, в настоящее время считается негативный сдвиг УПП [23–25]. В таком случае период негативизации УПП, начавшийся в наших экспериментах сразу после старта первой 3-минутной гипервентиляции, напрашивается связать с вазоконстрикцией мозговых сосудов, формированием ишемического состояния и развитием, соответственно, явления ишемической и гипоксической деполяризации клеток нервной ткани головного мозга. Тогда повышение мощности ритмов ЭЭГ в это время во всех частотных диапазонах на максимуме негативизации УПП отражает, по всей видимости,

увеличение нейрональной активности. О том, что гипоксия, вызывающая деполяризацию, может сочетаться именно с нейрональной активацией, известно давно. Так, по данным И.Н. Январевой и Т.Р. Кузьминой [26], на гипоксическое воздействие нейроны отвечают деполяризацией потенциала покоя и первичной активацией импульсной активности, сменяющейся по мере углубления гипоксии ее депрессией по параболотическому типу. И.Г. Власова и Н.А. Агаджанян [27] также наблюдали, что при развитии гипоксии нейроны отвечают первичной активацией с последующим угнетением импульсной активности.

После прекращения гипервентиляции возвращение УПП к исходному уровню, очевидно, можно связать со снятием спастических сосудистых явлений, усилением мозгового кровотока и улучшением метаболических условий для жизни клеток мозга и, как следствие, сменой деполяризации клеточных мембран на реполяризационные процессы. Сохранение при этом повышенной амплитуды ритмов ЭЭГ говорит о сохранении в это время еще повышенной нейрональной активности. Следовательно, явление позитивизации УПП после отмены гипервентиляции, сочетающееся с повышенной мощностью ЭЭГ ритмов, можно рассматривать как отражение возвращения относительно хорошего функционального и метаболического состояния клеток мозга.

За время восстановления УПП (около 1,5 мин) явление гипокапнии должно было смениться на состояние, близкое к нормокапнии, гипоксии – на нормооксию, а алкалоз – на процесс восстановления нормального рН. Все это должно было привести к возвращению УПП на исходный уровень. Однако после возвращения УПП к исходному уровню он продолжил позитивизировать. Следовую позитивизацию УПП, длившуюся около 16 мин и составившую около 1 000 мкВ, возможно объяснить формированием избыточного по сравнению с исходным уровнем мозгового кровотока после ГП. Однако трудно представить механизм прямого влияния усиленного кровотока на УПП без отнесения к клеточным поляризационным процессам.

Если предположить, что усиленный кровоток мозга будет сохраняться еще какое-то время после приближения химических показателей крови и УПП к норме, то какие факторы при этом могли бы привести к следовой позитивизации УПП головного мозга, т.е. сверх того уровня, какой был до начала гипервентиляции примерно на 1 000 мкВ? Само по себе увеличение количества протекающей крови, если бы это прямо влияло

на УПП, должно было его негативизировать, поскольку эритроциты – отрицательно заряженные клетки [28], и относительное увеличение отрицательных клеток в единице объема мозга должно было негативизировать его суммарный электрический потенциал.

Можно попробовать предложить и другие варианты возникновения следовой позитивизации УПП при наличии следового усиленного мозгового кровотока. Так, при восстановлении нормального дыхания, усиленный по сравнению с исходным уровнем, мозговой кровоток мог, например, вымывать из нервной ткани кислые продукты и приводить к сдвигу рН клеток нервной ткани в щелочную сторону. При усиленном кровотоке могло также увеличиваться содержание кислорода в межклеточной среде выше нормы и уменьшение углекислого газа. Скорее всего, все эти явления при усилении мозгового кровотока происходят при условии сохранения нормального дыхания. Но понять, почему снижение концентрации положительных ионов водорода ( $H^+$ ) и увеличение гидроксильных ионов ( $OH^-$ ) происходят при защелачивании крови, что должно позитивизировать УПП, как и увеличение или уменьшение концентрации электронейтральных молекул кислорода или углекислого газа? Защелачивание, т.е. относительное увеличение отрицательных гидроксильных ионов, должно было бы негативизировать, а не позитивизировать УПП, если бы концентрация этих ионов напрямую влияла на УПП. Следовательно, простым увеличением мозгового кровотока не объяснишь следовую позитивизацию УПП.

Следовую позитивизацию УПП, на наш взгляд, можно объяснить только поляризационными явлениями, а именно увеличением поляризации клеточных мембран по сравнению с их исходной поляризацией, т.е. с поляризацией, имевшей место до начала ГП. Увеличение поляризации клеточной мембраны по сравнению с уровнем потенциала покоя в нейрофизиологии называется гиперполяризацией.

Таким образом, анализ характера содружественных изменений УПП и ЭЭГ, имевших место у испытуемого в течение первой гипервентиляции, позволяет говорить о том, что она сопровождалась деполяризацией клеточных мембран, сочетавшейся с повышением нейрональной активности. Тогда как прекращение пробы привело не только к восстановлению мембранного потенциала, но и к относительно длительной следовой гиперполяризации клеток нервной ткани, сочетающейся также с повышенной нейрональной

активностью. Следовательно, в первой гипервентиляционной пробе ишемическая деполяризация, отражающая плохое метаболическое (жизненное) состояние клеток нервной ткани, после нормализации условий метаболизма, сменилась на развитие следовой гиперполяризации, которая отражает, на наш взгляд, развитие внутриклеточных компенсаторных адаптивных процессов и очень хорошего метаболического состояния. Обращаем внимание, что при описании функционального и метаболического состояния клеток мозга во время следовой позитивизации УПП мы специально использовали высокую степень качественного прилагательного «хороший», поскольку считаем, что просто «хорошее» функциональное и метаболическое состояние сформировалось при возвращении УПП к исходному уровню. Во время же следовой позитивизации УПП имело место формирование лучшего состояния, чем было до начала ГП, т.е. «очень хорошего», что отражает, по нашему мнению, мобилизацию компенсаторных механизмов и повышение, как следствие, адаптационных возможностей клеток мозга к условиям ГИ по сравнению с исходным уровнем.

Результаты повторных гипервентиляционных проб, проведенных спустя 30 мин, а также через несколько дней после первой гипервентиляции, показали возможность существенного изменения характера сдвигов УПП и ритмов ЭЭГ. Первое, что выявилось, – это появление в ответ на начало гипервентиляции не негативного, а позитивного отклонения УПП, который сначала занимал около 30 с пробы, а в последующем (гипервентиляция IV) и все время односторонней пробы. Вторая особенность – после проб практически редуцировалась следовая позитивизация УПП. Данные изменения, по всей видимости, отражают постепенную адаптацию организма и головного мозга к условиям гипервентиляции. Если полагать, что характер мозгового кровотока при повторных пробах принципиально не менялся, а именно он снижался во время гипервентиляции, то изменение в биоэлектрическом реагировании связано с адаптивными изменениями в клетках нервной ткани, произошедшими уже после первой ишемической пробы. В этом случае появление при повторной гипервентиляции позитивизации УПП в ответ на вазоконстрикцию сосудов головного мозга говорит о том, что ишемизация нервной ткани теперь стала приводить не сразу к деполяризации, а сначала к гиперполяризации мембранного потенциала. И что повышение адаптационных способностей клеток нервной ткани проявляется в появлении начальной гиперполя-

ризации в ответ на действие неблагоприятного фактора, каким является ГИ мозга.

Уменьшение выраженности следовой позитивизации УПП после повторных проб возможно объяснить повышением в целом резистентности клеток мозга к условиям ишемии. Отсутствие следовой гиперполяризации или уменьшение ее выраженности после прекращения действия неблагоприятного фактора, каковым является ГИ, может говорить об ослаблении активации следовых компенсаторных механизмов из-за того, что резистентность клеток нервной ткани к условиям ишемии после предыдущих проб в целом увеличилась. Прежний неблагоприятный фактор, т.е. ишемия мозга, вызываемая гипервентиляцией, перестал быть настолько неблагоприятным, чтобы теперь существенно активировать защитные механизмы.

Таким образом, содружественный анализ УПП и амплитуды ритмов ЭЭГ позволил не только выявить биоэлектрические индикаторы адаптации нервной ткани к условиям ГИ, но и описать качественный характер происходящих при этом функциональных и метаболических изменений. Анализ омегаЭЭГ позволяет также увидеть включение определенных адаптационных механизмов еще в течение первых ГП. Так, еще в середине второй 3-минутной пробы явление негативизации УПП сменилось на процесс его медленной позитивизации (см. рис. 2), которая, однако, оборвалась с прекращением пробы и вновь продолжилась только спустя 0,5 мин. Появившаяся в середине гипервентиляционной пробы тенденция к позитивизации УПП говорит о включении уже в это время какого-то компенсаторного механизма, противодействующего ишемической деполяризации. Этот же фактор, судя по наличию латентного периода в восстановлении УПП, скорее всего, препятствовал и быстрой реполяризации клеточных мембран после окончания пробы. По всей видимости, данные явления связаны с включением опять же механизма метаболической саморегуляции. В частности, хорошо известно [29], что ишемическая гипоксия стимулирует анаэробные процессы, приводящие к накоплению кислых продуктов, что могло привести к развитию тканевого ацидоза и, как следствие, частичному снятию вазоконстрикции сосудов мозга во время второй ГП. Это могло улучшить питание клеток нервной ткани и затормозить развитие ишемической деполяризации во время гипервентиляции, что и проявилось в стабилизации УПП в середине пробы.

Накоплением кислых продуктов в течение гипервентиляции можно объяснить и наличие

30-секундной паузы в старте восстановления УПП по окончании пробы. Задержка восстановления УПП сразу после отмены гипервентиляции говорит об отсутствии еще в это время процессов реполяризации клеточных мембран. Хотя нормализация дыхания должна была привести к быстрому повышению уровня  $\text{CO}_2$  в крови и снятию гипоксического спазма сосудов мозга и, как следствие, улучшению питания нервной ткани, смене анаэробного метаболизма на аэробный, повышению уровня макроэргов, восстановлению ионного гомеостаза и реполяризации деполяризованных клеток. Тканевый ацидоз, угнетая работу внутриклеточных ферментных систем, мог сам по себе способствовать деполяризации клеточных мембран [30]. Быстрой постишемической реполяризации, таким образом, мог мешать остаточный ацидоз, развитие которого во время гипервентиляции, однако, включало «защитную вазодилатацию».

Кроме метаболического ацидоза, вазодилатацию в середине гипервентиляции может вызвать также повышение концентрации внеклеточного калия, как и задержка реполяризации после пробы. Известно, что калий расширяет сосуды мозга [21, 23], но способствует деполяризации мембраны. Судя по тому, что при третьей гипервентиляции длительностью 1 мин не было смены негативизации УПП на позитивизацию во время пробы, как и латентного периода в старте позитивизации УПП после пробы, можно думать, что активация предполагаемого механизма метаболической саморегуляции, противодействующего ишемической деполяризации во время пробы и быстрому восстановлению мембранного потенциала после, происходила у испытуемого не ранее, чем через 60 с после гипервентиляции.

Тот факт, что после четвертой гипервентиляции в биоэлектрическом ответе коры на создаваемые условия ишемии и гипоксии наблюдалась только позитивизация УПП, позволяет предполагать, что у испытуемого произошла почти полная адаптация нервной ткани головного мозга к данным неблагоприятным условиям. Новый характер сдвига УПП свидетельствует о качественном изменении реагирования клеток мозга на ишемическое воздействие. После адаптации к условиям ишемии нервные клетки стали реагировать не деполяризацией, сочетающейся с повышенной активностью, а гиперполяризацией, также сопровождающейся повышенной нейрональной активностью. Наличие у испытуемого нескольких отведений, в которых, тем не менее, и после четвертой пробы наблюдалась негативизация УПП

(см. рис. 5), хоть и предвараемая недлительной его позитивизацией, говорит о гетерогенности устойчивости коры к неблагоприятным условиям и наличии региональных различий в адаптационных возможностях мозга к ишемии и гипоксии. Участки мозга со сниженными адаптационными возможностями демонстрируют большую негативизацию или меньшую позитивизацию УПП при действии неблагоприятного фактора.

По целому ряду наблюдений кратковременный позитивный сдвиг УПП может предшествовать негативному при создании неблагоприятных для жизнедеятельности клеток мозга условий. Так, S. Goldring и J.L. O'Leary [31] выявили, что пережатие трахеи у кроликов вызывает вначале положительный сдвиг УПП 1–3 мВ с последующим значительным негативным смещением уровня потенциала на 10 мВ. В исследовании Г.Н. Сорохтина [32], при гибели мышей, независимо от того, связана ли была смерть с асфиксией или отравлением, выявлено первоначальное повышение УПП в среднем на 4 мВ, длящееся от 1 до 10 мин, которое затем сменяется снижением УПП на несколько десятков мВ. В этом случае полное уплощение ЭЭГ наблюдалось только во время негативного сдвига УПП.

По данным Н. Caspers и соавт. [33], выявленное ими первичное повышение УПП при аноксии обусловлено гиперполяризацией нервных мембран в ее начальном периоде, а резкое снижение УПП в дальнейшем – неизбежным возрастанием мембранной проницаемости и деполяризацией клеток. В исследовании Н. Rogers и соавт. [34] нейроны срезов гиппокампа при инкубации в течение 20 мин в гипоксической спинно-мозговой жидкости отвечали деполяризацией, которой предшествовала, однако, заметная гиперполяризация. J. Leblond и K. Krnjevic [35] показано, что короткая аноксия (95%  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  на 2–4-й мин) вызывает в нейронах гиппокампа гиперполяризацию мембраны.

Таким образом, ГИ может вызывать и негативизацию, и позитивизацию УПП, что говорит, во-первых, о возможности развития деполяризационных и гиперполяризационных явлений на клеточном уровне в ответ на действие данного неблагоприятного фактора, а во-вторых, о возможности изменения характера реагирования: смены деполяризационного ответа на гиперполяризационный после повышения адаптивных возможностей клеток. Ничего удивительного в этих выводах нет, поскольку данные особенности биоэлектрического реагирования на неблагоприятные факторы давно известны. В на-



стоящее время не принято при интерпретации результатов исследований обращаться к работам 50-100-летней давности, но нам приходится это делать, поскольку понять адаптивные изменения клеток нервной системы на действие неблагоприятных факторов и их проявление в особенностях электрографического потенциала без опоры на некоторые работы тех лет невозможно. В первую очередь, мы имеем в виду макроэлектродные данные о характере электрического реагирования возбудимых образований, полученные в школе Н.Е. Введенского – А.А. Васильева.

Н.Е. Введенским в свое время (1901) был открыт неспецифический характер изменения электрического потенциала возбудимых образований на действие разнообразных неблагоприятных факторов, который остается до сих пор никем не опровергнут. По данным Н.Е. Введенского [36], прежде чем возбудимое образование под действием неблагоприятного фактора перейдет в околожизненное состояние (названное им парабриозом), оно проходит через ряд закономерных стадий, проявляющихся в особенностях электрографического потенциала. Сначала участок возбудимого образования, подвергающийся действию неблагоприятного фактора, позитивизируется по отношению к участкам, не подвергшимся такому действию. Затем по мере действия неблагоприятного фактора позитивизация начинает уменьшаться, и к стационарному электропозитивному ответу добавляются быстрые осцилляции. Быстрые электрические осцилляции сопровождают сначала и следующую стадию – появление у участка, подвергнувшегося действию неблагоприятного фактора, электроотрицательности. По мере увеличения электроотрицательности быстрые электрические осцилляции постепенно ослабевают, пока совсем не затухнут. Эта стадия Н.Е. Введенским называлась парабриотическим торможением или истинно околожизненным состоянием.

Соответственно, в современных терминах и терминах адаптационной физиологии действие разнообразных неблагоприятных факторов на возбудимые образования проявляется в неспецифических электрографических изменениях, закономерно сменяющих друг друга, прежде чем живое образование приблизится к смерти. В последующем эти наблюдения Н.Е. Введенского были подтверждены многочисленными исследованиями А.А. Васильева и его сотрудников [37]. Ими было также показано, что выраженность электропозитивной фазы при действии разных факторов может отличаться, как и скорость на-

ступления электроотрицательной, а также состояний парабриоза и гибели возбудимого образования.

В настоящее время очевидно, что электроотрицательная фаза связана с деполяризацией клеточных мембран, а позитивная – с гиперполяризацией. Быстрые электрические осцилляции – это нервные импульсы или потенциалы действия. Следовательно, в терминах современной электрофизиологии адаптивное реагирование нервных клеток на неблагоприятные факторы идет в четыре стадии [38, 39], сопровождающиеся закономерными изменениями в уровне поляризации клеточных мембран и импульсной активности, прежде чем в них активируются механизмы запрограммированной смерти, и они погибнут: I) гиперполяризация без импульсной активности; II) гиперполяризация, сочетающаяся с импульсной активностью; III) деполяризация с импульсной активностью; IV) деполяризация без импульсной активности; V) апоптоз.

Таким образом, анализ работ школы Н.Е. Введенского – А.А. Васильева позволяет сделать вывод о том, что участок нерва, подвергшийся действию неблагоприятных факторов, меняет свою поляризацию: сначала развивается гиперполяризация, переходящая постепенно по мере действия неблагоприятного фактора в деполяризацию. Выраженность гиперполяризации и скорость ее перехода в деполяризацию зависят от силы неблагоприятного фактора. Чем он сильнее, тем быстрее гиперполяризация будет сменяться деполяризацией. Кроме этого, анализ работ школы Н.Е. Введенского показывает, что периоды возбуждения могут быть на фоне как деполяризации, так и гиперполяризации.

Исходя из представленных выше макроэлектродных наблюдений Н.Е. Введенского, участок нервной ткани, состоящий из клеток в околожизненном (парабриотическом) состоянии, будет иметь значительную электроотрицательность по отношению к нормальному участку. Это обычно и регистрируют макроэлектродным методом при моделировании ишемии или гипоксии в виде негативного сдвига УПП головного мозга [11, 23]. Если полагать, что происхождение УПП головного мозга, регистрируемого с помощью макроэлектродов, тождественно стационарному электрографическому потенциалу, регистрируемому макроэлектродами Н.Е. Введенским между двумя участками нерва, то надо признать, что УПП головного мозга отражает разную степень поляризации клеточных мембран под активным и индифферентным электродами и изменения этой поляризации. В этом случае при униполярном отведении увеличение поляризации клеточных мембран под

активным макроэлектродом по отношению к индифферентному макроэлектроду, расположенному над тканью с относительно стабильной поляризацией клеточных мембран, должно приводить к позитивному, а деполяризация – к негативному сдвигу УПП. О том, что наши предположения о происхождении УПП верны, говорят и данные о позитивных сдвигах УПП при действии препаратов, гиперполяризующих клеточные мембраны, таких как циклопентиладенозин и нембутал [2].

Относительно особенностей классической ЭЭГ во время ГП обычно отмечается повышение амплитуды ритмов, особенно в дельта- и тета-диапазонах [10, 11]. Негативизация и позитивизация УПП в наших экспериментах в течение и после гипервентиляции сопровождались, как правило, повышенной амплитудой ритмов ЭЭГ. Это позволяет думать о том, что деполяризация, реполяризация и гиперполяризация мембраны клеток нервной ткани, имевшие место, по всей видимости, сочетались с повышенной нейрональной активностью, и явлений деполяризационного или гиперполяризационного торможения не достигалось. В случае же достижения состояния деполяризационного торможения (парабиотического торможения по Н.Е. Введенскому) в омегаЭЭГ наблюдается более существенная (десятки мВ) негативизация УПП, сочетающаяся с депрессией амплитуды ритмов ЭЭГ [4, 40]. При развитии состояния гиперполяризационного торможения позитивизация УПП сочетается с депрессией ритмов ЭЭГ. Это имеет место, например, при введении наркотиков и нейропротекторных средств [2].

Таким образом, анализ литературы, а также собственных экспериментальных данных позволяет говорить о том, что неблагоприятные факторы могут вызывать как деполяризацию клеточных мембран, так и гиперполяризацию. Скорость и глубина наступления деполяризационных явлений в нервной ткани в ответ на их действие, а следовательно, и степень их неблагоприятности могут быть выявлены по величине негативного сдвига УПП. Чем позже появляется негативизация УПП и чем меньше она выражена, тем выше резистентность клеток нервной ткани к неблагоприятным факторам либо слабее неблагоприятный фактор. Наличие электропозитивного отклонения УПП указывает на формирование в целом хорошего метаболического и функционального состояния клеток мозга и развитие ре- и гиперполяризационных процессов, отражающих мобилизацию и достаточность внутриклеточных защитных механизмов. Использование омегаЭЭГ позволяет подойти к тонкой дифференциров-

ке различных адаптационных состояний клеток нервной ткани головного мозга человека, недоступной для других неинвазивных методов. Наше исследование также показало, что повышение мощности ритмов ЭЭГ может быть на фоне как деполяризационных (негативизация УПП), так и гиперполяризационных (позитивизация УПП) процессов, отражающих разное метаболическое состояние клеток мозга. Только данных ЭЭГ недостаточно для дифференцирования качественно разных метаболических состояний, развивающихся в нервной ткани либо в процессе естественной нервно-психической деятельности или при патологии, либо в условиях искусственно вызванных сосудистых изменений как при ГП.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регистрация омегаЭЭГ и анализ содружественных изменений УПП и ЭЭГ показали, что ишемическое состояние головного мозга, формирующееся в процессе волевой гипервентиляции, сопровождается негативизацией УПП (0,5–1 мВ) и увеличением амплитуды ритмов ЭЭГ всех диапазонов. После прекращения ГП и возвращения УПП к исходному уровню развивается следовая позитивизация УПП (около 1 мВ), сочетающаяся с повышенной амплитудой ритмов ЭЭГ. Процесс адаптации к гипоксии и ишемии, моделируемый повторением ГП, и повышение резистентности мозга к данным неблагоприятным факторам проявлялись сначала в появлении кратковременного электропозитивного отклонения УПП на старте пробы и редукции следовой позитивизации УПП, а затем в полной замене в течение всей пробы электропозитивного отклонения на позитивный сдвиг УПП (около 0,5 мВ).

Анализ характера изменений омегаЭЭГ в процессе гипервентиляции и после нее, а также литературных данных позволяет предполагать, что повышение адаптационных возможностей клеток мозга проявляется в замене деполяризации в ответе на неблагоприятный фактор выраженной гиперполяризацией клеточных мембран и, как следствие, замещении негативного отклонения УПП на позитивный. Активация компенсаторных механизмов, приводящих к повышению устойчивости клеток нервной ткани к условиям ишемии, сопровождается, по всей видимости, развитием после ишемической деполяризации следовой гиперполяризации и проявляется в следовой позитивизации УПП.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мурик С.Э. Омегаэлектроэнцефалография – новый метод оценки функционального и метаболического

- состояния нервной ткани. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. 2004; 3 (1): 154–189. [Murik S.E. Omegaelectroencephalography (Direct current EEG) as a new way of estimation of the functional and metabolic state of the neural tissue]. *Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2004; 3 (1): 189–194 (in Russ.).]
2. Murik S.E., Shapkin A.G. Simultaneous recording of the EEG and direct current (DC) potential makes it possible to assess the functional and metabolic state of the nervous tissue. *Int. J. Neuroscience*. 2004; 114 (8): 977–997. DOI: 10.1080/00207450490450154.
  3. Мурик С.Э. Омегаэлектроэнцефалография: становление нового метода, диагностические возможности. *Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология»*. 2018; 26: 69–85. [Murik S.E. Omegaelectroencephalography: formation history and diagnostic capabilities of the new method in electrophysiology. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology, Ecology*. 2018; 26: 69–85 (in Russ.)]. DOI: 10.26516/2073-3372.2018.26.69.
  4. Мурик С.Э., Суфианов А.А., Суфианова Г.З., Шапкин А.Г. Экспериментальные данные об электрофизиологических коррелятах ишемии мозга разной тяжести. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. 2003; 1: 148–154. [Murik S.E., Sufianov A.A., Sufianova G.Z., Shapkin A.G. Experimental data on electrophysiological indicators of different severity brain ischemia. *Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2003; 1: 148–154 (in Russ.)].
  5. Мурик С.Э. Общие нейрональные механизмы мотиваций и эмоций. Иркутск: Изд-во Иркутского госуниверситета, 2006: 376. [Murik S.E. General neural mechanisms of motivations and emotions. Irkutsk: Publishing House Irkutsk State University Publ., 2006: 358 (in Russ.)].
  6. Murik S.E. The use of DCEEG to estimate functional and metabolic state of nervous tissue of the brain at hyper- and hypoventilation. *World Journal of Neuroscience*. 2012; 2: 172–182. DOI: 10.4236/wjns.2012.23027.
  7. Мурик С.Э. Способ определения функционального и метаболического состояния нервной ткани. Патент на изобретение, № 2319441, от 20.03.2008. [Murik S.E. A method of determining the functional and metabolic state of the nervous tissue. Patent for invention, No. 2319441, 20.03.2008 (in Russ.)].
  8. Мурик С.Э., Шапкин А.Г. Способ определения функционального и метаболического состояния нервной ткани. Патент на изобретение, № 2245673, от 10.02.2005. [Murik S.E., Shapkin A.G. A method of determining the functional and metabolic state of the nervous tissue. Patent for invention, No. 2245673, 10.02.2005 (in Russ.)].
  9. Ганцгортн Е.В., Хлопонин Д.П., Макляков Ю.С. Показатели количественной фармако-ЭЭГ при острой ишемии головного мозга и их динамика в условиях применения ноотропов. *Медицинский вестник юга России*. 2014; 1: 14–23. [Gantsgorn E.V., Khloponin D.P., Maklyakov Yu.S. Indicators of quantitative pharmaco-EEG in acute cerebral ischemia and their dynamics in terms of the use of nootropics. *Medical Herald of the South of Russia*. 2014; 1: 14–23 (in Russ.)].
  10. Zwiener U., Löbel S., Rother M., Funke M. Quantitative topographical analysis of EEG during nonstandardized and standardized hyperventilation. *J. Clin. Neurophysiol.* 1998; 15 (6): 521–528.
  11. Rockstroh B. Hyperventilation-induced EEG changes in humans and their modulation by an anticonvulsant drug. *Epilepsy Res.* 1990; 7 (2): 146–154.
  12. Kraaier V., Van Huffelen A.C., Wieneke G.H. Changes in quantitative EEG and blood flow velocity due to standardized hyperventilation; a model of transient ischaemia in young human subjects, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 1988; 70 (5): 377–387. DOI: /10.1016/0013-4694(88)90015-6.
  13. Гнездицкий В.В. Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография. М.: МЕДпресс-информ, 2004: 624. [Gnezditsky V.V. Inverse EEG problem and clinical electroencephalography. Moscow: MEDpress-inform Publ., 2004: 624 (in Russ.)].
  14. Burghaus L., Hilker R., Dohmen C., Bosche B., Winhuisen L., Galldiks N., Szeliess B., Heiss W.D. Early electroencephalography in acute ischemic stroke: prediction of a malignant course? *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2007; 109 (1): 4549. DOI: 10.1016/j.clineuro.2006.06.003.
  15. Постнов В.Г., Караськов А.М., Ломиворотов В.В. Возможности применения электроэнцефалографии в кардиохирургии. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2009; 1: 35–42. [Postnov V.G., Karaskov A.M., Lomivorotov V.V. Possibilities of using electroencephalography in cardiosurgery. *Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2009; 1: 35–42 (in Russ.)].
  16. Латынина М.В. Значение гипервентиляционной пробы при электроэнцефалографическом обследовании: физиологический аспект. Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13. Владивосток, 2005: 144. [Latynina M.V. The role of hyperventilation tests during electroencephalographic examination: the physiological aspect. Thesis of the Candidate of Biological Sciences. Vladivostok, 2005: 144 (in Russ.)].
  17. Immink R.V., Pott F.C., Secher N.H., van Lieshout J.J. Hyperventilation, cerebral perfusion, and syncope. *J. Appl. Physiol.* 2014; Apr. 116 (7): 844–851. DOI: 10.1152/japplphysiol.00637.2013.
  18. Гнездицкий В.В., Кошурникова Е.Е., Корепина О.С., Скоморохов А.А. Анализ реакций ЭЭГ на гипервентиляцию (тренды и дипольная локализация): проблемы интерпретации. *Функциональная диагностика*. 2010; 1: 13–25. [Gnezditsky V.V., Koshurnnikova E.E., Korepina O.S., Skomorokhov A.A. Analysis of EEG responses to hyperventilation (trends and dipole localization): problems of interpretation. *Functional Diagnostics*. 2010; 1: 13–25 (in Russ.)].

19. Tomita-Gotoh S., Hayashida Y. Scalp-recorded direct current potential shifts induced by hypocapnia and hypercapnia in humans. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1996; 99 (1): 90–97. DOI: 10.1016/0921-884X(96)95170-X.
20. Voipio J., Tallgren P., Heinonen E., Vanhatalo S., Kaila K. Millivolt-scale DC shifts in the human scalp EEG: evidence for a nonneuronal generator. *J. Neurophysiol.* 2003; 89 (4): 2208–2214. DOI: 10.1152/jn.00915.2002.
21. Peterson E.C., Wang Z., Britz G. Regulation of cerebral blood flow. *Intern. J. Vascular Medicine*. 2011; Article ID 823525: 8. DOI: 10.1155/2011/823525.
22. Вейн А.М., Молдовану И.В. Нейрогенная гипервентиляция. Кишинев: Штица, 1988: 181. [Vein A.M., Moldovanu I.V. Neurogenic hyperventilation. Kishinev: Shtitsa Publ., 1988: 181 (in Russ.)].
23. Королева В.И., Виноградова Л.В. Ишемическая и гипоксическая деполяризация в неокортексе крыс. *Журн. высш. нерв. деят.* 2000; 50 (4): 612–623. [Koroleva V.I., Vinogradova L.V. Ischemic and hypoxic depolarization in the rat neocortex. *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2000; 50 (4): 612–623 (in Russ.)].
24. Hartings J.A., Li C., Hinzman J.M. et al. Direct current electrocorticography for clinical neuromonitoring of spreading depolarizations. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2017; 37 (5): 1857–1870. DOI: 10.1177/0271678X16653135.
25. Ohta K., Graf R., Rosner G. et al. Calcium ion transients in peri infarct depolarizations may deteriorate ion homeostasis and expand infarction in focal cerebral ischemia in cats. *Stroke*. 2001; 32 (2): 535–543.
26. Январева И.Н., Кузьмина Т.Р. О механизмах нарушения функционального состояния центральной нервной системы при кислородной недостаточности мозга. Физиологические механизмы основных нервных процессов. *Труды Ленингр. о-ва естествоисп.* 1985; 75 (5): 71–77. [Yanvareva I.N. and Kuzmina T.R. On the mechanisms of violation of the functional state of the central nervous system in case of oxygen insufficiency of the brain. *Physiological mechanisms of basic neural processes. Proceedings of the Leningrad naturalists' society*. 1985; 75 (5): 71–77 (in Russ.)].
27. Власова И.Г., Агаджанян Н.А. Индивидуальная устойчивость к гипоксии организма и нервной клетки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1994; 118 (11): 454–457. [Vlasova I.G., Agadzanyan N.A. Individual resistance to hypoxia of the body and the nerve cell. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1994; 118 (11): 454–457 (in Russ.)].
28. Fontes A., Fernandes H.P., de Thomaz A.A. et al. Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers. *J. Biomed. Opt.* 2008; 13 (1): 014001. DOI: 10.1117/1.2870108.
29. Нечипуренко Н.И., Пашковская И.Д., Мусиенко Ю.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга. *Медицинские новости*. 2008; 1: 7–13. [Nechipurenko N.I., Pashkovskaya I.D. Basic pathophysiological mechanisms of cerebral ischemia. *Medical News*. 2008; 1: 7–13 (in Russ.)].
30. Пекун Т.Г., Васим Т.В., Федорович С.В. Деполяризация плазматической мембраны синапсом мозга крыс при вне- и внутриклеточном закислении. *Биофизика*. 2014; 59 (1): 100–104. [Pekun T.G., Wasem T.V., Fedorovich S.V. Depolarization of the plasma membrane by synaptas of a rat's brain during extracellular and intracellular acidification. *Biophysics*. 2014; 59 (1): 100–104 (in Russ.)].
31. Goldring S., O'Leary J.-L. Summation of certain enduring sequelae of cortical activation in the rabbit. *Electroencephal. and Clin. Neurophysiol.* 1951; 3 (3): 329–340.
32. Сорохтин Г.Н. Реакции возбудимых систем на дефицит возбуждения. М.: Медицина, 1968: 352. [Sorokhtin G.N. Reactions of excitable systems to excitation deficit. Moscow: Medicine Publ., 1968: 352 (in Russ.)].
33. Caspers H., Speckmann E.J., Lehmenkühler A. Electrogenesis of cortical DC potentials. *Prog. Brain Res.* 1980; 54: 3–15. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)61603-9.
34. Rogers H., Birch P.J., Hayes A.G. Effects of hypoxia and hypoglycaemia on DC potentials recorded from the gerbil hippocampus *in vitro*. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1990; 342 (5): 547–553.
35. Leblond J., Krnjevic K. Hypoxic changes in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 1989; 62 (1): 1–14.
36. Введенский Н.Е. Возбуждение, торможение и наркоз. СПб, 1901: 110. [Vvedensky N.E. Excitation, inhibition and narcosis. St. Petersburg, 1901: 110 (in Russ.)].
37. Мовчан Н.П. Исследования Л.Л. Васильева – новый этап в развитии учения Н.Е. Введенского о парабозе. Физиологические механизмы основных нервных процессов. *Труды Ленингр. о-ва естествоисп.* 1985; 75 (5): 5–15. [Movchan N.P. L.L. Vasiliev's research is a new stage in the development of N.E. Vvedensky's theory of parabiosis. *Physiological Mechanisms of Basic Neural Processes. Proceedings of the Leningrad Naturalists Society*. 1985; 75 (5): 515 (in Russ.)].
38. Мурик С.Э. О функциональном состоянии нейронов головного мозга. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. 2003; 7: 51–53. [Murik S.E. On the functional state of brain neurons. *Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2003; 7: 51–53 (in Russ.)].
39. Мурик С.Э. Общая схема адаптации нервных клеток: новый взгляд. Адаптационные стратегии живых систем. Междисциплинарная научная конференция. Новый Свет, Крым, Украина, 11–16 июня 2012: 82. [Murik S.E. General scheme of adaptation of nerve cells: a new insight. Interdisciplinary Scientific Conference

«Adaptive Strategies of Living Systems». AR Crimea, Ukraine, June 11–16, 2012: 82 (in Russ.)).

40. Витик А.А., Хлесткина М.С., Ищенко Т.В. Изменения биоэлектрической активности головного мозга при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс. Сборник статей IV Междуна-

родной научно-практической конференции. 2016: 38–46. [Vitik A.A., Khlestkina MS, Ishchenko T.V. Changes in the bioelectrical activity of the brain in the simulation of focal transient cerebral ischemia in rats. European Research. The articles of the IV International Scientific and Practical Conference, 2016: 38–46 (in Russ.)].

## Сведения об авторе

Мурик Сергей Эдуардович, канд. биол. наук, доцент, кафедра физиологии и психофизиологии, Иркутский государственный университет, г. Иркутск

(✉) Мурик Сергей Эдуардович, e-mail: sergey\_murik@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2017  
Подписана в печать 14.12.2018

## Authors information

Murik Sergey E., PhD, Associate Professor, Physiology and Psychophysiology Department, Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation.

(✉) Murik Sergey E., e-mail: sergey\_murik@mail.ru.

Received 16.05.2017  
Accepted 14.12.2018

## Способ рентгенологического исследования морфометрических показателей сосудов порто-кавальной системы прямой кишки трупов мужчин

Русских А.Н., Шабоха А.Д.

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

### РЕЗЮМЕ

**Цель** настоящего исследования – определение морфометрических особенностей сосудов венозной системы прямой кишки мужчин разных типов телосложения при помощи рентгенологического метода.

**Материалы и методы.** Изучение типов ветвления сосудов четырех порядков ректальных вен и углов их слияния было проведено на рентгенологических снимках 77 трупов мужского пола, умерших от спонтанных причин, при жизни не страдавших заболеваниями, связанными напрямую с исследуемым органом и его сосудистой системой. Средний возраст объектов исследования составил ( $54,9 \pm 1,7$ ) лет, 36–71 год. Для решения поставленной задачи проведено рентгенконтрастное исследование вен прямой кишки в прямой проекции органов малого таза.

**Результаты.** Установлено, что разработанный способ рентгенологического исследования вен прямой кишки, состоящий из трех последовательных снимков этапного контрастирования сосудов органа, позволяет определить особенности ангиоархитектоники и пространственного расположения сосудов прямой кишки трупов мужчин разных типов телосложения по J.M. Tanner без ее извлечения. Выявлены максимальные значения углов образования ветвей второго порядка портальной системы трупов мужчин гинекоморфного соматотипа, а также минимальные значения углов образования вен первого порядка их кавальной системы, постоянство рассыпного типа ветвления параллельных органу сосудов портальной системы и частая встречаемость одиночного типа ветвления прямых органу сосудов при отсутствии конституциональных особенностей ветвления сосудов кавальной системы прямой кишки исследуемых трупов мужчин.

**Заключение.** Данная находка может быть использована для оценки влияния венозного оттока на структурные характеристики сосудистой системы стенки прямой кишки в зависимости от типа телосложения индивидуума.

**Ключевые слова:** прямая кишка, рентгенологический метод исследования, урографин, ректальные вены.

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

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

**Для цитирования:** Русских А.Н., Шабоха А.Д. Способ рентгенологического исследования морфометрических показателей сосудов порто-кавальной системы прямой кишки трупов мужчин. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 146–156. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-146-156>.



УДК 616.351-091.1-073.7-055.1

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-146-156>

## X-ray examination methods of veins of the human rectum

Russkikh A.N., Shabokha A.D.

*Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky  
1, Partizana Zbeleznyaka Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation*

### ABSTRACT

**The aim of this study** is to determine the morphometric features of the vessels of the venous system of the rectum of men of different body types using the X-ray method.

**Materials and methods.** To carry out X-ray contrast study of rectum veins in a direct projection of the pelvic organs was performed.

**Results.** As a result of the study, it was established that the developed method of radiological examination of rectum veins, consisting of three consecutive photographs of the stage contrasting of the organ vessels, allows to determine the features of angioarchitectonics and the spatial arrangement of rectal vessels of corpses of men of different body types according to J.M. Tanner without extracting it. The maximum values of the corners of the formation of the second-order portal system of the corpus gynecomorphic somatotype male corpuscles, as well as the minimum values of the angles of vein formation of the first order of their caval system, the constancy of the loose type branching of the portal system parallel to the organ of the vessels, and the frequent occurrence of a single type of branching of the direct vascular organ in the absence of constitutional features branching of the vessels of the cadavers of the rectum of the investigated corpses of men.

**Conclusion.** This finding can be used to assess the effect of venous outflow on the structural characteristics of the vascular system of the rectal wall, depending on the body type of the individual.

**Key words:** rectum, X-ray study method, urographine, rectal 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 authors state that there is no funding for the study.

**For citation:** Russkikh A.N., Shabokha A.D. X-ray examination methods of veins of the human rectum. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 146–156. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-146-156>.

## ВВЕДЕНИЕ

Венозное русло прямой кишки человека так или иначе участвует в развитии, течении и исходе большинства проктологических заболеваний. Определенные сложности в их профилактике и лечении часто связаны с особенностями топографии органов и систем, расположенных в полости малого таза. Строение вен и артерий прямой кишки вариabельно, однако их непосредственное прижизненное изучение затрудняет труднодоступность области их локализации [1–3]. Существующие данные об особенностях расположения, типах ветвления, углов образования сосудов разных степеней генерации порто-кавального русла прямой кишки явля-

ются неполноценными. Активное использование их при разработке патогенетически обоснованных методов хирургического лечения проктологических заболеваний сосудистого генеза обуславливает высокую актуальность последующего детального исследования данной системы с учетом индивидуальных характеристик организма человека.

Выбор способа исследования сосудов многообразен, но не всегда оправдан. Например, данные морфометрических параметров вен прямой кишки человека, определенные на их коррозионных препаратах [4–6], могут быть значительно искажены, поскольку в момент изъятия органа высока вероятность изменения параметров органометрии и пространственных координат его сосудов. Извест-

но, что существующий рентгенологический метод исследования обеспечивает возможность наглядного изучения особенностей сосудистых систем абсолютно любой локализации в организме человека [7–9]. Существует достаточно много методов визуализации сосудистых структур рентгеноконтрастными веществами в норме и при патологии [10, 11], но наличие сразу двух венозных русел, к сожалению, не позволяет использовать их при исследовании порто-кавальной системы прямой кишки человека. Так, способ диагностики варикозной болезни вен таза, заключающийся в рентгенологическом исследовании [12, 13], возможно, позволил бы провести объективную оценку ветвления сосудов венозной системы прямой кишки, однако этот способ применим при изучении особенностей строения сосудов органов малого таза лишь кавальной венозной системы. Для исследования особенностей морфометрических вариантов ветвления и углов образования сосудов систем воротной и нижней полой вен в области прямой кишки человека вкуче использование подобного способа мало оправдано.

Наиболее подходящим способом исследования венозных структур прямой кишки является, как бы парадоксально это ни звучало, способ оценки контроля качества проведения полной хирургической обработки ран в условиях инфицирования раны [14]. Данный способ заключается в том, что в гнойные полости или свищевой ход вводят смесь, состоящую из 10 мл 76%-го раствора урографина и 2 мл 1%-го спиртового раствора бриллиантового зеленого, для последующей визуальной и рентгенологической оценки качества хирургической обработки. Этот способ позволяет объективно оценить объем и степень поражения костных и мягкотканых структур в области гнойного воспаления для контроля качества выполнения хирургической обработки раны. Но, опять-таки, способ применим исключительно в условиях раневой инфекции. Применение же его для изучения особенностей строения сосудистого русла определенного органа требует значительной корректировки.

В связи с вышесказанным становится очевидным, что рентгенологическое исследование одновременно двух и более сосудистых систем, таких как порто-кавальная система прямой кишки человека, безусловно, должно выполняться в условиях их первоначального анатомического расположения, быть быстровыполнимым и не создавать грубых рентгенологических дефектов. Следовательно, исследование параметров органометрии, типов ветвления и углов образования ректальных вен разумно проводить при помощи способа рентгенологического исследования порто-кавальной

системы прямой кишки человека в эксперименте, задачей которого является оптимизация рентгенологического исследования вен прямой кишки человека при изучении конкретной части ее венозной системы в полости малого таза [15].

Таким образом, целью данного исследования явилось определение морфометрических особенностей сосудов венозной системы прямой кишки трупов мужчин разных соматотипов при помощи рентгенологического метода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение типов ветвления сосудов четырех порядков ректальных вен и углов их слияния было проведено на рентгенологических снимках 77 трупов мужского пола, умерших от спонтанных причин, при жизни не страдавших заболеваниями, связанными напрямую с исследуемым органом и его сосудистой системой. Средний возраст объектов исследования составил ( $54,9 \pm 1,7$ ) лет, 36–71 год.

*Техника подготовки сосудов венозной системы прямой кишки.* Посредством нижнесрединной лапаротомии осуществлялся доступ к ректосигмоидному отделу толстой кишки, подвздошному сосудистому бассейну с обеих сторон, а также брыжейке сигмовидной кишки. По данным литературы, границей между прямым и сигмовидным отделами толстой кишки является мыс крестца, где в последующем были установлены рентгеноконтрастные метки (остроконечные булавки с металлическими оливоками) [11, 16]. После чего тупым и острым путями выделялась верхняя ректальная ветвь нижней брыжеечной вены в толще брыжейки сигмовидной кишки, а также внутренние подвздошные вены с обеих сторон из влагалища подвздошных сосудистых пучков. Препаровка нижней брыжеечной вены с целью визуализации контрастировалась окрашенным в зеленый цвет водным раствором бриллиантовой зелени [17].

Далее в просвет нижней брыжеечной и внутренней подвздошной вены устанавливались трубки соответствующих диаметров. Для удаления кровяных сгустков из сосудов последние промывали раствором 10%-го аммиака и воды дистиллированной.

*Техника рентгенологического исследования сосудов венозной системы прямой кишки.* Рентгеноконтрастное исследование венозных сосудов прямой кишки осуществлялось на стационарном рентгенаппарате 12П9 Armobil-9 (АО «Актюбрентген», Россия). Рентгенограмма № 1 (контрольная): обзорное рентгенографическое исследование органов малого таза (без использования

контраста) в прямой задней проекции. При описании снимка обращали внимание на отсутствие или наличие артефактов, какой-либо другой рентгенпатологии, уровень перехода сигмовидной кишки в прямую, зафиксированный посредством рентгенконтрастных меток.

Рентгенограмма № 2: обзорное рентгенографическое исследование органов малого таза в прямой задней проекции с тугим наполнением раствором рентгенконтрастного вещества (урографин, 76%) подготовленного русла портальной системы прямой кишки.

Рентгенограмма № 3: обзорное рентгенографическое исследование органов малого таза в прямой задней проекции с тугим наполнением систем внутренней подвздошной и воротной вен прямой кишки с двух сторон одновременно 76%-м раствором урогафина. На этих снимках определяется тип ветвления сосудов разных порядков венозной сети прямой кишки человека.

Особенности морфометрии ректальных вен мужчин были изучены в зависимости от соматотипа по J.M. Tanner, значение индекса позволяет отнести объект к гинекоморфному (менее 837), мезоморфному (837–931) и андроморфному (более 931) типам телосложения. После определения необходимых параметров антропометрии, а именно величин акромиального и гребневого диаметров, рассчитывали значение индекса J.M. Tanner по следующей формуле:  $(3 \times \text{АкД} \times 10) - (\text{ГрД} \times 10)$ , где АкД – акромиальный диаметр, ГрД – гребневой диаметр [18–20]. Затем на полученных рентгенологических снимках малого таза описывали особенности типов ветвления сосудов параллельных органу (1–3-го порядков) по классификации В.Н. Шевкуненко и типов ветвления сосудов 4-го порядка по Ю.М. Лопухину (рис. 1, 2) от акромиального к каудальному концу органа (рис. 3) [2].

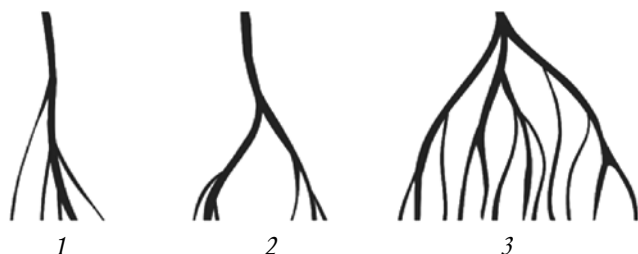


Рис. 1. Варианты ветвления вен по Ю.М. Лопухину (1950): 1 – одиночный, 2 – бифуркационный, 3 – пучковой

Fig. 1. Variants of vein branching according to Yu.M. Lopukhin (1950): 1 – single, 2 – bifurcational, 3 – bundled

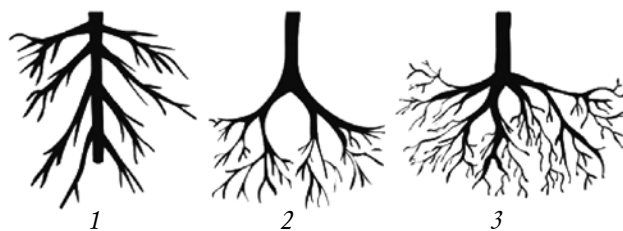


Рис. 2. Варианты ветвления вен по классификации В.Н. Шевкуненко (1935): 1 – магистральный тип, 2 – переходный тип, 3 – рассыпной тип

Fig. 2. Versions of vein branching according to V.N. Shevkunenko (1935): 1 – mainstream type, 2 – transitional type, 3 – scattered type

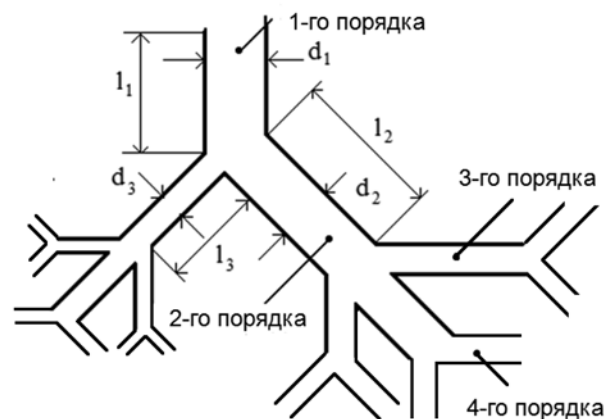


Рис. 3. Структура ветвления венозной системы прямой кишки человека

Fig. 3. The structure of the branching of the venous system of the human rectum

Далее по методике И.И. Гришиной (2006) на имеющихся рентгенограммах ректальных вен объектов исследования измерялись углы отхождения ветвей всех генераций во фронтальной плоскости органа. Статистическая обработка результатов сравнительного анализа изученных параметров углов образования ветвей портальной и кавальной систем прямой кишки объектов исследования в зависимости от типа полового диморфизма по J.M. Tanner осуществлялась при помощи программы SPSS Statistics 19.0.

Тип распределения определялся на основе критерия Шапиро – Уилка. Характеристика количественных признаков как с непараметрическим распределением, так и данных с параметрическим распределением осуществлялась с определением следующих параметров: среднее  $M$ , медиана  $Me$ , мода  $Mo$ , а также межквартильного интервала  $[Q_{25}; Q_{75}]$ . При сравнении двух независимых выборок данных с непараметрическим распределением использовался  $U$ -критерий Манна – Уитни. При сравнении трех независимых выборок данных

с непараметрическим распределением использовался критерий Краскела – Уоллиса. Проверка статистических гипотез в исследовании осуществлялась при уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При описании полученных рентгенограмм малого таза в прямой задней проекции исследуемых объектов, где рентгенконтрастными метками зафиксирован уровень перехода сигмовидной кишки в прямую, какой-либо рентгенпатологии не выявлено (рис. 4).

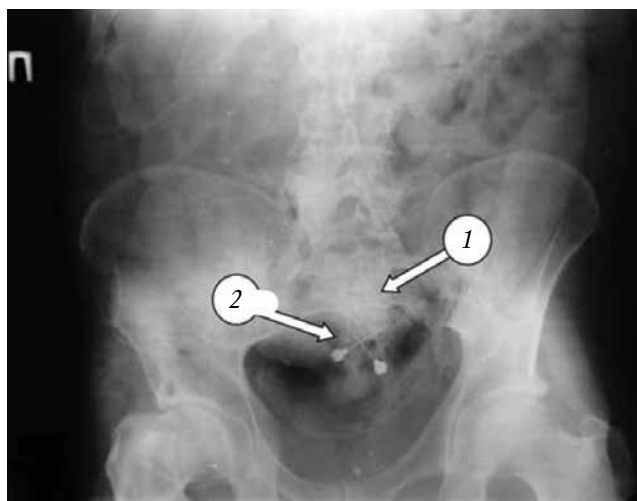


Рис. 4. Рентгенограмма малого таза трупа мужчины № 3543 в прямой задней проекции: 1 – крестцовый мыс, 2 – рентгенконтрастные метки

Fig. 4. X-ray of the small pelvis of the corpse of a man No. 3543 in posteroanterior view 1 – sacral promontory, 2 – radiopaque marker

Как видно на рис. 5, верхняя ректальная вена, начало которой соответствует уровню крестцового мыса, принимает в себя развитую сосудистую сеть от верхнего и среднего отделов ампулы прямой кишки. На уровне между ниже- и среднеампулярными отделами прямой кишки зафиксировано прохождение контрастного вещества в систему внутренней подвздошной вены по левой боковой стенке малого таза, что анатомически соответствует внутренней поверхности вертлужной впадины слева.

За счет проникновения контраста по порто-кавальным анастомозам на рентгенограмме хорошо визуализируется стенка прямой кишки на уровне нижеампулярного отдела. Верхняя ректальная вена здесь представлена единым стволом с впадающими в нее более мелкими ветвями, что соответствует магистральному типу ветвления сосудов.

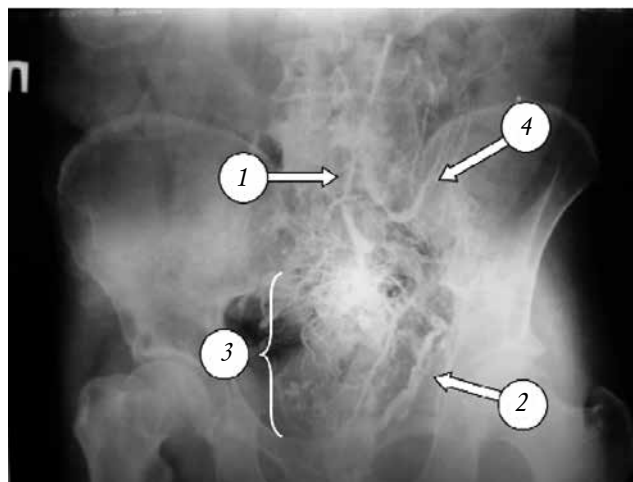


Рис. 5. Рентгенограмма малого таза трупа мужчины № 3543 в прямой задней проекции с контрастированием портальной системы прямой кишки: 1 – верхняя ректальная вена, 2 – внутренняя подвздошная вена, 3 – нижеампулярный отдел прямой кишки, 4 – сигмовидная вена

Fig. 5. X-ray of the small pelvis of the corpse of a man No. 3543 in posteroanterior view with contrasting of the portal system of the rectum: 1 – superior rectal vein, 2 – internal iliac vein, 3 – rectal lower ampulla, 4 – sigmoid vein

На рис. 6 представлен рентгенологический снимок систем внутренних подвздошных и нижней брыжеечной вен при применении 76%-го раствора урографина. На нем определяются множественные порто-кавальные анастомозы на уровне среднеампулярного отдела прямой кишки, что скелетотопически соответствует внутренним поверхностям вертлужных впадин таза.

Следовательно, разработанный способ дает возможность определить особенности параметров морфометрии, ветвления и пространственного расположения сосудистых образований прямой кишки по отношению к самому органу, а также костным структурам малого таза. Все объекты в результате антропометрического исследования были разделены на три группы: 1) группа гинекоморфного соматотипа – 34 объекта; 2) мезоморфного соматотипа – 32 объекта; 3) группа андроморфного соматотипа – 13 объектов.

При анализе рентгенограмм системы ректальных вен прямой кишки исследуемых объектов с учетом конституциональных особенностей выявлено, что верхняя ректальная вена объектов гинекоморфного типа по J.M. Tanner представлена ветвями четырех генераций, причем ветви, параллельные органу всех объектов исследования, имеют рассыпной тип ветвления в 100% случаях по В.Н. Шевкуненко (рис. 7).

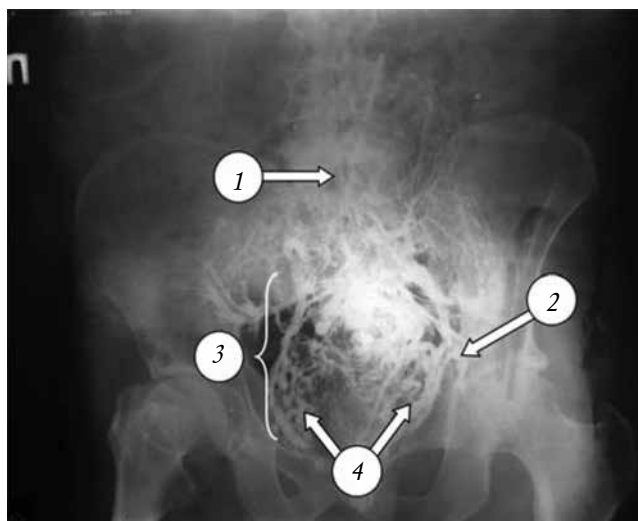


Рис. 6. Рентгенограмма органов малого таза трупа мужчины № 3543 в прямой задней проекции с контрастированием порто-кавальной системы прямой кишки: 1 – верхняя ректальная вена, 2 – внутренняя подвздошная вена, 3 – нижеампулярный отдел прямой кишки, 4 – выраженная венозная сеть по латеральным стенкам малого таза системы внутренних подвздошных вен

Fig. 6. X-ray of the pelvic organs of the corpse of a man No. 3543 in a posteroanterior view with contrasting of the porto-caval rectal system: 1 – superior rectal vein, 2 – internal iliac vein, 3 – rectal lower ampulla, 4 – marked venous network along the lateral walls of the pelvic system of the internal iliac veins

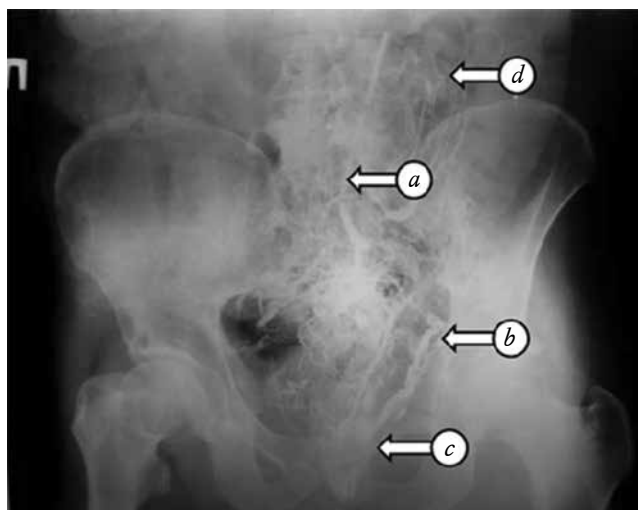


Рис. 7. Рентгенограмма органов малого таза трупа мужчины № 3543 гинекоморфного соматотипа по J.M. Tanner: а – верхняя ректальная вена, б – внутренняя подвздошная вена, с – нижеампулярный отдел прямой кишки, д – сигмовидная вена

Fig. 7. X-ray of the pelvic organs of the corpse of a man No. 3543 of the gyneco-morphic somatotype according to J.M. Tanner: a – superior rectal vein, b – internal iliac vein, c – rectal lower ampulla, d – sigmoid vein

Выявлено, что тип ветвления прямых органу сосудов (4-го порядка) верхней ректальной вены представителей гинекоморфного типа в  $(61 \pm 4,6)\%$  случаев характеризуется как одиночный, в  $(39 \pm 4,6)\%$  – как бифуркационный по Ю.М. Лопухину (портальный бассейн прямой кишки).

Кавальная система прямой кишки мужчин с признаками гинекоморфии также имеет ряд особенностей (рис. 8). Установлено, что типы ветвления и параллельных, и прямых органу сосудов этой системы не имеют достоверных различий в зависимости от стороны исследования и имеют рассыпной тип по В.Н. Шевкуненко и одиночный тип по Ю.М. Лопухину в 100% случаев.

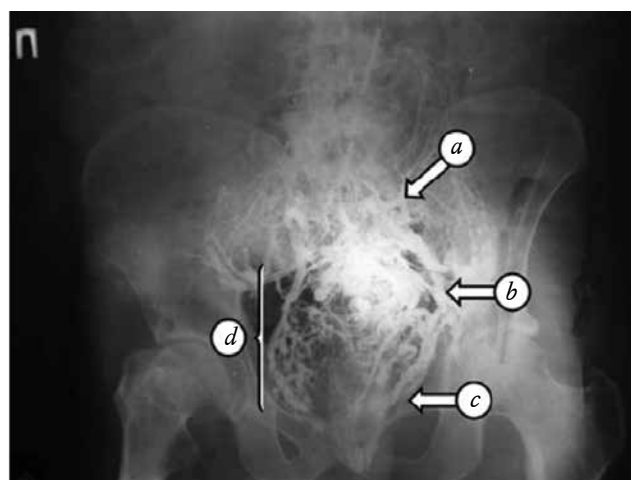


Рис. 8. Рентгенограмма органов малого таза трупа мужчины № 3543 гинекоморфного соматотипа по J.M. Tanner: а – верхняя ректальная вена, б – внутренняя подвздошная вена, с – нижеампулярный отдел прямой кишки, д – венозная сеть системы внутренних подвздошных вен

Fig. 8. X-ray of the pelvic organs of the corpse of a man No. 3543 of the gyneco-morphic somatotype according to J.M. Tanner: a – superior rectal vein, b – internal iliac vein, c – rectal lower ampulla, d – venous network of the internal iliac vein

Портальная система прямой кишки объектов группы мезоморфного типа телосложения по J.M. Tanner характеризуется невыраженной сосудистой сетью, которая локализуется на уровне верхне- и среднеампулярного отделов прямой кишки по латеральным поверхностям таза. Верхняя ректальная вена представлена ветвями четырех порядков. Тип ветвления сосудов, параллельных органу по классификации В.Н. Шевкуненко для всех объектов мезоморфного типа, характеризуется как рассыпной в 100% случаев (рис. 9).

Ветвление сосудов четвертого порядка верхней ректальной вены у мужчин данного сома-

тотипа имеет следующие особенности. В ( $59 \pm 6,01$ )% случаев тип ветвления сосудов четвертого порядка характеризуется как одиночный и в ( $41 \pm 6,01$ )% – как бифуркационный соответственно. Кавальная система представлена слабо выраженной сетью, анастомозирующей с системой верхней ректальной вены в основном на уровне среднеампулярного отдела прямой кишки. Как параллельные, так и прямые органу сосуды имеют рассыпной тип ветвления по В.Н. Шевкуненко и одиночный тип по Ю.М. Лопухину в 100% случаев (рис. 10).

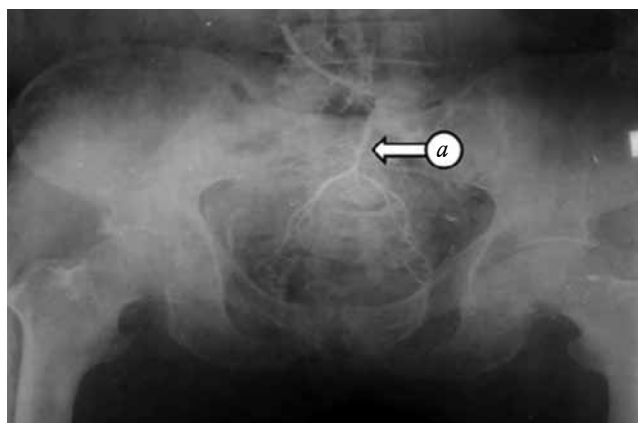


Рис. 9. Рентгенограмма органов малого таза трупа мужчины № 2253 мезоморфного соматотипа по J.M. Tanner: *a* – верхняя ректальная вена

Fig. 9. X-ray of the pelvic organs of the corpse of a man No. 2253 of the mesomorphic somatotype according to J.M. Tanner: *a* – superior rectal vein

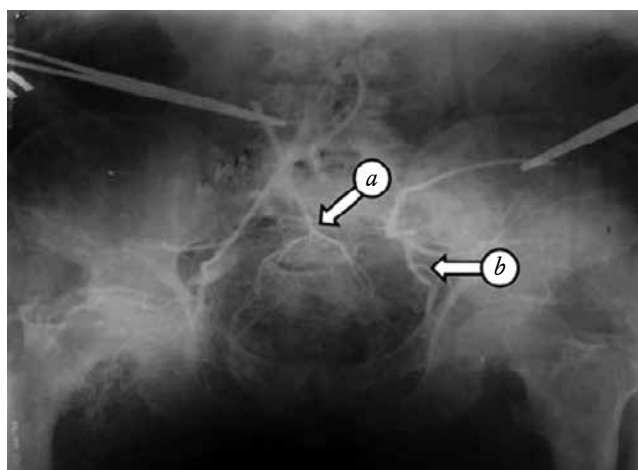


Рис. 10. Рентгенограмма органов малого таза трупа мужчины № 2253 мезоморфного соматотипа по J.M. Tanner: *a* – верхняя ректальная вена, *b* – внутренняя подвздошная вена

Fig. 10. X-ray of the pelvic organs of the corpse of a man No. 2253 of the mesomorphic somatotype according to J.M. Tanner: *a* – superior rectal vein, *b* – internal iliac vein

У представителей андроморфного типа телосложения ветви параллельные органу кавальной системы прямой кишки представлены рассыпным типом ветвления по классификации В.Н. Шевкуненко в 100% случаев. Ветвление же сосудов четвертого порядка верхней ректальной вены (прямые органу) по классификации Ю.М. Лопухина имеет следующие распределение: в ( $67 \pm 4,2$ )% случаев тип ветвления характеризуется как одиночный, в ( $21 \pm 3,7$ )% – как бифуркационный, в ( $12 \pm 1,8$ )% представлен пучковым типом ветвления (рис. 11).

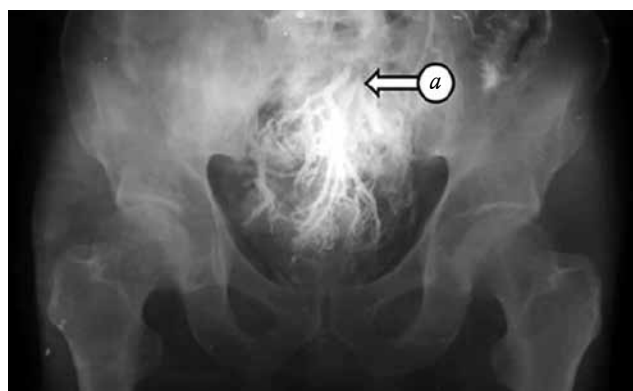


Рис. 11. Рентгенограмма органов малого таза трупа мужчины № 173 андроморфного соматотипа по J.M. Tanner: *a* – верхняя ректальная вена

Fig. 11. X-ray of the pelvic organs of the corpse of a man No. 173 of the andromorphic somatotype according to J.M. Tanner: *a* – superior rectal vein

Система кавальных вен прямой кишки представлена густой сосудистой сетью, которая локализована по латеральным стенкам малого таза, при этом порто-кавальные соустья определяются в основном на уровне среднеампулярного отдела прямой кишки (рис. 12).

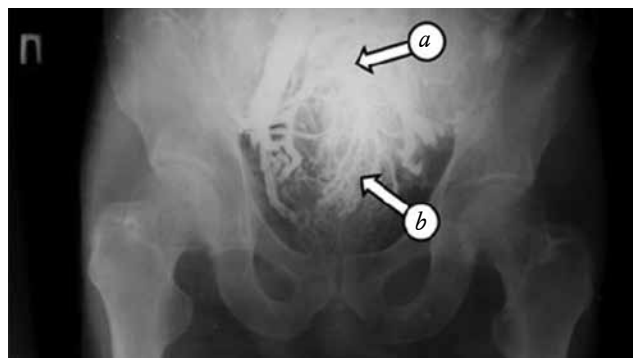


Рис. 12. Рентгенограмма органов малого таза трупа мужчины № 173 андроморфного соматотипа по J.M. Tanner: *a* – верхняя ректальная вена, *b* – внутренняя подвздошная вена

Fig. 12. X-ray of the pelvic organs of the corpse of a man No. 173 of the andromorphic somatotype according to J.M. Tanner: *a* – superior rectal vein, *b* – internal iliac vein

Установлено, что типы ветвления параллельных и прямых органу сосудов характеризуются рассыпным типом по классификации В.Н. Шевкуненко и одиночным типом по Ю.М. Лопухину в 100% случаев соответственно.

При сравнении значений показателей углов образования ветвей верхней ректальной вены трупов мужчин конституционально обусловленные статистически значимые отличия выявлены только для сосудов первого и второго порядков (табл. 1).

Таблица 1  
Table 1

Углы образования ветвей портальной системы прямой кишки объектов исследования в зависимости от соматотипа по J.M. Tanner, градус, $Me [Q_{25}; Q_{75}]$ Angles of formation of the branches of the portal system of the rectum of the objects of study, depending on the somatotype according to J.M. Tanner, degree, $Me [Q_{25}; Q_{75}]$				
Порядок ветвления Branching order	Соматотипы по J.M. Tanner, $n = 77$ Somatotypes according to J.M. Tanner, $n = 77$			Уровень значимости $p$ Level of significance $p$
	Гинекоморфный, $n_1 = 34$ Gyneco-morphic, $n_1 = 34$	Мезоморфный, $n_2 = 32$ Mesomorphic, $n_2 = 32$	Андроморфный, $n_3 = 13$ Andromorphic, $n_3 = 13$	
Первый First	64,29 [40,00; 91,51]	80,94 [65,00; 120,01]	60,17 [30,00; 80,51]	$p_{2-3,3-4} < 0,05$
Второй Second	82,06 [40,00; 95,25]	68,13 [40,00; 113,75]	61,25 [45,00; 91,00]	$p_{2-3,2-4} < 0,05$
Третий Third	45,06 [25,33; 72,50]	53,25 [36,25; 72,50]	48,75 [40,03; 70,50]	—

Установлено, что максимальное значение данного параметра для сосудов первого порядка характерно для лиц мезоморфного соматотипа. Так, в пределах межквартильного интервала его величина составляет 65,00–120,01°, в среднем 80,94°. Минимальные значения данного параметра найдены у представителей андро- и гинекоморфного соматотипов, при этом у андроморфов среднее значение угла образования ветвей первого порядка составляет 60,17° и 30,00–80,51° в пределах межквартильного интервала значения того же параметра для лиц гинекоморфного соматотипа в среднем – 64,29°, нарастая от 40,00 до 91,51° в пределах межквартильного промежутка. Для ветвей второго

порядка верхней ректальной вены объектов исследования выявлено, что максимальное значение угла их образования характерно для представителей гинекоморфного соматотипа (82,06° [40,00; 95,25°]). При этом отсутствуют статистически значимые различия по данному параметру для мужчин мезо- (68,13 [40,00; 113,75]°) и андроморфного (61,25 [45,00; 91,00]°) типов полового диморфизма.

В результате сравнительного анализа значений углов образования ветвей следующих порядков вен каваальной системы прямой кишки исследуемых объектов показано, что величина угла образования ветвей только первого порядка имеет конституциональные особенности (табл. 2).

Таблица 2  
Table 2

Углы образования ветвей кавальной системы прямой кишки объектов исследования в зависимости от соматотипа по J.M. Tanner, градус, <i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>25</sub> ; <i>Q</i> <sub>75</sub> ] Angles of formation of the branches of the caval system of the rectum of the objects of study, depending on the somatotype according to J.M. Tanner, degree, <i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>25</sub> ; <i>Q</i> <sub>75</sub> ]				
Порядок ветвления Branching order	Соматотипы по J.M. Tanner, <i>n</i> = 77 Somatotypes according to J.M. Tanner, <i>n</i> = 77			Уровень значимости <i>p</i> Level of significance <i>p</i>
	Гинекоморфный, <i>n</i> <sub>1</sub> = 34 Gyneco-morphic, <i>n</i> <sub>1</sub> = 34	Мезоморфный, <i>n</i> <sub>2</sub> = 32 Mesomorphic, <i>n</i> <sub>2</sub> = 32	Андроморфный, <i>n</i> <sub>3</sub> = 13 Andromorphic, <i>n</i> <sub>3</sub> = 13	
	Справа On the right			
Первый First	47,76 [39,15; 55,00]	69,06 [39,25; 107,50]	66,17 [40,15; 60,00]	<i>p</i> <sub>2-3,2-4,3-4</sub> < 0,05



Окончание табл. 2

End of table 2

Порядок ветвления Branching order	Соматотипы по J.M. Tanner, $n = 77$ Somatotypes according to J.M. Tanner, $n = 77$			Уровень значимости $p$ Level of significance $p$
	Гинекоморфный, $n_1 = 34$ Gyneco-morphic, $n_1 = 34$	Мезоморфный, $n_2 = 32$ Mesomorphic, $n_2 = 32$	Андроморфный, $n_3 = 13$ Andromorphic, $n_3 = 13$	
Второй Second	88,53 [80,11; 91,30]	97,19 [85,10; 150,30]	88,25 [45,01; 89,00]	—
Третий Third	77,12 [70,50; 90,00]	81,88 [81,25; 100,00]	82,83 [30,00; 83,00]	—
Слева On the left				
Первый First	53,82 [32,51; 55,12]	69,69 [36,25; 112,50]	60,83 [35,24; 50,12]	$p_{2-3,2-4,3-4} < 0,05$
Второй Second	89,19 [80,12; 100,56]	95,63 [85,02; 145,00]	88,05 [45,00; 100,50]	—
Третий Third	77,65 [31,56; 78,00]	64,38 [31,25; 100,00]	58,25 [30,50; 58,50]	—

Так, максимальное значение данного параметра характерно для объектов мезоморфного соматотипа, значение для которых справа составляет 69,06 [39,25; 107,50]°, а слева 69,69 [36,25; 112,50]°. Минимальные значения характерны для лиц гинекоморфного соматотипа (47,76 [39,15; 55,00]° справа, 53,82 [31,51; 55,12]° слева). Значения аналогичного параметра у мужчин андроморфного соматотипа занимают промежуточное положение. Параметры органометрии ветвей третьего и четвертого порядков вен каваальной системы прямой кишки для всех объектов исследования не имеют соматотипических особенностей вне зависимости от стороны исследования. При этом ветви первых двух генераций имеют статистически значимые отличия с учетом стороны исследования, за исключением представителей мезоморфного телосложения, однако это в свою очередь влияет на особенности оттока крови по исследуемой системе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный способ рентгенологического исследования венозной прямой кишки человека позволяет определить особенности ее сосудистой архитектоники. Рентгенологически выявленные структурные особенности ветвей верхней ректальной вены трупов мужчин разных соматотипов по J.M. Tanner заключаются в постоянстве рассыпного типа ветвления сосудов по классификации В.Н. Шевкуненко, параллельных органу этой системы, и в частой встречаемости одиночного типа по классификации Ю.М. Лопухина для прямых органу сосудов. Также установлено, что каваальная система прямой кишки исследуемых

объектов не имеет конституциональных особенностей и в 100% случаев представлена рассыпным типом ветвления параллельных органу сосудов по В.Н. Шевкуненко и одиночным типом – по Ю.М. Лопухину. Определены максимальные значения угла образования сосудов второго порядка портальной системы (88,53° [80,11; 91,30]) при минимальных значениях углов образования сосудов первого порядка каваальной системы (47,76° [39,15; 55,00] – справа, 53,82° [32,51; 55,12] – слева) с обеих сторон у трупов мужчин гинекоморфного соматотипа в сравнении с представителями мезо- и андроморфного соматотипов.

Выявленные особенности образования углов ветвей четырех генераций венозной системы прямой кишки и варианты их ветвления могут быть использованы для оценки влияния венозного оттока на структурные характеристики сосудистой системы стенки исследуемого органа. А при выборе тактики лечения заболеваний, связанных с венозной системой прямой кишки, в силу найденных соматотипических особенностей ее морфометрических параметров, врач должен учитывать конституциональные особенности венозной системы прямой кишки человека.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гелашвили П.А., Галахов Б.Б., Юхимец С.Н., Панидов К.В. Морфологические особенности венозных конструкций стенки анального канала прямой кишки человека. *Морфологические ведомости*. 2009; 3–4: 155–157. [Gelashvili P.A., Galahov B.B., Juhimec S.N., Panidov K.V. Morphological features of venous structures of the anal canal wall of the human rectum. *Morphological Records*. 2009; 3–4: 155–157 (in Russ.).]

2. Николаев В.Г., Батухтина Н.П., Деревцова С.Н., Ершов А.В. Варианты сосудов тела человека: учебное пособие. Красноярск: ЛИТЕРА-принт, 2009: 164. [Nikolaev V.G., Batuhtina N.P., Derevcova S.N., Ershov A.V. Variants of the vessels of the human body: tutorial. Krasnoyarsk: LITERA-print Publ., 2009: 164 (in Russ.)].
3. Zbar A.P., Guo M., Pescatori M. Anorectal morphology and function: analysis of Shafik legacy. *Tech. Coloproctol.* 2008; 12: 191–200.
4. Пикалюк В.С., Мороз Г.А., Кутя С.А. Методическое пособие по изготовлению анатомических препаратов. Симферополь: Изд-во КГМУ, 2004: 100. [Pikaljuk V.S., Moroz G.A., Kutja S.A. Methodical tool for manufacturing anatomical drugs. Simferopol: Publishing of KSMU Publ., 2004: 100 (in Russ.)].
5. Русских А.Н., Шабоха А.Д., Самотесов П.А., Горбунов Н.С., Большаков И.Н., Залевский А.А., Шеховцова Ю.А., Кан И.В., Шнякин П.Г., Макаров А.Ф. Способ изготовления муляжей вен прямой кишки человека при помощи пластмассы холодной полимеризации. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2013; 1: 56–59. [Russikh A.N., Shaboha A.D., Samotesov P.A., Gorbunov N.S., Bol'shakov I.N., Zalevskij A.A., Shehovcova Ju.A., Kan I.V., Shnjakin P.G., Makarov A.F. Method of making models of human rectum veins with a cold plastic polymer. *Clinical and Experimental Morphology.* 2013; 1: 56–59 (in Russ.)].
6. Способ изготовления муляжей вен прямой кишки человека: пат. 2545921 Рос. Федерация: МПК51 G09B 23/28 / Русских А.Н., Шабоха А.Д., Андрейчиков А.В. и др.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. № 2013114646/14, заявл. 01.04.2013; опубл. 10.04.2015. Бюл. № 10. 8 с. [Russikh A.N., Shabokha A.D., Andreychikov A.V. et al. Method of manufacturing of models of veins of the human rectum. Patent RF, No. 2545921, 2015 (in Russ.)].
7. Авдулевский В.Д., Колбенева Е.И. Эндоваскулярная хирургия – новый раздел рентгенологии. *Бюллетень медицинских интернет-конференций.* 2013; 3 (12): 13–18. [Avdulevskij V.D., Kolbenev E.I. Endovascular surgery is a new section of roentgenology. *Bulletin of Medical Internet Conferences.* 2013; 3 (12): 13–18 (in Russ.)].
8. Левин М.Д., Дегтярев Ю.Г., Аверин В.И., Абуварда Й.Ф., Болбас Т.М. Стандартизация рентгенологического исследования толстой кишки и аноректальной зоны. *Новости хирургии.* 2013; 21 (4): 90–98. [Levin M.D., Degtjarev Ju.G., Averin V.I., Abu-varda J.F., Bolbas T.M. Standardization of X-ray examination of the colon and anorectal zone. *News of Surgery.* 2013; 21 (4): 90–98 (in Russ.)].
9. Wheaton A.J., Miyazaki M. Non contrast enhanced MR angiography: physical principles. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2012; 36 (2): 286–304.
10. Бурякина С.А., Кармазановский Г.Г. Клиническое значение контрастных методов исследований. Часть 1. Периферическое кровообращение. Основные понятия физиологии и биомеханики. *Медицинская визуализация.* 2011; 2: 125–134. [Burjakina S.A., Karmazanovskij G.G. Clinical significance of contrast methods of research. Part 1. Peripheral blood circulation. Basic concepts of physiology and biomechanics. *Medical Visualization.* 2011; 2: 125–134 (in Russ.)].
11. Митин В.Н., Налетова К.Н. Рентгенография и рентгенанатомия органов брюшной полости. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные.* 2007; 1: 2–8. [Mitin V.N., Naletova K.N. Radiography and X-ray anatomy of the abdominal cavity. *Russian Veterinary Journal. Small Domestic and Wild Animals.* 2007; 1: 2–8 (in Russ.)].
12. Гаврилов С.Г., Максимова М.А., Каралкин А.В., Москаленко Е.П., Беляева Е.С. Мультиспиральная компьютерная томография в диагностике варикозной болезни вен таза. *Анналы хирургии.* 2010; 5: 68–71. [Gavrilov S.G., Maksimova M.A., Karalkin A.V., Moskalenko E.P., Beljaeva E.S. Multispiral computed tomography in the diagnosis of varicose veins of the pelvis. *Annals of Surgery.* 2010; 5: 68–71 (in Russ.)].
13. Способ диагностики варикозной болезни вен таза у женщин: пат. 2428918 Рос. Федерация: МПК51 A61B5/00 / Гаврилов С.Г., Максимова М.А., Каралкин А.В. и др.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО РГМУ Росздрава. № 2010114777/14; заявл. 14.04.2010; опубл. 20.09.2011, Бюл. № 26. 8 с. [Gavrilov S.G., Maksimova M.A., Karalkin A.V. et al. Method of diagnosis of varicose veins of the pelvis in women. Patent RF, No. 2428918, 2011 (in Russ.)].
14. Способ контроля качества проведения радикальной хирургической обработки (РХО) при ревизии и удалении эндопротезов коленного сустава в условиях раневой инфекции: пат. 2273454 Рос. Федерация: МПК51 A61B17/00 / Крук Н.Н., Тараненко М.Ю.; заявитель и патентообладатель ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росздрава». № 2004121275/14; заявл. 12.07.2004; опубл. 10.04.2006, Бюл. № 10. 4 с. [Kruk N.N., Taranenko M.Yu. Method for quality control of radical surgical treatment (RST) during revision and removal of knee endoprostheses in conditions of wound infection. Patent RF, No. 2273454, 2006 (in Russ.)].
15. Способ рентгенологического исследования порто-кавальной системы прямой кишки человека в эксперименте: пат. 2541830 Рос. Федерация: МПК51 G09B 23/28, A61B 6/00, A61K 49/04 / Русских А.Н., Шабоха А.Д., Горбунов Н.С. и др.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. № 2013152561/14, заявл. 26.11.2013; опубл. 20.02.2015, Бюл. № 5, 8 с. [Russikh A.N., Shabokha A.D., Gorbunov N.S., et al. Method of X-ray examination of the human port-caval system of the rectum in the experiment. Patent RF, No. 2541830, 2015 (in Russ.)].

16. Гайворонский И.В., Сотников А.С., Лазаренко В.А. Пластичность венозного и микроциркуляторного русла органов желудочно-кишечного тракта в аспекте проблемы коллатерального кровообращения. Белгород: Белгородская областная типография, 2005: 125. [Gajvoronskij I.V., Sotnikov A.S., Lazarenko V.A. Plasticity of the venous and microcirculatory bed of the gastrointestinal tract in the aspect of the collateral circulation problem. Belgorod: Belgorod Regional Printing House, 2005: 125 (in Russ.)].
17. Гусейнов Т.С. Вариантная анатомия воротной вены человека. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2013; 3 (5): 916. [Gusejnov T.S. Variant anatomy of the portal vein of a man. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2013; 3 (5): 916 (in Russ.)].
18. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999: 459. [Glanc S. Medical and Biological Statistics. Moscow: Practice, 1999: 459 (in Russ.)].
19. Корнетов Н.А. Концепция клинической антропологии в медицине. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008; 1: 7–32. [Kornetov N.A. The concept of clinical anthropology in medicine. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2008; 1: 7–32 (in Russ.)].
20. Шевкуненко В.Н. Атлас периферической нервной и венозной систем. М.: МЕДГИЗ, 1949: 345. [Shevkunenko V.N. Atlas of peripheral nervous and venous systems. Moscow: MEDGIZ Publ., 1949: 345 (in Russ.)].
20. Tanner J.M. Physical development. *Brit. Med. Bull.* 1986; 42 (2): 131–138.

---

## Сведения об авторах

Русских Андрей Николаевич, канд. мед. наук, доцент, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, КГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Шабоха Анна Дмитриевна, канд. мед. наук, ст. преподаватель, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, КГМУ имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) Шабоха Анна Дмитриевна, e-mail: tat\_yak@mail.ru.

## Authors information

Russkikh Andrey N., PhD, Associate Professor, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Shabokha Anna D., PhD, Senior Lecturer, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) Shabokha Anna D., e-mail: tat\_yak@mail.ru.

## Интрастромальная имплантация трековых мембран с пренатальными стромальными клетками человека при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте

Филиппова Е.О.<sup>1,2</sup>, Кривошеина О.И.<sup>2</sup>, Хлусов И.А.<sup>1,2,3</sup>, Пичугин В.Ф.<sup>1</sup>,  
Дзюман А.Н.<sup>2</sup>, Зайцев К.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

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

<sup>3</sup> Сибирский федеральный научно-клинический центр (СибФНКЦ) ФМБА России  
Россия, 636035, Томская область, г. Северск, ул. Мира, 4

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы.** Провести исследование применения трековых мембран (ТМ) на основе полиэтилен-терефталата (ПЭТФ), в том числе модифицированных холодной плазмой с наслоением на их поверхность культуры пренатальных стромальных клеток (ПСК) человека в хирургическом лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) роговицы.

**Материалы и методы.** ТМ получали путем облучения ПЭТФ ионами  $^{40}\text{Ar}^{+8}$  и химического травления. ЭЭД роговицы моделировали на 16 кроликах породы *Sylvilagus bachmani*, разделенных на четыре группы. Группа 1 – ЭЭД роговицы без лечения; группа 2 – ЭЭД с имплантацией в собственное вещество роговицы немодифицированной плазмой ТМ; группа 3 – ЭЭД с имплантацией в роговицу немодифицированной плазмой ТМ и наслоенной культурой ПСК человека; группа 4 – ЭЭД с имплантацией модифицированной плазмой ТМ и наслоенной культурой ПСК человека. Спустя 8 нед от начала эксперимента производили гистологическое исследование роговицы кроликов.

**Основные результаты.** Имплантация ТМ в строму роговицы при ЭЭД роговой оболочки способствует уменьшению (в 1,5 раза) отека ее собственного вещества и более интенсивному (в 1,7 раза) накоплению фибробластов вблизи ТМ по сравнению с состоянием роговицы в группе модели заболевания без лечения. Наличие ПСК человека на поверхности ТМ независимо от исходного состояния полимерного материала после интрастромальной имплантации индуцирует пролиферацию фибробластов в 1,5–1,8 раз и неоваскуляризацию стромы роговицы в 1,8–2,0 раза по сравнению с имплантацией ТМ без культуры клеток. Степень гидратации собственного вещества роговой оболочки при этом уменьшается в 1,3–1,5 раза. Модификация ТМ холодной плазмой не оказывает влияния на изученные морфометрические показатели роговицы.

**Заключение.** Имплантация ТМ из ПЭТФ при ЭЭД способствует развитию продуктивной фазы инфильтративного воспаления в роговице глаза кроликов. Предварительная *in vitro* адгезия ПСК человека на ТМ уменьшает выраженность деструктивных изменений роговицы кролика после моделирования ЭЭД. Модификация ТМ холодной плазмой не влияет на изученные морфометрические показатели роговицы.

**Ключевые слова:** роговица, эндотелиально-эпителиальная дистрофия, трековые мембраны, пренатальные стромальные клетки человека.

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00048.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 3898 от 24.11.2014).

**Для цитирования:** Филиппова Е.О., Кривошеина О.И., Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Дзюман А.Н., Зайцев К.В. Интрастромальная имплантация трековых мембран с пренатальными стромальными клетками человека при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 157–164. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-157-164>.

УДК 616.831-018.8-073.97

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-157-164>

## Intrastromal implantation of track-etched membranes overlaid by prenatal stromal cells for bullous keratopathy in the experiment

Filippova E.O.<sup>1,2</sup>, Krivosheina O.I.<sup>2</sup>, Khlusov I.A.<sup>1,2,3</sup>, Pichugin V.F.<sup>1</sup>, Dzyuman A.N.<sup>2</sup>, Zaitsev K.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)  
30, Lenina Ave., Tomsk, 634050, Russian Federation

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

<sup>3</sup> Federal Siberian Research Clinical Center FMBA of Russia  
4, Mira Str., Seversk, 636035, Russian Federation

### ABSTRACT

**The aim of the research** is to study the possibility of using track-etched membrane, including track-etched membranes modified with cold plasma, followed by layering prenatal stem cells (PSC) on the material surface in surgical treatment of bullous keratopathy (BK).

**Materials and methods.** The track membranes made of polyethylene terephthalate were obtained by irradiating the polymeric film with the  $^{40}\text{Ar}^{+8}$  ion beams and by chemical etching. The study was conducted on 16 rabbits (*Sylvilagus bachmani*), which after BK modelling were divided into 4 groups: the 1<sup>st</sup> group was a control group of 4 animals (4 eyes); the 2<sup>nd</sup> group was a group of 4 animals (4 eyes) into which were implanted TM; the 3<sup>rd</sup> group was a group of 4 animals (4 eyes) into which were implanted TM with PSC; the 4<sup>th</sup> group was a group of 4 animals (4 eyes) into which were implanted plasma modified TM with PSC. TM was obtained by irradiating the PET film with  $^{40}\text{Ar}^{+8}$  ions and subsequent chemical etching. The eyes were enucleated for histological examination after 8 weeks from the start of the experiment.

**Results.** As a result of the research, it was found that the implantation of TM with a preliminary layering of human PSC promotes the growth of the fibroblast population in the cornea stroma and intensifies leukocyte (lymphocytes and eosinophilic granulocytes) infiltration as opposed to the implantation of PET TM without a cellular component. In addition, the implantation of TM contributes to a twofold decrease in the cornea edema induced by BK. Modification of TM with cold plasma did not affect the studied histomorphometric parameters. **Conclusion.** The implantation of TM based on PET during bullous keratopathy contributed to the development of the productive phase of infiltrative inflammation in the cornea of the eye. Pre-layering of human PSC reduced the severity of destructive changes in the rabbit cornea after BK modeling. The modification of TM by cold plasma did not affect the studied histomorphometric parameters.

**Key words:** cornea, bullous keratopathy, track etched-membranes, human stromal cells.

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

**Sources of funding.** The research was conducted with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) as part of the project No. 18-315-00048.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the ethics committee at SSMU (Protocol No. 3898 of 24.11.2014).

**For citation:** Filippova E.O., Krivosheina O.I., Khlusov I.A., Pichugin V.F., Dzyuman A.N., Zaitsev K.V. Intrastromal implantation of track-etched membranes overlaid by prenatal stromal cells for bullous keratopathy in the experiment. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 157–164. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-157-164>.

## ВВЕДЕНИЕ

Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы – хроническое прогрессирующее заболевание роговицы, в основе патогенеза которого лежит необратимое уменьшение численности клеток заднего эпителия и, как следствие, утрата ими барьерной и насосной функций, что ведет к развитию отека, снижению зрения и появлению у пациента болевого симптома. Лечение ЭЭД роговицы не всегда обеспечивает стабильные клиничко-функциональные результаты [1–3], что обуславливает поиск и разработку материалов, способных поддерживать роговицу в слабо дегидратированном состоянии. Особый интерес представляют трековые мембраны на основе полиэтилентерефталата (ПЭТФ). Величина поверхностной энергии трековых мембран из ПЭТФ достаточно мала ( $32 \text{ мДж/м}^2$ ) [4], поэтому степень гидрофильности данного материала является критичной для использования мембран в качестве имплантата и подложки для адгезии клеток. Для повышения смачиваемости мембран и улучшения адгезии на них культуры клеток [5] возможна модификация поверхности полимерных материалов, в частности, с помощью низкотемпературной плазмы атмосферного давления. Преимуществами метода являются малая глубина проникновения частиц плазмы и изменение свойств только поверхностного слоя материала без существенной тепловой нагрузки [6]. Возможно, использование гидрофильных трековых мембран с дополнительным наслоением на их поверхность пренатальных стромальных клеток человека при лечении ЭЭД роговицы позволит стабилизировать течение заболевания.

Цель работы – изучить возможность применения трековых мембран, в том числе модифицированных холодной плазмой, с последующим наслоением на их поверхность культуры прена-

тальных стромальных клеток человека для коррекции эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы трековых мембран (ТМ) изготавливались путем обработки ионами  $^{40}\text{Ar}^{+8}$  и химического травления пленки ПЭТФ. Модификацию поверхности полученных мембран проводили в НИ ТПУ с использованием экспериментальной установки низкотемпературной плазмы атмосферного давления. Время обработки – 30 с. Пленки стерилизовали посредством  $\gamma$ -облучения радионуклидом  $^{60}\text{Co}$  в дозе 1 кГр (Si). Физико-химическое тестирование ТМ проводилось по стандартной методике.

Изучение *in vivo* биосовместимости ТМ осуществлялось на 16 кроликах породы *Sylvilagus bachmani* массой 3,5–4,0 кг. Каждому животному предварительно моделировали ЭЭД роговицы путем механического повреждения и удаления заднего эпителия одного из глаз. Через 2 нед после развития заболевания кролики в зависимости от планируемого лечения были разделены на четыре группы. Группа 1 (контрольная) – 4 кролика с ЭЭД роговицы (4 глаза); группа 2 – 4 животных с ЭЭД (4 глаза), которым в строму роговой оболочки имплантировали немодифицированную плазмой ТМ; группа 3 – 4 животных с ЭЭД (4 глаза), которым имплантировали в роговицу немодифицированную плазмой ТМ с наслоением на поверхность культурой пренатальных стромальных клеток (ПСК) человека; группа 4 – 4 животных с ЭЭД (4 глаза), которым имплантировали модифицированную плазмой ТМ с наслоением на поверхность культурой ПСК человека.

На ТМ предварительно высаживали культуру ПСК, выделенную в 2004 г. из легкого 11-недельного эмбриона человека и поддерживаемую

*ex vivo* (линия FL-42, ООО «Банк стволовых клеток», г. Томск). Стерильные ТМ помещали в лунки 24-луночных культуральных планшетов (Orange Scientific, Бельгия), содержащие взвесь ПСК человека в концентрации  $3 \times 10^4$  жизнеспособных кариоцитов в 1 мл полной культуральной среды. Через 72 ч культивирования при 37 °C и 100%-й влажности в воздушной атмосфере (после достижения клеточного монослоя) ТМ с наслоенной культурой ПСК человека имплантировали кроликам 3-й и 4-й групп.

Имплантация ТМ осуществлялась в условиях операционной на фоне наркоза (внутривенное введение золетила (Virbac Sante Animale, Франция), 15 мг/кг). После обработки операционного поля с соблюдением правил асептики и антисептики в роговице животных с предварительно индуцированной ЭАД формировали два тоннельных (до глубоких слоев стромы) надреза в 1,5 мм от лимба к центру роговицы шириной 1,2 мм с ориентацией на 3 и 9 ч. С помощью шпателя через оба тоннельных надреза формировали интрастромальный «карман» в собственном веществе роговицы. Далее в один из тоннельных надрезов вводили канговый пинцет, проводя его сквозь расслоенное собственное вещество «кармана», и выводили через противоположный тоннельный надрез, где браншами пинцета захватывали свернутую валиком ТМ. Во время обратного движения пинцета ТМ имплантировали в интрастромальный «карман» роговицы. С помощью шпателя ТМ аккуратно расправляли. Адаптацию краев тоннельных надрезов обеспечивали путем гидратации.

Спустя 8 нед от начала исследования кроликов выводили из эксперимента, выполняли энуклеацию оперированных глаз, полученный материал фиксировали для световой микроскопии. Умерщвление экспериментальных животных осуществляли с соблюдением правил и норм Европейского общества (86/609ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Срезы роговицы окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Ван Гизона и полихромным красителем по Маллори. Для подсчета числа фибробластов, удельного объема сосудов, площади отека и параметров клеточной лейкоцитарной инфильтрации (количество лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, базофилов) в полученных срезах использовали световой микроскоп ЛОМО Биолам АУ-12 (Россия), окуляры  $\times 7$ ,  $\times 40$ ,  $\times 90$ , собственное увеличение микроскопа  $\times 1,5$ , окулярную сетку Автандилова на 50 точек, окулярную вставку с известной площадью. Морфометрию срезов

проводили с помощью компьютерной программы ImageJ 1.46.

Для статистического анализа полученных результатов применялся статистический пакет IBMSPSS Statistics 20. Рассчитывали следующие параметры выборок: медиану  $Me$ , 25%-й и 75%-й квартили. Результаты представлены в виде  $Me (Q_1-Q_3)$ , а также  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – ошибка среднего. Для оценки исходной сопоставимости экспериментальных групп для количественных данных применяли критерий Краскела – Уоллиса, для номинальных – точный  $F$ -критерий Фишера. Анализ динамики показателей проводили с помощью парного критерия Вилкоксона. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали  $U$ -критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам световой микроскопии, через 8 нед от начала эксперимента у животных 1-й группы (контроль) в переднем эпителии роговицы обнаруживались клетки с признаками гидропической дегенерации. В собственном веществе наблюдался неравномерно выраженный отек (удельный объем  $(28,3 \pm 10,1)\%$ ), в передней трети – новообразованные сосуды (удельный объем  $(2,5 \pm 1,9)\%$ ), умеренная лейкоцитарная инфильтрация (рис. 1, таблица). Набухшие коллагеновые волокна располагались рыхло. Передняя и задняя пограничные мембраны имели нормальное строение. Задний эпителий частично отсутствовал, частично был замещен клетками отростчатой формы.

У животных 2-й группы обнаруживались выраженный отек собственного вещества (удельный объем  $(18,83 \pm 5,8)\%$ ), разволокнение и нарушение тинкториальных свойств коллагеновых волокон преимущественно вокруг ТМ. Удельный объем новообразованных сосудов составлял  $(3,2 \pm 2,3)\%$  (рис. 2, см. таблицу). Между передним эпителием роговицы и ТМ коллагеновые волокна располагались более компактно. Между задним эпителием и ТМ обнаруживалась грануляционная ткань. Передний и задний эпителий, а также передняя и задняя пограничные мембраны были без особенностей и соответствовали строению таковых у животных 1-й группы.

В 3-й группе передний эпителий роговицы был сохранен на всем протяжении. Непосредственно под передней пограничной мембраной, которая слабо просматривалась, в собственном веществе обнаруживались скопления фибробластов ( $(133 \pm 26)$  клеток в поле зрения) (см. таблицу).



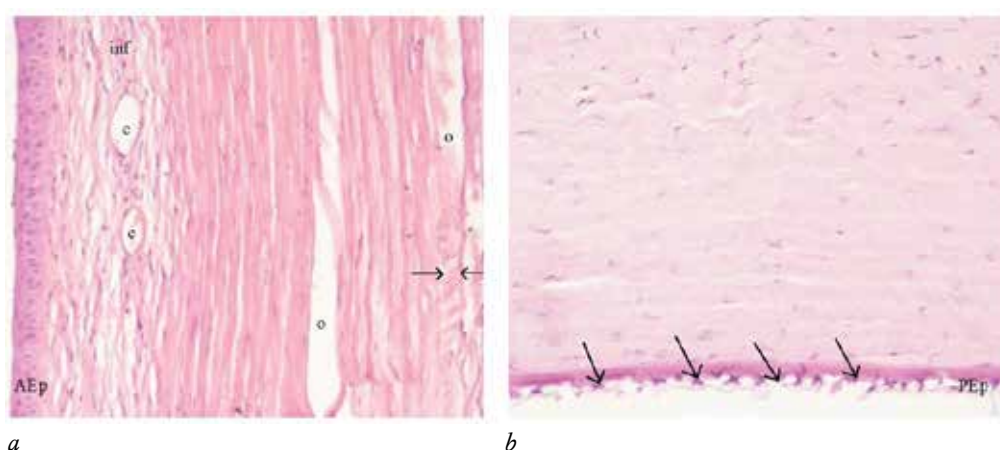


Рис. 1. Фрагмент роговицы кролика 1-й группы: передний (а) и задний (б) отделы, отек (о), гидратированные коллагеновые волокна (горизонтальные стрелки), новообразованные сосуды (с), клеточная инфильтрация (инф), отростчатые клетки (косые стрелки) на месте заднего эпителия (ЗЭп), ПЭп – передний эпителий. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

Fig. 1. Anterior (a) and posterior (b) epithelium of the cornea of the 1st group: edema (o), hydrated collagen fibers (horizontal arrows), newly formed vessels (c), cellular infiltration (inf), process-shaped cells (slanting arrows). Stained with hematoxylin and eosin,  $\times 200$

Таблица  
Table

Морфометрические показатели посттравматической реакции роговицы спустя 6 нед от начала моделирования эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы, Morphometric indicators of the posttraumatic reaction of the cornea 6 weeks after the start of modelling endothelial epithelial dystrophy, $Me (Q_1-Q_3)$									
№ группы Group No	Группа животных Group of animals	Толщина роговицы, Мкм Corneal thickness, mcm	Отек, уд. объем, % Edema, specific volume, %	Сосуды, уд. объем, % Vessels, pecific volume, %	Фибробласты, клеток в поле зрения, $\times 200$ Fibroblasts, number of cells per vision field, $\times 200$	Лейкоцитарная инфильтрация, число клеток в поле зрения, $\times 200$ Leukocyte infiltration, number of cells per vision field, $\times 200$			
						Лимфоциты Lymphocytes	Моноциты Mono-cytes	Эозинофилы Eosino-phils	Базофилы Baso-phils
1	ЭЭД роговицы (контроль) BK	650 (645–655)	28,3 (26–30)	2,5 (2,3–2,7)	54,3 (51–58)	10,8 (9–11,8)	4,6 (3–5,3)	0,2 (0,1–0,3)	0
2	ЭЭД роговицы + ТМ BK + ТМ	628* (622–634) $p_1 < 0,05$	18,83* (16–19,3) $p_1 < 0,05$	3,2 (3,1–5,5)	90,1* (86,3–93,7) $p_1 < 0,05$	37,3* (35,6–38,1) $p_1 < 0,05$	8,3 (7–9,9)	11,6* (9,8–12,3) $p_1 < 0,05$	1,1* (0,9–1,3) $p_1 < 0,05$
3	ЭЭД роговицы + ТМ с ПСК BK + ТМ with PSC	599* (597–603) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	14,4* (12,9–15,8) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	6,52 (6–6,8)	132,8* (129,8–134) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	28,3* (26,8–29,9) $p_1 < 0,05$	3,6 (3,5–3,8)	34,3* (30,1–36,4) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	3,0* (2,6–3,4) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
4	ЭЭД роговицы + модифицированная плазмой ТМ с ПСК BK + plasma modified TM with PSC	605* (603–607) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	12,58* (10,8–13,5) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	5,35 (5,1–5,5)	159,9* (155,9–163,1) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	23,3* (20,8–27,1) $p_1 < 0,05$	6,0 (5,7–6,3)	49,3* (46–53) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	6,1* (5,7–6,5) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание. ЭЭД – модель эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы; ТМ – трековая мембрана; ПСК – пренатальные стромальные клетки.

\*  $p_{1-3}$  – статистически значимые различия по сравнению с соответствующими группами исследования (U-критерий Манна – Уитни).

Note. BK – the model of bullous keratopathy; TM – track etched-membrane.

\*  $p_{1-3}$  – statistically significant differences compared to the groups 1–3 according to the U-test.

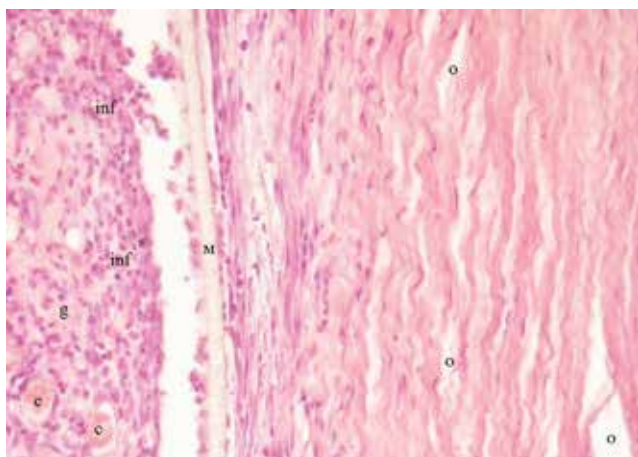


Рис. 2. Фрагмент роговицы кролика 2-й группы: грануляционная ткань (гр), неравномерно выраженный интерстициальный отек (о), полнокровие новообразованных сосудов (с), клеточная инфильтрация (инф) в месте имплантации трековой мембраны (М). Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

Fig. 2. The corneal fragment of the rabbit from the 2<sup>nd</sup> group: granulation tissue (g), irregularly pronounced edema (o), full-blooded newly-formed vessels (c), cellular infiltration (inf) at the site of implantation of the TM (M). Stained with hematoxylin and eosin,  $\times 200$

На поверхности ТМ наблюдались единичные клетки фибробластоподобной формы (рис. 3). В собственном веществе роговицы выявлялись неравномерно выраженный отек (удельный объем  $(14,4 \pm 6,3)\%$ ), новообразованные сосуды (удельный объем  $(6,52 \pm 3,9)\%$ ), лимфо-лейкоцитарная инфильтрация (см. таблицу). Вблизи ТМ располагались набухшие, рыхлые коллагеновые волокна. Задняя пограничная мембрана имела нормальное строе-

ние. Строение заднего эпителия было сходным с таковым у кроликов 1-й, 2-й групп.

У кроликов 4-й группы передний эпителий имел нормальное строение. Под нечетко просматриваемой передней пограничной мембраной, как и в 3-й группе, выявлялись скопления фибробластов  $((159,9 \pm 35)$  клеток в поле зрения) (рис. 4, см. таблицу).

На поверхности ТМ наблюдались единичные клетки фибробластоподобной формы. Отек собственного вещества был незначителен (удельный объем  $(12,58 \pm 5,1)\%$ ) (см. таблицу). На отдельных участках коллагеновые волокна располагались рыхло. Задняя пограничная мембрана – без особенностей. Строение заднего эпителия было сходным с таковым у кроликов 1-, 2-, 3-й групп.

Согласно результатам исследования, имплантация ТМ в собственное вещество роговицы при ЭЭД роговой оболочки способствует уменьшению (в 1,5 раза) отека ее собственного вещества и более интенсивному (в 1,7 раза) накоплению фибробластов вблизи ТМ по сравнению с состоянием роговицы в группе модели заболевания без лечения. Наличие ПСК человека на поверхности ТМ независимо от исходного состояния полимерного материала после интрастромальной имплантации индуцирует пролиферацию фибробластов в 1,5–1,8 раза и неоваскуляризацию собственного вещества роговицы в 1,8–2,0 раза по сравнению с имплантацией ТМ без культуры клеток. Степень гидратации собственного вещества роговой оболочки при этом уменьшается в 1,3–1,5 раза. Модификация ТМ холодной плазмой не оказывает влияния на изученные морфометрические показатели роговицы (см. таблицу).

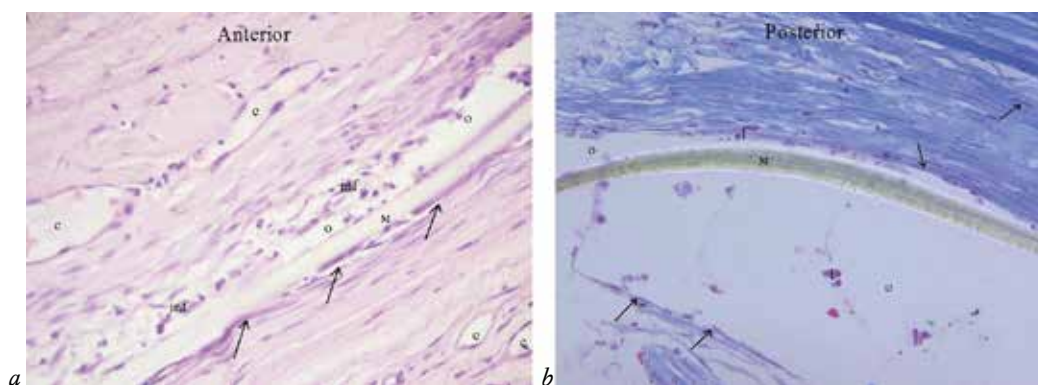


Рис. 3. Фрагмент роговицы кролика 3-й группы: выраженный отек (о), новообразованные сосуды (с), единичные лейкоциты (л), клеточная инфильтрация (инф) собственного вещества роговицы и фибробласты (стрелки) на поверхности трековой мембраны (М). Окраска гематоксилином и эозином (а), полихромным красителем по Маллори (b),  $\times 200$

Fig. 3. The corneal fragment of the rabbit from 3<sup>rd</sup> group: irregular edema (o), new blood vessels (c), single leukocytes (l), cellular infiltration (inf) of corneal stroma and fibroblasts (arrows) on the surface of TM (M) in the 3<sup>rd</sup> group. Stained with hematoxylin and eosin (a) and Mallory polychrome dye (b),  $\times 200$

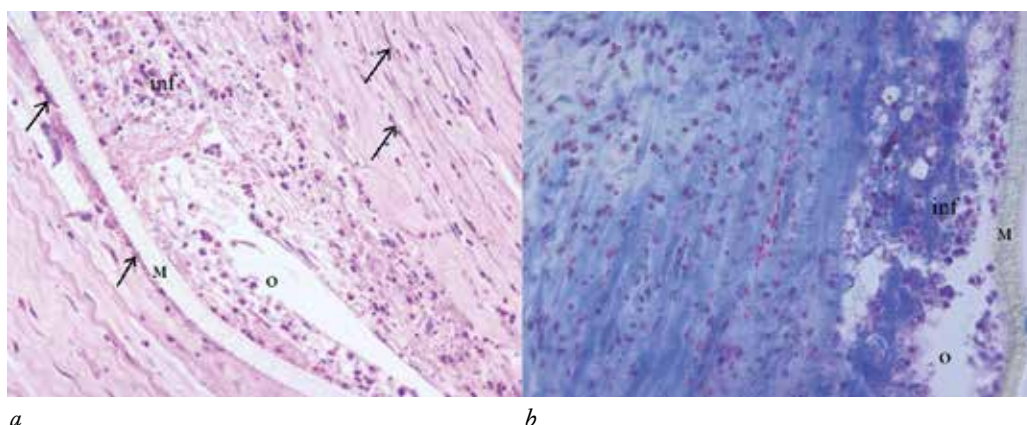


Рис. 4. Фрагмент роговицы кролика 4-й группы: фибробласты (стрелки) в собственном веществе роговицы и на поверхности трековой мембраны (М), инфильтрация (инф), отек (о). Окраска гематоксилином и эозином (а) и полихромным красителем по Маллори (b),  $\times 200$

Fig. 4. Fibroblasts (arrows) in the cornea stroma, TM (M), leukocyte infiltration (inf), edema (o) in the 4<sup>th</sup> group. Stained with hematoxylin and eosin (a) and Mallory polychrome dye (b),  $\times 200$

## ВЫВОДЫ

1. Имплантация трековой мембраны из полиэтилентерефталата при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы способствует развитию продуктивной фазы инфильтративного воспаления в роговице кроликов.

2. Предварительная *in vitro* адгезия пренатальных стромальных клеток человека на трековые мембраны независимо от исходного состояния полимерного материала уменьшает выраженность деструктивных изменений роговицы кролика при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговой оболочки.

3. Модификация трековых мембран холодной плазмой не влияет на изученные морфометрические показатели роговицы кроликов при эндотелиально-эпителиальной дистрофии данной оболочки.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Agarwal A., Narang P., Kumar D.A., Agarwal A. Young donor – graftassisted endothelial keratoplasty (PDEK/DMEK) with epithelial debridement for chronic pseudophakic bullous keratopathy. *Canadian Journal of Ophthalmology*. 2017; 5: 519–526. DOI: 10.1016/j.jcjo.2017.03.004.
2. Shulman J., Kropinak M., Ritterband D.C. Failed descemet-stripping automated endothelial keratoplasty grafts: a clinicopathologic analysis. *American Journal of*

*Ophthalmology*. 2009; 148 (5): 752–759. DOI: 10.1016/j.ajo.2009.06.023.

3. Terry M.A., Shamie N., Chen E.S. Endothelial keratoplasty: the influence of donor endothelial cell densities on dislocation, primary graft failure, and 1-year cell counts. *Cornea*. 2008; 27 (10): 1131–1137. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181814cbc.
4. Миронюк А.В., Придатко А.В., Сиволапов П.В., Сви-дерский В.А. Особенности оценки смачивания полимерных поверхностей. *Технологии органических и неорганических веществ. Восточно-Европейский журнал передовых технологий*. 2014; 1 (6): 23–26. [Mironyuk A.V., Pridatko A.V., Sivolapov P.V., Sviderskiy V.A. Features of evaluation of polymer surface wetting. *Technology of organic and inorganic substances. East European Journal of Advanced Technology*. 2014; 1 (6): 23–26 (in Russ.)].
5. Alonso J.G., Dalmolin C., Nahorny J., Recco A.A.C., Fontana L.C., Becker D. Active screen plasma system applied to polymer surface modification: Poly(lactic acid) surface activation before polyaniline graft polymerization in aqueous medium. *Journal of Polymer Engineering*. 2018; 38: 795–802. DOI: 10.1515/polyeng-2017-0298.
6. Jacobs T., Declercq H., De Geyter N., Cornelissen R., Dubruel P., Leys C., Beaurain A., Payen E., Morent R. Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013; 24: 469–478. DOI: 10.1007/s10856-012-4807-z.

## Вклад авторов

Филиппова Е.О. – проведение исследований, анализ полученного материала, написание статьи. Кривошеина О.И. – проведение исследований. Пичугин В.Ф. –

## Authors contribution

Filippova E.O. – carrying out of the research, analysis of the material, drafting of the manuscript. Krivosheina O.I. – carrying out of the research. Pichugin V.F. – analysis of the

анализ полученного материала, написание статьи. Хлусов И.А. – проведение исследований (исследования *in vitro*), анализ полученного материала, написание статьи. Дзюман А.Н. – окрашивание препаратов. Зайцев К.В. – проведение исследований *in vitro*.

material, drafting of the manuscript. Khlusov I.A. – carrying out of the research (*in vitro*), analysis of the material, drafting of the manuscript. Dzyuman A.N. – staining. Zaitsev K.V. – carrying out of the research *in vitro*.

## Сведения об авторах

**Филиппова Екатерина Олеговна**, канд. тех. наук, инженер, НИ ТПУ; ассистент, кафедра офтальмологии, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0425-1213.

**Кривошеина Ольга Ивановна**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой офтальмологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-7509-5858.

**Хлусов Игорь Альбертович**, д-р мед. наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; профессор, НИ ТПУ; ст. науч. сотрудник, экспериментальная лаборатория биомедицинских технологий, СибФНКЦ ФМБА России, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-3465-8452.

**Пичугин Владимир Федорович**, д-р физ.-мат. наук, профессор, НИ ТПУ, г. Томск.

**Дзюман Анна Николаевна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-0795-0987.

**Зайцев Константин Васильевич**, канд. мед. наук, руководитель экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий, СибФНКЦ ФМБА России, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-6504-5232.

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

## Authors information

**Filippova Ekaterina O.**, PhD, Engineer, NR TPU; Assistant, Division of Ophthalmology, Division of Histology, Cytology and Embryology, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0425-1213.

**Krivosheina Olga I.**, DM, Professor, Head of the Division of Ophthalmology, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7509-5858.

**Khkusov Igor A.**, DM, Professor, Division of Morphology and General Pathology, SSMU; Professor, NR TPU; Senior Researcher, Experimental Laboratory of Biomedical Technologies, Federal Siberian Research Clinical Center FMBA of Russia, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3465-8452.

**Pichugin Vladimir F.**, DPhMSc, Professor, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

**Dzyuman Anna N.**, PhD, Associate Professor, Division of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0795-0987.

**Zaitsev Konstantin V.**, PhD, Head of the Experimental Laboratory of Biomedical Technologies, Federal Siberian Research Clinical Center FMBA of Russia, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-6504-5232.

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

Поступила в редакцию 18.04.2019

Подписана в печать 10.06.2019

Received 18.04.2019

Accepted 10.06.2019



## Электрофизиологическое ремоделирование правого желудочка при экспериментальной сердечной недостаточности различной этиологии

Цветкова А.С., Крандычева В.В., Харин С.Н.

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (ИФ Коми НЦ УрО РАН)  
Россия, 167981, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, 50

### РЕЗЮМЕ

**Целью** работы явилась оценка электрофизиологического ремоделирования правого желудочка крыс с экспериментальной сердечной недостаточностью различной этиологии.

**Материалы и методы.** Проводили экспериментальное моделирование изадрин-, доксорубицин- и монокроталин-индуцированной сердечной недостаточности. Униполярные эпикардальные электрограммы желудочков (256 точек регистрации) регистрировали с помощью 144-канальной системы. Измеряли сердечный выброс и давление в обоих желудочках сердца. Вычисляли интервалы «активация – восстановление» как показатель длительности локальной реполяризации, а также определяли общую и локальную дисперсию интервалов «активация – восстановление» для оценки гетерогенности реполяризации желудочков.

**Результаты.** Во всех моделях сердечной недостаточности выявлены: 1) неоднородная пролонгация реполяризации с наибольшим удлинением на верхушке правого желудочка; 2) увеличение апикально-базальных различий реполяризации с наибольшим изменением на правом желудочке; 3) увеличение гетерогенности реполяризации эпикардального слоя желудочков при неоднородных изменениях локальной гетерогенности реполяризации и уменьшение межрегиональных различий неоднородности электрофизиологических свойств миокарда; 4) более выраженные изменения в реполяризации правого желудочка, чем в реполяризации левого желудочка.

**Заключение.** Независимо от причины развития сердечной недостаточности происходит неравномерное увеличение длительности реполяризации эпикардальной поверхности (в большей степени за счет верхушки) и наблюдается усиление гетерогенности реполяризации правого желудочка, что является причиной роста общей гетерогенности реполяризации эпикардальной поверхности желудочков в целом.

**Ключевые слова:** доксорубицин, изадрин, монокроталин, сердечная недостаточность, реполяризация, правый желудочек, крыса.

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

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках Программы ФНИ (№ ГР AAA-A-17-117012310154-6, 2017–2020 гг.).

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено комитетом по биоэтике Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (протокол № 25 от 14.05.2012).

**Для цитирования:** Цветкова А.С., Крандычева В.В., Харин С.Н. Электрофизиологическое ремоделирование правого желудочка при экспериментальной сердечной недостаточности различной этиологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 165–174. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-165-174>.

УДК 616.12-008-02:616.124.3:612.014.428

[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-165-174](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-165-174)

## Electrophysiological remodeling of the right ventricle in experimental heart failure of different etiologies

Tsvetkova A.S., Krandycheva V.V., Kharin S.N.

*Institute of Physiology of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences  
50, Pervomayskaya Str., GSP-2, Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russian Federation*

### ABSTRACT

**The aim** of the study was to evaluate electrophysiological remodeling of the right ventricle in rats in experimental heart failure of different etiologies.

**Materials and methods.** Isadrin-, doxorubicin- and monocrotaline-induced heart failure models were developed. Unipolar epicardial electrograms of the ventricles (256 recording sites) were recorded using a 144-channel system. The cardiac output and pressure in both ventricles of the heart were measured. Activation-recovery intervals were used as an index of duration of local repolarization, and the general and local dispersions of activation-recovery intervals were used as an index of heterogeneity of ventricular repolarization.

**Results.** In all models of heart failure, the following were identified: 1) non-uniform prolongation of repolarization with the greatest elongation at the apex of the right ventricle; 2) an increase in apicobasal differences of repolarization with the greatest change in the right ventricle; 3) an increase in the heterogeneity of the repolarization of the epicardial layer of the ventricles with heterogeneous changes in the local heterogeneity of repolarization and a decrease in the interregional differences in the heterogeneity of the electrophysiological properties of the myocardium; 4) more pronounced changes in the repolarization of the right ventricle than in the repolarization of the left ventricle.

**Conclusion.** Thus, irrespective of the cause of the heart failure, the following changes occur: 1) prolongation of the right ventricular repolarization occurs non-uniformly (mostly due to the apical area), which results in an increase in the right ventricular repolarization heterogeneity; 2) an increase in the heterogeneity of right ventricular repolarization is observed, which causes an increase in the overall heterogeneity of the ventricular epicardial surface.

**Key words:** doxorubicin, isadrin, monocrotaline, heart failure, repolarization, right ventricle, rat.

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

**Source of financing.** The study was supported by the Program for Fundamental Research of RAS (project №AAAA-A17-117012310154-6, 2017-2020).

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the bioethics committee under Institute of Physiology of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 25 of 14.05.2012).

**For citation:** Tsvetkova A.S., Krandycheva V.V., Kharin S.N. Electrophysiological remodeling of the right ventricle in experimental heart failure of different etiologies. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 165–174. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-165-174](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-165-174).

## ВВЕДЕНИЕ

Механическое и электрическое ремоделирование желудочка сердца является адаптивным (дезадаптивным) изменением его структуры и функции в ответ на перегрузку давлением и (или) объемом. Нарушение в электрических и (или) ме-

ханических свойствах одного желудочка влияет на свойства другого желудочка. Правый желудочек (ПЖ) анатомически и функционально отличается от левого желудочка (ЛЖ); тонкая стенка ПЖ делает его более чувствительным к расширению [1]. Правый желудочек играет важную роль в патофизиологии различных сердечных и легоч-

ных заболеваний, а также в адаптации сердца к новым (патологическим) условиям [2, 3]. Показано, что дисфункция правого желудочка ассоциирована с высокой смертностью пациентов с сердечной недостаточностью независимо от изменения фракции выброса [2, 4]. Хотя прогностическое значение правого желудочка в адаптации к перегрузке давлением или объемом получило широкое признание [4], изучению электрического и механического ремоделирования ПЖ уделяется мало внимания, что связано, в частности, со сложной геометрией и трудностью визуализации ПЖ [1, 5]. Наряду с этим верхушка ПЖ до сих пор является общепринятым местом для установки электростимулятора [6, 7]. Однако показано, что стимуляция верхушки ПЖ приводит к нарушению процесса сокращения, снижению насосной функции сердца и гипертрофии миокарда [8, 9]. В связи с вышеизложенным важным является оценка электрофизиологического ремоделирования правого желудочка крыс с экспериментальной сердечной недостаточностью различной этиологии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации. Эксперименты проводились на самках белых лабораторных крыс (возраст 15–26 нед, масса 170–255 г). Контрольные группы состояли из сопоставимых по возрасту и массе тела крыс. После регистрации всех показателей желудочки сердца иссекали, взвешивали и рассчитывали относительную массу правого и левого желудочков.

### *Модели сердечной недостаточности*

**Изадриновая модель.** Изопротеренола гидрохлорид (изадрин, фирма «Сигма Алдрич Рус», г. Москва, Россия) вводили подкожно крысам ( $n = 15$ ) в дозе 170 мг/кг дважды с интервалом 24 ч [10]. Электрофизиологическое и гемодинамическое исследования были выполнены через 4 нед после второй инъекции. **Доксорубициновая модель.** Доксорубицина гидрохлорид (доксорубин, фирма «Сигма Алдрич Рус», г. Москва, Россия) вводили крысам ( $n = 24$ ) в кумулятивной дозе 15 мг/кг (шесть равных инъекций внутривентриально в течение 2 нед) [11–13]. Электрофизиологическое и гемодинамическое исследования были выполнены через 6 нед после последней инъекции. **Монокроталиновая модель.** Крысам ( $n = 39$ ) однократно внутривентриально вводили

монокроталин в дозе 60 мг/кг (монокроталин, фирма «Сигма Алдрич Рус», г. Москва, Россия). Электрофизиологическое и гемодинамическое исследования были выполнены через 4–7 нед после инъекции.

### *Электрофизиологические и гемодинамические измерения*

После развития сердечной недостаточности, животные были анестезированы внутримышечным введением тилетамин-золазепам в дозе 10–20 мг/кг (Zoletil 100, Virbac, Carros, Франция) и ксилазина в дозе 1 мг/кг (Xyla, Interchemie, Castenray, Нидерланды), интубированы и переведены на искусственную вентиляцию легких. Для получения доступа к сердцу, грудную полость вскрывали по средне-грудной линии, рассекали перикард. Температура тела животного во время эксперимента поддерживалась на уровне 38–38,5 °С; сердце смачивали теплым (38–39 °С) физиологическим раствором для предотвращения высыхания и охлаждения его эпикардиальной поверхности.

После подготовки животного проводили регистрацию электрофизиологических и гемодинамических показателей. Проводили эпикардиальное картирование электрического поля желудочков сердца крысы путем последовательного наложения эпикардиальной регистрирующей матрицы (64 электрода) в областях основания и верхушки ПЖ и ЛЖ. В результате от желудочковой поверхности получали 256 униполярных эпикардиальных электрограмм. Синхронно проводилась запись ЭКГ от стандартных биполярных отведений. Регистрация электрофизиологических показателей производилась с помощью 144-канальной компьютерной картографической установки (полоса пропускания 0,05–1 000 Гц, частота дискретизации 4 000 Гц, динамический диапазон входных сигналов от  $\pm 10$  до  $\pm 100$  мВ, уровень шума не более  $\pm 10$  мкВ, разрешающая способность 10–100 мкВ на один разряд аналого-цифрового преобразования). Для регистрации сердечного выброса проводили изоляцию аорты от прилегающих тканей, ультразвуковой датчик устанавливали на аорту, измеряли сердечный выброс как среднюю скорость кровотока в восходящей аорте. Регистрацию среднего давления в ПЖ и ЛЖ производили путем прямого введения катетера (через стенку) в полость соответствующего желудочка. Запись гемодинамических параметров проводили с помощью системы Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus (March-Hugstetten, Германия).



Во втором стандартном отведении измеряли длительность QRS комплекса, интервал QaT (длительность между началом QRS комплекса и верхушкой Т-волны) и амплитуда Т-волны. По каждой из 256 электрограмм вычисляли интервалы «активация – восстановление» (activation-recovery intervals, ARI) как разность между локальной конечной реполяризацией ( $dV/dT_{max}$ , максимум первой производной потенциала по времени в период комплекса ST-T) и локальной активацией ( $dV/dT_{min}$ , минимум первой производной потенциала по времени в период комплекса QRS). Дисперсия ARI рассчитывалась как разница между максимальным и минимальным значениями показателя и использовалась как индекс гетерогенности реполяризации.

Данные представлены как в виде  $Me (Q_1; Q_3)$ . Статистический анализ проводили с помощью программы SPSS 15. Различия оценивали по тесту Манна – Уитни и признавали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Изадриновая модель хронической сердечной недостаточности

Из 15 животных опытной группы в результате введения изадрина выжило девять особей. Вялость, малая прибавка массы тела и сниженный сердечный выброс у животных опытной группы (табл. 1) свидетельствовали о развитии сердечной недостаточности.

Таблица 1  
Table 1

Морфометрические, гемодинамические и электрокардиографические показатели у контрольных крыс и крыс с сердечной недостаточностью, вызванной изадринем, $Me (Q_1; Q_3)$ Morphometric, hemodynamic and electrocardiographic parameters in control rats and rats with isadrin-induced heart failure, $Me (Q_1; Q_3)$			
Показатель Indicator	Контроль, $n = 15$ Control, $n = 15$	Сердечная недостаточность, $n = 9$ Heart-failure, $n = 9$	$p$
Масса тела исходно, г Body weight at baseline, g	201 (177,8; 214,3)	208 (190,5; 225,5)	–
Прибавка массы тела за 4 нед, г Weight gain in 4 weeks, g	27 (18; 34)	5 (–2,5; 19)	0,005
Относительная масса левого желудочка, % Relative mass of the left ventricle, %	0,234 (0,221; 0,246)	0,260 (0,244; 0,264)	–
Относительная масса правого желудочка, % Relative mass of the right ventricle, %	0,062 (0,053; 0,066)	0,064 (0,061; 0,066)	–
ЧСС, уд/мин HR, bpm	434,8 (303; 461,5)	408 (370,4; 438)	–
Сердечный выброс, мл/мин Cardiac output, ml/min	29,0 (28,5; 31,0)	20,0 (16,0; 22,0)	0,036
Интервал QaT <sub>II</sub> , мс QaT <sub>II</sub> interval, ms	34 (32; 36)	39,5 (37,5; 40)	0,002
Амплитуда волны T <sub>II</sub> , мВ T <sub>II</sub> wave amplitude, mV	0,22 (0,18; 0,33)	0,14 (0,125; 0,185)	0,007

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: ЧСС – частота сердечных сокращений,  $p$  – достоверность различий для крыс опытных групп по сравнению с контрольной группой.

Note. Here and in Tables 2, 3: HR – heart rate,  $p$  – significance of differences for rats of the experimental groups as compared with the control group.

Удлиненный интервал QT у крыс с сердечной недостаточностью (см. табл. 1) сопровождался увеличенной длительностью ARI в субэпикардальном слое желудочков на 15–68% в зависимости от области желудочков сердца (табл. 2).

В результате неоднородного увеличения длительности ARI у крыс с сердечной недостаточностью инверсии реполяризационных градиентов не произошло. Различия в длительности интервалов

«активация – восстановление» между верхушкой и основанием желудочков было увеличено в 3 раза по сравнению с контрольными показателями. При этом апикобазальные различия на правом желудочке увеличились в 6 раз, а на левом желудочке – в 2 раза. Наблюдалась тенденция к увеличению общего межжелудочкового градиента вследствие увеличения межжелудочкового градиента в основании желудочков сердца (см. табл. 2).

Таблица 2

Table 2

Показатели ARI субэпикардального слоя различных областей желудочков сердца у контрольных крыс и крыс с сердечной недостаточностью различного генеза, $Me (Q_1; Q_3)$				
ARI indicators of the subepicardial layer of various regions of the ventricles of the heart in control rats and rats with heart failure of various origins, $Me (Q_1; Q_3)$				
Область желудочков Ventricular area	Контроль, $n = 15$ Control, $n = 15$	Изадрин, $n = 9$ Isadrin, $n = 9$	Доксорубин, $n = 9$ Doxorubicin, $n = 9$	Монокроталин, $n = 20$ Monocrotaline, $n = 20$
Длительность ARI, мс ARI duration, ms				
ЛЖ LV	16,2 (15,3; 18,3)	23,8 (20,8; 24,3) $p < 0,0001$	19,8 (16,9; 21,6)	27,3 (23,6; 29,8) $p < 0,0001$
ПЖ RV	10,2 (9,2; 11,8)	16,4 (14,6; 17,5); $p = 0,012$	11,7 (10,6; 18,8); $p = 0,035$	29,6 (24,6; 40,8); $p < 0,0001$
Основание ЛЖ LV base	15,2 (13,5; 17,0)	20,5 (19,2; 24,7) $p = 0,010$	15,6 (14,3; 23,5)	27,3 (24,0; 29,3) $p < 0,0001$
Верхушка ЛЖ LV apex	17,5 (15,8; 19,7)	25,9 (23,0; 28,2) $p < 0,0001$	19,2 (18,4; 27,5)	27,1 (24,2; 32,0) $p < 0,0001$
Основание ПЖ RV base	9,4 (8,9; 11,0)	11,4 (8,3; 13,1)	10,5 (9,1; 15,0)	26,0 (22,0; 36,0) $p < 0,0001$
Верхушка ПЖ RV apex	10,9 (9,1; 11,8)	17,5 (15,4; 24,5) $p = 0,010$	13,3 (11,6; 21,2) $p = 0,015$	33,5 (24,4; 46,0) $p < 0,0001$
Общая (ЛЖ + ПЖ) General (LV + RV)	13,3 (12,4; 15,0)	20,5 (16,8; 21,9) $p < 0,0001$	16,7 (13,9; 20,3) $p = 0,035$	30,2 (27,1; 36,8) $p < 0,0001$
Дисперсия ARI, мс ARI dispersion, ms				
ЛЖ LV	11,5 (8,2; 14,0)	16,5 (13,5; 19,0) $p = 0,025$	13,5 (10,5; 15,5)	22,8 (19,9; 25,1) $p < 0,0001$
ПЖ RV	8,0 (6,0; 9,7)	11,0 (8,5; 19,5) $p = 0,049$	13,5 (10,5; 21,0) $p = 0,010$	22,9 (17,4; 29,6) $p < 0,0001$
Основание ЛЖ LV base	6,5 (4,7; 9,5)	11,5 (8,5; 13,0) $p = 0,021$	7,5 (6,0; 8,5)	14,9 (7,4; 20,4) $p = 0,004$
Верхушка ЛЖ LV apex	9,0 (6,3; 12,0)	6,5 (5,5; 6,5)	8,5 (6,0; 11,5)	19,8 (10,5; 24,9) $p = 0,004$
Основание ПЖ RV base	5,5 (4,3; 6,8)	5,0 (4,0; 7,0)	6,0 (4,5; 7,5)	11,3 (9,2; 17,1) $p < 0,0001$
Верхушка ПЖ RV apex	5,5 (4,5; 8,3)	6,0 (5,5; 8,0)	10,0 (7,5; 13,5) $p = 0,030$	12,3 (10,1; 20,6) $p < 0,0001$
Общая (ЛЖ + ПЖ) General (LV + RV)	14,8 (14,5; 18,5)	21,0 (19,5; 22,0) $p = 0,002$	21,0 (19,3; 23,0) $p = 0,012$	34,5 (26,4; 41,5) $p < 0,0001$
Межжелудочковый градиент ARI, мс ARI interventricular gradient, ms				
Основание желудочков Ventricular bases	5,6 (3,8; 6,8)	11,4 (5,5; 13,3)	5,5 (4,1; 7,7)	-1,6 (-6,3; 5,1)
Верхушка желудочков Ventricular apex	7,6 (5,6; 8,2)	7,6 (2,2; 13,5)	6,2 (3,5; 8,8)	-1,8 (-17,7; 2,7) $p = 0,005$
Общая (основание + верхушка) General (base + apex)	6,1 (5,1; 7,3)	9,2 (4,5; 9,9)	7,0 (3,4; 9,7)	-1,8 (-12,4; 0,9) $p = 0,002$
Апикобазальный градиент ARI, мс ARI apicobasal gradient, ms				
ПЖ RV	1,20 (0,03; 2,11)	6,73 (3,44; 9,78) $p = 0,001$	3,22 (2,21; 7,23) $p = 0,020$	6,30 (0,00; 10,67) $p = 0,018$
ЛЖ LV	3,17 (0,62; 4,11)	4,22 (-1,76; 13,60)	3,24 (0,34; 8,99)	0,00 (-1,50; 5,44)
Общая (ЛЖ + ПЖ) General (LV + RV)	1,94 (0,04; 2,28)	5,55 (5,02; 7,12) $p = 0,005$	4,78 (1,77; 8,35) $p = 0,020$	4,04 (-0,81; 7,25)

Примечание. Здесь и в табл. 4: ПЖ – правый желудочек, ЛЖ – левый желудочек. В табл. 2 представлена сборная группа контрольных животных, которая состояла из 5 случайным образом выбранных животных контрольной группы изадрина, 5 – контрольной группы доксорубина и 5 – монокроталина.

Note. Here and in Table 4: RV – right ventricle, LV – left ventricle, Table 2 shows the collective group of control animals, which consisted of 5 randomly selected animals of the isadrin control group, 5 of the doxorubicin control group, and 5 of the monocrotaline group.

Таблица 3

Table 3

Морфометрические, гемодинамические и электрокардиографические показатели у контрольных крыс и крыс с сердечной недостаточностью, вызванной доксорубицином			
Morphometric, hemodynamic and electrocardiographic parameters in control rats and rats with heart failure caused by doxorubicin			
Параметр Indicator	Контрольная группа, $n = 15$ Control group, $n = 15$	Сердечная недостаточность, $n = 9$ Heart failure, $n = 9$	$p$
Масса тела исходно, г Body weight at baseline, g	194 (174; 209)	193 (181; 200)	–
Масса тела через 6 нед, г Body weight in 6 weeks, g	225 (221; 236)	220 (206; 234)	–
Относительная масса левого желудочка, % Relative mass of the left ventricle, %	0,232 (0,221; 0,247)	0,248 (0,216; 0,254)	–
Относительная масса правого желудочка, % Relative mass of the right ventricle, %	0,062 (0,053; 0,066)	0,057 (0,052; 0,058)	–
ЧСС, уд./мин HR, bpm	376,4 (263,8; 453,0)	416,7 (337,1; 428,6)	–
Сердечный выброс, мл/мин Cardiac output, ml/min	28,5 (26,5; 35,6)	15,2 (12,7; 21,1)	0,049
Интервал QaT <sub>II</sub> , мс QaT <sub>II</sub> interval, ms	30,0 (28,0; 36,0)	49,5 (48,0; 52,3)	0,036
Амплитуда волны T <sub>II</sub> , мВ T <sub>II</sub> wave amplitude, mV	0,22 (0,19; 0,23)	0,09 (0,08; 0,11)	0,036

Дисперсия ARI субэпикардального слоя как правого, так и левого желудочков у крыс с сердечной недостаточностью была выше в 1,5 раза по сравнению с контрольными животными, а увеличение общей дисперсии у крыс с сердечной недостаточностью составило 35% по сравнению с контролем. Вместе с тем наблюдалась тенденция к увеличению дисперсии ARI в основании левого желудочка, тогда как дисперсия ARI на верхушке левого желудочка уменьшалась на 28% (см. табл. 2).

#### *Доксорубициновая модель хронической сердечной недостаточности*

Из 24 крыс, которым делали инъекции доксорубицина, выжили девять. Малоподвижность и сниженный сердечный выброс у животных опытной группы (табл. 3) свидетельствовали о развитии сердечной недостаточности.

Удлинение интервала QT у крыс с сердечной недостаточностью (см. табл. 3) сопровождалось увеличением длительности ARI субэпикардального слоя желудочков на 22–61% в зависимости от области желудочков сердца по сравнению с контрольными животными (см. табл. 2). Наиболее выраженная пролонгация ARI наблюдалась на верхушке правого желудочка.

В результате неоднородного увеличения длительности ARI у крыс с сердечной недостаточностью

инверсии реполяризационных градиентов произошло. У крыс с сердечной недостаточностью межжелудочковые различия в длительности ARI были увеличены в 1,4 раза в основании и уменьшены в 1,6 раза на верхушке желудочков по сравнению с контрольными животными (см. табл. 2).

Однако эти изменения были статистически не значимы. Общий межжелудочковый градиент ARI не изменялся при развитии сердечной недостаточности, вызванной доксорубицином. Различия в длительности интервалов «активация – восстановление» между верхушкой и основанием желудочков было увеличено в 2,8 раза у крыс с сердечной недостаточностью по сравнению с контрольными животными. При этом апикобазальные различия на правом желудочке увеличились в 4 раза, а на левом желудочке – в 1,4 раза (см. табл. 2).

Увеличение общей дисперсии ARI субэпикардального слоя желудочков у крыс с сердечной недостаточностью составило 39% по сравнению с контролем (см. табл. 2). При этом наблюдались тенденция к увеличению дисперсии ARI субэпикардального слоя ЛЖ и почти двукратное увеличение дисперсии ARI субэпикардального слоя ПЖ. Локальные дисперсии ARI увеличивались или наблюдалась тенденция к увеличению (за исключением верхушки ЛЖ).

### Монокроталиновая модель хронической сердечной недостаточности

Из 39 животных опытной группы после введения монокроталина выжили 30 особей, у двух из которых гипертрофия правого желудочка не развилась (были исключены из анализа). При этом у остальных 28 крыс введение монокроталина приводило к развитию гипертрофии миокарда ПЖ (почти двукратное увеличение массы ПЖ по сравнению с контролем). В результате анализа экспериментальных данных развитие сердечной

недостаточности было обнаружено у 20 животных (табл. 4).

Систолической и диастолической дисфункции обоих желудочков у крыс с монокроталин-индуцированной сердечной недостаточностью соответствовало 2–4-кратное (в зависимости от области миокарда) удлинение реполяризации и 1,5–3-кратное (в зависимости от области миокарда) увеличение дисперсии реполяризации по сравнению с контролем (все изменения статистически подтверждены).

Таблица 4  
Table 4

Морфометрические, гемодинамические и электрокардиографические показатели у контрольных крыс и крыс с сердечной недостаточностью, вызванной монокроталином		
Morphometric, hemodynamic and electrocardiographic parameters in control rats and rats with heart failure caused by monocrotaline		
Параметр Indicator	Контрольная группа, $n = 19$ Control group, $n = 19$	Сердечная недостаточность, $n = 20$ Heart failure, $n = 20$
Масса тела исходно, г Body weight at baseline, g	206 (187; 225)	205 (198; 214)
Прибавка массы тела, г Weight gain, g	20,5 (13,3; 29,0)	-59 (-64; -29), $p < 0,0001$
Отношение ПЖ/ЛЖ RV/LV ratio	0,26 (0,25; 0,29)	0,55 (0,53; 0,57), $p < 0,0001$
Сердечный выброс, мл/мин Cardiac output, ml/min	38,5 (30,0; 51,0)	11,5 (9,8; 13,3), $p = 0,001$
Систолическое давление Systolic pressure ЛЖ, мм рт. ст. LV, mm Hg	98,5 (87,0; 108,3)	48 (43; 55), $p = 0,002$
ЛЖ, $dP/dt_{max}$ LV, $dP/dt_{max}$	3372 (1704; 4650)	1104 (1045; 1440), $p = 0,002$
ЛЖ, $dP/dt_{min}$ LV, $dP/dt_{min}$	2492 (1249; 3148)	757 (714; 1003), $p = 0,006$
Систолическое давление Systolic pressure ПЖ, мм рт. ст. RV, mm Hg	26,5 (24,0; 30,3)	25 (24; 27)
ПЖ, $dP/dt_{max}$ RV, $dP/dt_{max}$	1003 (624; 1212)	516 (498; 636), $p = 0,029$
ПЖ, $dP/dt_{min}$ RV, $dP/dt_{min}$	595 (565; 785)	444 (418; 478), $p = 0,013$

При этом пролонгация реполяризации на ПЖ была почти в 2 раза больше, чем на ЛЖ, тогда как апикобазальные различия не выражены (см. табл. 2). Наблюдаемые в группе контрольных животных межрегиональные различия в дисперсии реполяризации были уменьшены у крыс с монокроталин-индуцированной сердечной недостаточностью. В ходе развития сердечной недостаточности увеличение дисперсии реполяризации доминировало над пролонгацией реполяризации.

### ОБСУЖДЕНИЕ

При сердечной недостаточности, вызванной изадрином, доксорубицином и монокроталином, выявлены общие особенности изменения реполяризационных свойств миокарда. Во-первых, происходит неоднородная пролонгация реполяризации с наибольшим удлинением на верхушке правого желудочка. Во-вторых, отмечается увеличение апикобазальных различий реполяризации с наибольшим изменением на правом желу-

дочке. В-третьих, увеличивается гетерогенность реполяризации субэпикардального слоя желудочков при неоднородных изменениях локальной гетерогенности реполяризации и уменьшаются межрегиональные различия неоднородности электрофизиологических свойств миокарда. И, наконец, показаны более выраженные изменения в реполяризации правого желудочка, чем в реполяризации левого желудочка.

Существование различной плотности распределения ионных каналов в кардиомиоцитах основания и верхушки сердца отражается в апикобазальном градиенте длительности потенциалов действия и интервалов «активация – восстановление» клеток сердца у крыс [14, 15]. Известно, что продолжительность потенциала действия на верхушке сердца крыс короче, чем в основании, что связывают с большими токами  $I_{to}$  и  $I_{Ks}$  в изолированных кардиомиоцитах на верхушке по сравнению с основанием [16]. Электрическое ремоделирование характеризуется запаздывающей реполяризацией, увеличенной длительностью потенциалов действия, повышенной дисперсией рефрактерности и повышенной электрофизиологической гетерогенностью миокарда желудочков [17]. Изменения формы и длительности потенциалов действия являются результатом изменений в функциональной экспрессии деполяризующих и реполяризующих токов [18]. В наших экспериментах пролонгация ARI на верхушке желудочков была больше, чем в основании, что связано, по-видимому, с повышенной чувствительностью верхушки сердца к действию препаратов, обладающих кардиотоксическим эффектом. В частности, повреждающее действие (разрастание фиброзной ткани) высоких доз изопроterenола на верхушку ЛЖ больше, чем на его основание [19].

Для всех типов клеток стенки ЛЖ характерен более длительный потенциал действия, чем в клетках правого, что, в свою очередь, обусловлено большим транзиторным выходящим током  $I_{to}$  в правом желудочке, чем в левом, как в эпикардальных [20], так и в интрамуральных [21] слоях. Это показано и в экспериментах на крысах [16, 22]. При развитии хронической сердечной недостаточности, вызванной доксорубицином и изадрином, имели место региональные различия в увеличении локальных дисперсий ARI, при этом различия в дисперсии ARI между различными областями желудочков сердца уменьшались. Неодинаковое увеличение гетерогенности реполяризации в различных областях миокарда желудочков и исчезновение межрегиональных различий в неоднородности реполяризации происходят в миокарде ЛЖ

при его компенсаторной гипертрофии вследствие уменьшения просвета брюшной аорты [23].

В то же время при сердечной недостаточности вследствие действия монокроталина пролонгация реполяризации была в несколько раз больше. В процессе развития сердечной недостаточности первоначально меняется гетерогенность реполяризации, впоследствии происходит стабильное ухудшение гемодинамики, сопровождающееся неоднородным удлинением реполяризации желудочков, наиболее выраженным на правом желудочке, что приводит к росту электрической гетерогенности сердца [24]. Механическая перегрузка является важным модулятором возбудимости сердца. Влияние измененной гемодинамической нагрузки может быть чрезмерным при недостаточности по сравнению с нормальным желудочком. Влияние перегрузки, вероятно, распределяется неравномерно по всей стенке желудочка или на всем протяжении миокарда и таким образом потенциально увеличивает дисперсию длительностей потенциалов действия с аритмогенными последствиями [18]. Таким образом, выявленное выраженное увеличение гетерогенности реполяризации эпикарда ПЖ может быть одним из основных факторов повышенной аритмогенности при сердечной недостаточности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, независимо от причины развития сердечной недостаточности происходит неравномерное увеличение длительности реполяризации эпикардальной поверхности (в большей степени за счет верхушки) и наблюдается усиление гетерогенности реполяризации правого желудочка, что является причиной роста общей гетерогенности реполяризации эпикардальной поверхности желудочков в целом.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. De Groote P. Right ventricular systolic function in heart failure: a long story but still the same question. *Arc. Cardiovasc. Dis.* 2016; 109 (4): 227–230. DOI: 10.1016/j.acvd.2016.02.001.
2. Schuijt M.T.U., Blok I.M., Zwinderman A.H., van Riel A.C.M.J., Schuurin M.J., de Winter R.J., Duijnhouwer A.L., van Dijk A.P.J., Mulder B.J.M., Bouma B.J. Mortality in pulmonary arterial hypertension due to congenital heart disease: serial changes improve prognostication. *Int. J. Cardiol.* 2017; 243: 449–453. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.05.101.
3. Churchill T.W., Baggish A.L. The right heart: acute and chronic issues. *Curr. Treat Options Cardio Med.* 2017; 19 (11): 83. DOI: 10.1007/s11936-017-0581-z.

4. Tadic M., Pieske-Kraigher E., Cuspidi C., Morris D.A., Burkhardt F., Baudisch A., Habfeld S., Tschope C., Pieske B. Right ventricular strain in heart failure: clinical perspective. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 2017; 110 (10): 562–571. DOI: 10.1016/j.acvd.2017.05.002.
5. Ho S.Y., Nihoyannopoulos P. Anatomy, echocardiography, and normal right ventricular dimensions. *Heart.* 2006; 92: i2–i13. DOI: 10.1136/hrt.2005.077875.
6. Hayashi Y., Takagi M., Kakiyama J., Sakamoto S., Tatsumi H., Doi A., Iwata S., Sugiyama K., Yoshiyama M. Impact of simple electrocardiographic markers as predictors for deterioration of left ventricular function in patients with frequent right ventricular apical pacing. *Heart Vessels.* 2018; 33 (3): 299–308. DOI: 10.1007/s00380-017-1053-x [Epub ahead of print].
7. Kanzaki H., Satomi K., Noda T., Shimizu W., Kamakura S., Kitaura Y., Ishizaka N., Kitakaze M. Comparison of the acute effects of right ventricular apical pacing and biventricular pacing in patients with heart failure. *Intern. Med.* 2015; 54 (11): 1329–1335. DOI: 10.2169/internalmedicine.54.3081.
8. Sweeney M.O., Prinzen F.W. A new paradigm for physiologic ventricular pacing. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47 (2): 282–288. DOI: 10.1016/j.jacc.2005.09.029.
9. Tsvetkova A.S., Kibler N.A., Nuzhny V.P., Shmakov D.N., Azarov J.E. Acute effects of pacing site on repolarization and haemodynamics of the canine ventricles. *Europace.* 2011; 13 (6): 889–896. DOI: 10.1093/europace/eur053.
10. Teerlink J.R., Pfeffer J.M., Pfeffer M.A. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ. Res.* 1994; 75 (1): 105–113. DOI: 10.1161/01.res.75.1.105.
11. Tong J., Ganguly P.K., Singal P.K. Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats. *Am. J. Physiol.* 1991; 260 (3): H909–H916.
12. Siveski-Iliskovic N., Kaul N., Singal P.K. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation.* 1994; 89 (6): 2829–2835. DOI: 10.1161/01.cir.89.6.2829.
13. Казаченко А.А., Оковитый С.В., Куликов А.Н., Густайнис К.Р., Нагорный М.Б., Шуленин С.Н., Ерохина И.А., Емельянова О.И. Сравнительная характеристика некоторых фармакологических моделей хронической сердечной недостаточности. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2008; 71 (6): 16–19. [Kazachenko A.A., Okovityy S.V., Kulikov A.N., Gustaynis K.R., Nagorny M.B., Shulenin S.N., Erokhina I.L., Emel'yanova O.I. Comparative characteristics of some pharmacological models of the chronic heart failure. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2008; 71 (6): 16–19 (in Russ.)].
14. Shipsey S.J., Bryant S.M., Hart G. Effects of hypertrophy on regional action potential characteristics in the rat left ventricle: a cellular basis for T-wave inversion? *Circulation.* 1997; 96: 2061–2068. DOI: 10.1161/01.cir.96.6.2061.
15. Харин С.Н., Крандычева В.В., Шмаков Д.Н. Последовательность реполяризации эпикардальной поверхности желудочков у крыс с реноваскулярной гипертензией. VI симпозиум по сравнительной электрокардиографии: тезисы докладов. 2004: 77–78. [Kharin S.N., Krandycheva V.V., Shmakov D.N. Sequence of repolarization of the epicardial ventricle surface in rats with renovascular hypertension. VI symposium on comparative electrocardiography: abstracts. 2004: 77–78 (in Russ.)].
16. Donohoe P., Hendry B.M., Walgama O.V., Bertaso F., Hopster D.J., Shattock M.J., James A.F. An altered repolarizing potassium current in rat cardiac myocytes after subtotal nephrectomy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000; 11 (9): 1589–1599.
17. Hanumanth K. Reddy, Sanjeev Wasson, Santhosh K.G. Koshy, Ravi Komatireddy. Structural correlates of electrical remodeling in ventricular hypertrophy. *Cardiovascular Research.* 2003; 58 (3): 495–497. DOI: 10.1016/S0008-6363(03)00369-9.
18. Gordon F. Tomaselli, Eduardo Marbán. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Research.* 1999; 42 (2): 270–283. DOI: 10.1016/S0008-6363(99)00017-6.
19. Bos R., Mougnot N., Médiani O., Vanhoutte P.M., Lechat P. Potassium canrenoate, an aldosterone receptor antagonist, reduces isoprenaline-induced cardiac fibrosis in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 309 (3): 1160–1166. DOI: 10.1124/jpet.103.063388.
20. Di Diego J.M., Sun Z.Q., Antzelevitch C. I(to) and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am. J. Physiol.* 1996; 271 (2/2): H548–H561.
21. Volders P.G., Sipido K.R., Carmeliet E., Spatjens R.L., Wellens H.J., Vos M.A. Repolarizing K currents ITO1 and IKs are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation.* 1999; 99 (2): 206–210. DOI: 10.1161/01.cir.99.2.206.
22. Watanabe T., Delbridge L.M., Bustamante J.O., McDonald T.F. Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ. Res.* 1983; 52 (3): 280–290. DOI: 10.1161/01.res.52.3.280.
23. Gymez A.M., Benitah J.P., Henzel D., Vinet A., Lorente P., Delgado C. Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle. *Am. J. Physiol.* 1997; 272 (3): H1078–H1086.
24. Krandycheva V., Kharin S., Strelkova M., Shumikhin K., Sobolev A., Shmakov D. Ventricular repolarization in rat model of global heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2013; 40 (7): 431–437. DOI: 10.1111/1440-1681.12104.



## Сведения об авторах

**Цветкова Алёна Сергеевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория физиологии сердца, ИФ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар.

**Крандычева Валерия Владимировна**, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник, лаборатория физиологии сердца, ИФ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар.

**Харин Сергей Николаевич**, д-р биол. наук, доцент, зам. директора по научно-организационной работе, ИФ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар.

(✉) **Цветкова Алёна Сергеевна**, e-mail: as.tsvetkova@mail.ru.

Поступила в редакцию 15.05.2017

Подписана в печать 14.12.2018

## Author information

**Tsvetkova Alena S.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cardiac Physiology, Institute of Physiology of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation.

**Krandycheva Valeria V.**, PhD, Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory of Cardiac Physiology, Institute of Physiology of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation.

**Kharin Sergey N.**, DBSc, Associate Professor, Vice-director, Institute of Physiology of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation.

(✉) **Tsvetkova Alena S.**, e-mail: as.tsvetkova@mail.ru.

Received 15.05.2017

Accepted 14.12.2018

УДК 614.253.8(571.16)

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-175-180>

## Декларация о пациент-ориентированном здравоохранении Томской области

Деев И.А.<sup>1</sup>, Барановская С.В.<sup>1</sup>, Бойков В.А.<sup>1</sup>, Грахов В.Н.<sup>3</sup>, Кравченко А.П.<sup>2</sup>,  
Кобякова О.С.<sup>1</sup>, Малахова С.В.<sup>4</sup>, Таранов А.А.<sup>2</sup>, Шибалков И.П.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Департамент здравоохранения Томской области  
Россия, 634041, г. Томск, пр. Кирова, 41

<sup>3</sup> Межвузовская поликлиника  
Россия, 634041, г. Томск, ул. Киевская, 74

<sup>4</sup> Центр медицинской и фармацевтической информации  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 54

### РЕЗЮМЕ

Декларация о пациент-ориентированном здравоохранении в Томской области принята медицинским и пациентским сообществами 24 августа 2018 г. Документ подобного рода стал первым в России. Он создан на основе современного мирового опыта в области защиты прав пациентов и медицинских работников, особенностях российского законодательства, принципах гуманистической медицины, широкого анализа конкретных жалоб пациентов областных государственных учреждений здравоохранения Томской области.

Создание декларации обусловлено необходимостью выстраивания системы здравоохранения, в которой и медицинские сотрудники, и пациенты соблюдают такие принципы, как взаимоуважение, выбор и ответственность, вовлеченность, доступность, открытость. В документе объясняется необходимость постоянного следования данным принципам для эффективности лечения, защиты личности, профессионального достоинства и равноправия.

**Ключевые слова:** пациент-ориентированное здравоохранение, декларация, Томская область, медицинские учреждения, пациент.

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

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

**Для цитирования:** Деев И.А., Барановская С.В., Бойков В.А., Грахов В.Н., Кравченко А.П., Кобякова О.С., Малахова С.В., Таранов А.А., Шибалков И.П. Декларация о пациент-ориентированном здравоохранении Томской области. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 175–180. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-175-180>.

УДК 614.253.8(571.16)

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-175-180>

## Declaration on patient-oriented healthcare of the Tomsk region

Deev I.A.<sup>1</sup>, Baranovskaya S.V.<sup>1</sup>, Boykov V.A.<sup>1</sup>, Grakhov V.N.<sup>3</sup>, Kravchenko A.P.<sup>2</sup>,  
Kobyakova O.S.<sup>1</sup>, Malakhova S.V.<sup>4</sup>, Taranov A.A.<sup>2</sup>, Shibalkov I.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University (SSMU)

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation

<sup>2</sup> Healthcare Department of Tomsk region

41, Kirova Str., Tomsk, 634041, Russian Federation

<sup>3</sup> Interuniversity polyclinic

74, Kievskaya Str., Tomsk, 634041, Russian Federation

<sup>4</sup> Medical and Pharmaceutical Information Center

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

### ABSTRACT

The Declaration on Patient-Oriented Healthcare of the Tomsk Region was accepted by the medical and patient communities on August 24, 2018. It was the first document of its kind in Russia. It was created based on several elements: modern international experience in the field of protection of patients' and medical workers' rights, particular qualities of Russian legislation, principles of humanistic medicine, and broad analysis of specific complaints from patients of regional public health institutions in the Tomsk region.

The reason to create the Declaration was the necessity to build a healthcare system in which both medical staff and patients comply with such principles as mutual respect, choice and responsibility, involvement, accessibility, and openness. The document explains the need for constant adherence to these principles for the effectiveness of treatment, the protection of the individual, professional dignity, and equality.

**Key words:** patient-oriented healthcare, Declaration, Tomsk region, healthcare facilities, patient.

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

**Source of financing.** The authors state that there is no funding for the study.

**For citation:** Deev I.A., Baranovskaya S.V., Boykov V.A., Grakhov V.N., Kravchenko A.P., Kobyakova O.S., Malakhova S.V., Taranov A.A., Shibalkov I.P. Declaration on patient-oriented healthcare of the Tomsk region. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 175–180. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-175-180>.

## ВВЕДЕНИЕ

Взаимоотношения между медицинским и пациентским сообществами всегда имели неоднозначный характер как с точки зрения взаимопонимания и ответственности сторон, так и с точки зрения удовлетворения их потребностей и интересов. Различные барьеры возникают на пути получения необходимой медицинской помощи и не позволяют выполнять медицинским сотрудникам свои профессиональные обязанности без возник-

ающих извне преград. Так, проведенное в 2014 г. в Томской области масштабное социологическое исследование ( $n = 12\,972$ ), целью которого было выявление факторов, формирующих негативное отношение пациентов при обращении в медицинскую организацию, показало, что большинство респондентов, положительно оценивая компетентность медицинского персонала, негативно отзывались об условиях оказания помощи (это и очереди в регистратуру, и недоброжелательность персонала (медработников), и большие времен-

ные затраты при получении услуг). Следует отметить, что большая часть проблем, с которыми сталкивается пациент, обращаясь в поликлинику, являются организационными и могут быть решены без привлечения дополнительных ресурсов, в том числе финансовых.

В связи с этим назрела необходимость сформировать свод правил взаимодействия между врачом и пациентом, который позволил бы сначала изменить парадигму их взаимоотношений, а в дальнейшем – систему здравоохранения региона в целом, используя декларацию в качестве базового документа при разработке любых алгоритмов, стандартов, порядков организации медицинской помощи на территории Томской области. Исходя из этого, появилась идея о создании документа, в котором были бы прописаны данные правила.

В России есть опубликованные труды, которые обозначают права и интересы только одной из сторон, но нет документа, в котором объединялись бы особенности взаимодействия медицинского и пациентского сообществ в целом.

Декларация о пациент-ориентированном здравоохранении в Томской области принята медицинским и пациентским сообществом 24 августа 2018 г. в пространстве коллективной работы «Точка кипения – Томск». Документ подобного рода стал первым в России.

Создание декларации обусловлено необходимостью выстраивания системы здравоохранения, в которой и медицинские сотрудники, и пациенты соблюдают такие принципы, как взаимоуважение, выбор и ответственность, вовлеченность, доступность, открытость. В документе объясняется необходимость постоянного следования данным принципам для эффективности лечения, защиты личности и профессионального достоинства, равноправия, перехода к партнерским отношениям.

В основу документа были включены основные идеи из российского законодательства, Международной декларации о пациент-центрированном здравоохранении, Декларации о политике в области обеспечения прав пациента в Европе, Декларации о правах пациента в России.

В Томской области идея о необходимости написания Декларации о пациент-ориентированном здравоохранении была представлена Департаментом здравоохранения Томской области в рамках круглого стола 6 марта 2018 г. на итоговой объединенной коллегии департаментов социального блока Томской области.

Следующим шагом стало создание рабочей группы, в которую вошли представители органов исполнительной власти, Департамента здравоохранения

Томской области, Медицинской палаты Томской области, руководители областных медицинских учреждений, депутаты. Работа над документом длилась на протяжении нескольких месяцев. Рабочая группа изучила современный мировой опыт в области защиты прав пациентов и медицинских работников, особенности российского законодательства, принципы гуманистической медицины, провела детальный анализ нескольких тысяч конкретных жалоб пациентов областных государственных учреждений здравоохранения Томской области.

Проект документа был представлен Совету главных врачей при Департаменте здравоохранения Томской области, Экспертному совету при заместителе губернатора Томской области по социальной политике. Большое обсуждение состоялось с пациентским и медицинским сообществами 12 июля 2018 г. в рамках панельной дискуссии, в нем приняли участие представители региональных и федеральных органов власти, территориального фонда ОМС, главы страховых медицинских организаций, врачи и пациенты, в том числе руководители медицинских учреждений и общественных организаций.

Жителями Томской области было внесено более 100 предложений, которые поступили в рабочую группу в устном и письменном виде, большинство из них, после длительного обсуждения, были учтены в итоговом документе.

24 августа 2018 г. состоялось заключительное обсуждение проекта декларации. В нем приняли участие более 200 врачей и пациентов, в том числе руководители медицинских учреждений и общественных организаций. С докладами выступили представители органов исполнительной власти, Медицинской палаты Томской области, пациентских сообществ, правозащитники. На данном обсуждении декларация была принята.

Декларация о пациент-ориентированном здравоохранении размещена на сайте Департамента здравоохранения Томской области. Любой человек или организация может поддержать документ – присоединиться к Декларации, заполнив специальную форму.

Документ будет включен в программы обучения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Областного государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения «Томский базовый медицинский колледж».

Декларация будет размещена в каждом медицинском учреждении Томской области, а также представлена руководителями учреждений здравоохранения сотрудникам медицинских организаций.

Стоит отметить, что Томская область стала образцом для создания подобных документов в других регионах. Опыт переняла Ульяновская область, которая также приступила к написанию общественного договора между пациентами и медицинским сообществом. Декларацию поддержал общественный совет федерального проекта «Единой России» «Здоровое будущее» в Томской области. Она вошла в план реализации этого проекта во втором полугодии 2018 г.

Практическим воплощением принципов Декларации о пациент-ориентированном здравоохранении стал разработанный в Томской области стандарт организации амбулаторной помощи, который представляет собой свод вполне конкретных правил организации работы поликлиники. Опыт региона по стандартизации медицинской помощи будет представлен в последующих публикациях.

## **ДЕКЛАРАЦИЯ О ПАЦИЕНТ-ОРИЕНТИРОВАННОМ ЗДРАВООХРАНЕНИИ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ**

Пациент-ориентированный подход в здравоохранении основан на принципах гуманистической медицины, отвечает потребностям пациентов и предполагает переход от традиционной модели, когда медицинские работники несут полную ответственность за здоровье пациента, на партнерские взаимоотношения с ним.

Каждый человек имеет фундаментальное право на такое здравоохранение, которое уважает его личностные ценности и приоритеты, помогает сохранить здоровье и качество жизни на максимально достижимом уровне.

Система здравоохранения Томской области принимает принципы пациент-ориентированного подхода и активно содействует формированию приверженности населения к сотрудничеству в процессе лечения, здоровому образу жизни и своевременной профилактике заболеваний.

Декларация базируется на российском законодательстве, учитывает современные мировые принципы и стратегии в области защиты прав пациентов и медицинских работников.

Настоящая Декларация выражает консолидированное мнение медицинского и пациентского сообществ о создании оптимальных механизмов

реализации прав и интересов всех участников системы здравоохранения.

Медицинские работники и пациенты считают, что система здравоохранения, в центре которой стоит пациент, должна основываться на таких принципах, как взаимоуважение, выбор и ответственность, вовлеченность, доступность и открытость.

### *1. Взаимоуважение*

Врач и пациент должны взаимодействовать только на принципах взаимоуважения и равноправного диалога.

Взаимное уважение и доверительное общение – неотъемлемый элемент эффективной коммуникации во взаимоотношениях «врач – пациент», «врач – врач», а также «пациент – пациент». Недопустимы грубые и негуманные отношения между медицинским работником и пациентом, унижение человеческого достоинства, а также любые проявления превосходства, агрессии, неприязни или эгоизма.

Медицинские работники и пациенты должны положить в основу взаимодействия рациональное использование времени друг друга (пунктуальность).

Условия оказания медицинской помощи должны соответствовать действующим санитарно-гигиеническим требованиям и обеспечивать комфортные условия пребывания пациентов в медицинской организации. Пациент должен соблюдать нормы гигиены с учетом своих возможностей.

В целях обеспечения безопасности и эффективности лечения пациенты, находящиеся в медицинской организации, обязаны соблюдать установленные правила внутреннего распорядка учреждения и режим лечения, в том числе определенный на период их временной нетрудоспособности.

Права медицинского работника, как и любого гражданина, регламентируются законодательством, в том числе права на защиту личностной неприкосновенности, профессионального достоинства и чести.

### *2. Выбор и ответственность*

Медицинские работники и пациенты являются полноправными субъектами системы здравоохранения и несут ответственность за принятые решения.

Медицинская помощь должна оказываться в условиях сохранения принципов свободы выбора и человеческого достоинства.

Мы считаем, что в рамках пациент-ориентированного подхода ответственность распределяется между работниками здравоохранения, пациен-

тами и обществом. Ответственность со стороны несовершеннолетнего пациента несут родители (законные представители) ребенка.

Оказывая медицинскую помощь, медицинский работник принимает на себя большую часть ответственности за профессиональное решение, а потому обязан отклонить любые попытки давления со стороны администрации, пациентов или иных лиц.

Пациенты имеют право и возможность участвовать в качестве партнеров в планировании мероприятий по сохранению и улучшению собственного здоровья с учетом их знаний и предпочтений.

Пациент имеет право на выбор лечащего врача в порядке, установленном законодательством. Медицинский работник не вправе препятствовать пациенту, решившему доверить свое дальнейшее лечение другому специалисту.

Медицинский работник имеет право отказаться от сотрудничества с пациентом, если имеются противоречия с ним или его родственниками в отношении лечения и обследования, или если пациент требует от него действий, противоречащих законодательству, этическим принципам и профессиональному долгу, в порядке, установленном действующим законодательством.

Медицинские работники и пациенты имеют право прибегать к общественной и юридической защите, а также защите со стороны профессиональных медицинских сообществ и общественных организаций.

Пациенты обязаны заботиться о сохранении своего здоровья. В случаях, предусмотренных законодательством Российской Федерации, граждане обязаны проходить медицинские осмотры, а больные, страдающие заболеваниями, представляющими опасность для окружающих, обязаны проходить медицинское обследование и лечение, а также заниматься профилактикой этих заболеваний.

Пациент имеет право отказаться от медицинского вмешательства или приостановить его. Осложнения, связанные с отказом или приостановкой вмешательства, должны быть четко объяснены пациенту.

### *3. Вовлеченность*

Под вовлеченностью мы понимаем стремление органов управления здравоохранением, медицинского сообщества и населения вносить максимальный вклад в достижение такого уровня здоровья, который позволит вести продуктивный в социальном и экономическом плане образ жизни.

Медицинские работники и пациенты имеют право и возможность принимать участие в формировании предложений по улучшению системы здравоохранения региона, активно и сознательно вовлекаться в процесс принятия решений на всех уровнях.

Медицинские работники могут состоять в профессиональных объединениях и ассоциациях (оказывать содействие их работе), активно участвующих в развитии системы здравоохранения.

Вовлеченность пациентов в разработку политики здравоохранения предусматривает возможность участия в общественных слушаниях, выражения личного и коллективного мнений в рамках обращений в органы управления здравоохранением, членства в общественных объединениях, создаваемых с целью защиты своих прав.

### *4. Доступность*

Система здравоохранения региона должна обеспечить предоставление населению необходимой медицинской помощи в объеме, определенном действующим законодательством.

Каждый человек имеет право на получение своевременной медицинской помощи, которая соответствует потребностям его здоровья, включая профилактические мероприятия.

Медицинская помощь должна быть доступна для всех в равной степени, без какой-либо дискриминации, и соответствовать финансовым, человеческим и материальным ресурсам, имеющимся в отрасли.

Все пациенты должны иметь доступ к необходимой им помощи независимо от их состояния и социально-экономического статуса.

Система здравоохранения должна принимать во внимание не связанные со здравоохранением факторы, такие как образование, занятость и вопросы семьи.

### *5. Открытость*

Пациент и медицинский работник имеют право на открытость информации, необходимой для принятия оптимальных решений в рамках их взаимодействия.

Вся информация, касающаяся медицинской помощи и возможностей ее получения, должна быть доступной для населения.

Пациент имеет право на получение достоверной и своевременной информации о факторах, способствующих сохранению здоровья или оказывающих на него вредное влияние.

Медицинский работник должен сообщать информацию пациенту в доступной форме, с минимальным использованием незнакомой специ-



альной терминологии. Информация о состоянии здоровья не может быть предоставлена пациенту против его воли.

Со стороны пациента требуется активное участие в процессе диагностики и лечения. Очень важно, чтобы пациент своевременно сообщал ме-

дицинским специалистам всю информацию, необходимую для постановки диагноза и лечения.

Призываем все заинтересованные стороны поддержать принципы, изложенные в декларации, и способствовать их внедрению и воплощению в жизнь.

## Сведения об авторах

**Деев Иван Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор, кафедра факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ, г. Томск. ORCID iD: 0000-0002-4449-4810.

**Барановская Светлана Викторовна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья СибГМУ, г. Томск.

**Бойков Вадим Андреевич**, канд. мед. наук, доцент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья СибГМУ, г. Томск. ORCID iD: 0000-0001-7532-7102.

**Грахов Виталий Николаевич**, гл. врач Межвузовской поликлиники, председатель правления НП «Медицинская палата Томской области», г. Томск.

**Кравченко Альбина Павловна**, гл. специалист, отдел организационной работы, контроля и делопроизводства Департамента здравоохранения Томской области, г. Томск.

**Кобякова Ольга Сергеевна**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей врачебной практики и поликлинической терапии, ректор СибГМУ, г. Томск. ORCID iD: 0000-0003-0098-1403.

**Малахова Светлана Владимировна**, директор Центра медицинской и фармацевтической информации, г. Томск.

**Таранов Александр Александрович**, гл. специалист по стратегическому планированию, Департамент здравоохранения Томской области, г. Томск.

**Шибалков Иван Петрович**, ассистент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Шибалков Иван Петрович**, e-mail: shibalkov.ivan@yandex.ru.

## Authors information

**Deev Ivan A.**, DM, Professor, Department of Pediatrics with Course of Childhood Diseases, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Baranovskaya Svetlana V.**, PhD, Associate Professor, Health Organization and Public Health Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Boykov Vadim A.**, PhD, Associate Professor, Health Organization and Public Health Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Grakhov Vitaliy N.**, Chief Doctor, Interuniversity polyclinic; Chairman of the Board, Medical Chamber of Tomsk Region, Tomsk, Russian Federation.

**Kravchenko Albina P.**, Chief Specialist, Department of Organizational Work, Control and Office Work, Healthcare Department of Tomsk Region, Tomsk, Russian Federation.

**Kobyakova Olga S.**, DM, Professor, Rector, Head of Polyclinic Therapy Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Malakhova Svetlana V.**, Director, Medical and Pharmaceutical Information Center, Tomsk, Russian Federation.

**Taranov Aleksandr A.**, Chief Specialist, Strategic Planning of Department of Industry Development, Healthcare Department of Tomsk Region, Tomsk, Russian Federation.

**Shibalkov Ivan P.**, Assistant, Health Organization and Public Health Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Shibalkov Ivan P.**, e-mail: shibalkov.ivan@yandex.ru.

Received 18.04.2019

Accepted 10.06.2019

Поступила в редакцию 18.04.2019

Подписана в печать 10.06.2019

УДК 615.277.3: 615.322:547.9  
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-181-194)

## Противоопухолевая активность флавоноидов

**Зверев Я.Ф.**

*Алтайский государственный медицинский университет (АГМУ)  
Россия, 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40*

### РЕЗЮМЕ

Обзор литературы посвящен рассмотрению механизмов противоопухолевого действия флавоноидов. Анτικанцероматозный эффект флавоноидов обсуждается в контексте их воздействия на основные этапы развития злокачественных опухолевых клеток. При этом подробно рассматривается влияние флавоноидов на активность протеинкиназ, металлопротеиназ, апоптоза, ангиогенеза и клеточного цикла опухолевых клеток.

**Ключевые слова:** флавоноиды, механизмы противоопухолевого действия.

**Конфликт интересов.** Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Автор заявляет об отсутствии финансирования при проведении исследования.

**Для цитирования:** Зверев Я.Ф. Противоопухолевая активность флавоноидов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 181–194. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-181-194).

---

УДК 615.277.3: 615.322:547.9  
[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-181-194)

## Antitumor activity of flavonoids

**Zverev Y.F.**

*Altai State Medical University (ASMU)  
40, Lenin Av., Barnaul, 656038, Russian Federation*

### ABSTRACT

This review of the literature is devoted to the consideration of mechanisms of the antitumor effect of flavonoids. The anticanceromatous effect of flavonoids is discussed in the context of their impact on the main stages of development of malignant tumor cells. At the same time, the influence of flavonoids on the activity of protein kinases, metalloproteinases, apoptosis, angiogenesis and the cell cycle of tumor cells is considered in detail.

**Key words:** flavonoids, mechanisms of antitumor effect.

---

✉ Зверев Яков Федорович, e-mail: [zver@agmu.ru](mailto:zver@agmu.ru).

**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 author states that there is no funding for the study.

**For citation:** Zverev Y.F. Antitumor activity of flavonoids. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 181–194. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-181-194>.

Флавоноиды – полифенольные соединения, содержащие, как видно из рис. 1, 15 углеродных атомов, образующих два ароматических кольца (А и В), соединенных с помощью трехуглеродного мостика (кольцо С).

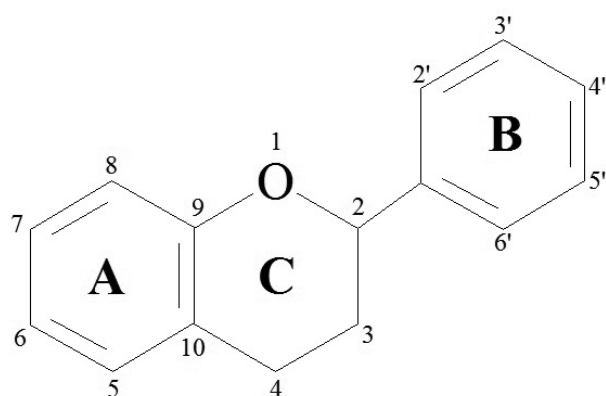


Рис. 1. Общая структура флавоноидов

Fig. 1. General structure of flavonoids

Эти соединения, являющиеся вторичными метаболитами, чаще в виде гликозидных форм выявляются во всех частях растений, где они выполняют ряд важных функций, определяя пигментацию, запах, вкус, рост и репродукцию. Флавоноиды участвуют в обеспечении природного иммунитета и резистентности растений к различным патогенным факторам бактериального, грибкового и вирусного происхождения, а также защиты от травоядных и насекомых. Сегодня идентифицировано около 10 000 флавоноидов, основная часть которых делится на шесть подклассов: флавонолы, флавоны, флаван-3-олы (включая проантоцианидины), антоцианидины, флавононы и изофлавоны (рис. 2).

Интерес к применению флавоноидов в качестве перспективных средств для профилактики и лечения различных злокачественных опухолей возник в 1970–1980-х гг. В 1975 г. в экспериментах *in vitro* было показано, что кверцетин, обильно присутствующий во многих овощах и фруктах и считающийся одним из наиболее перспективных противоопухолевых флавоноидов, проявляет ингибирующее влияние на развитие злокаче-

ственных клеток асцита Эрлиха L1210 и клеток лейкемии P-388 [1]. Эти результаты побудили к изучению эффективности флавоноидов на разнообразных моделях злокачественных опухолей у животных.

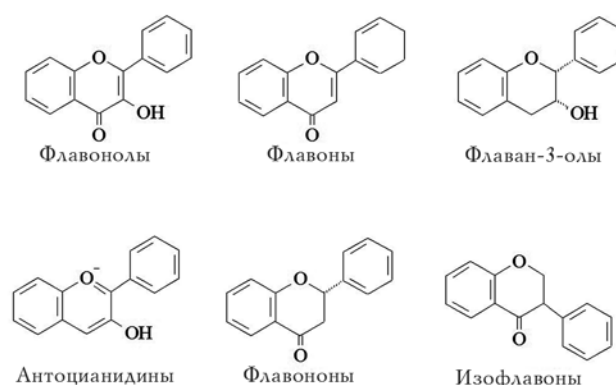


Рис. 2. Основные подклассы флавоноидов

Fig. 2. Main subclasses of flavonoids

Проведенные эксперименты дали весьма обнадеживающие результаты [2–5]. Что касается кверцетина, у этого полигидроксированного флавонола впоследствии был выявлен мощный ингибирующий эффект в отношении развития опухолевых клеточных линий рака желудка, толстой кишки, молочной железы, яичников, эпидермиса, печени, поджелудочной железы, карциномы головы и шеи человека. Кроме того, тот же кверцетин ингибировал активность полициклических ароматических углеводов, вовлеченных в канцерогенез легочной ткани [6–14]. Появились также сведения, согласно которым риск возникновения рака толстой кишки, молочной железы и простаты значительно ниже у жителей азиатских стран в сравнении с европейцами, что прямо коррелирует со значительно большим потреблением овощей, фруктов и чая [9, 14, 15]. Установлено также, что использование диеты, богатой овощами и фруктами, наряду с поддержанием высокой физической активности и адекватной массы тела снижает частоту случаев рака на 30–40% [16], а у вегетарианцев риск возникновения различных типов рака существенно ниже [17]. Как бы там

ни было, сегодня имеются достаточно серьезные основания полагать, что многие флавоноиды оказывают протективное действие в отношении развития опухолей органов ротовой полости, желудка, двенадцатиперстной кишки, печени, легких, кожи, яичников, шейки матки, молочной и предстательной желез. При этом благоприятный эффект, кроме кверцетина и других флавонолов, присущ флаван-3-олам, антоцианидинам, изофлавонам, флаванонам, флавонам и другим полифенольным соединениям растительного происхождения [14, 16, 18–25].

Проведенные за последние десятилетия многочисленные исследования, включающие эксперименты *in vitro* с использованием разнообразных культур опухолевых клеток, опыты *ex vivo* с моделированием на животных, а также ряд эпидемиологических испытаний дали серьезные основания полагать, что флавоноиды способны ингибировать три этапа развития раковых клеток: инициирование, активирование (промоцию) и распространение. На первых этапах это воздействие включает влияние на оксидативный стресс, инактивацию канцерогенов, ингибирование клеточной пролиферации. На этапе распространения эффективность флавоноидов, по-видимому, состоит в активации апоптоза, ингибировании ангиогенеза и подавлении метастазирования опухоли [9, 16, 20, 23, 26–33].

Влияние флавоноидов на этап инициирования раковых клеток, по-видимому, связано с их известным антиоксидантным действием и обусловлено воздействием на активность детоксицирующих ферментов I и II фаз. Показано, что ряд флавоноидов ингибирует действие ферментов I фазы метаболизма системы цитохрома P450, таких как CYP1A1 и CYP1A2, которые активируют канцерогенные свойства ряда ксенобиотиков [20, 23, 25, 34]. Возможно, такой эффект обусловлен взаимодействием с радикалами и способностью отдавать электрон (или атом водорода), что обеспечивает их влияние на клеточные протеины, в том числе и ферменты, генерирующие радикалы, такие как изоформы цитохрома P450 [25]. Относительно ферментов II фазы метаболизма флавоноиды проявляют принципиально иное действие. Хорошо известно, что ферменты II фазы детоксицируют электрофильные экзогенные карциногены посредством глюкуронизации, сульфатирования, метилирования, ацетилирования, конъюгации с глутатионом, в результате чего образуются гидрофильные соединения, легко экскретируемые с желчью и мочой. Так, на моделях клеточных культур показано, что генистеин стимулирует ак-

тивность детоксицирующих и антиоксидантных ферментов II фазы посредством индукции сигнальных путей протеинкиназы ERK1/2 и протеинкиназы C (PKC). Это обуславливает активацию фактора транскрипции Nrf2 и через связывание с последовательностью ARE в промотерном регионе генов обеспечивает экспрессию детоксицирующих ферментов, а также защиту от карциногенов [28, 35–38]. В клинике было зафиксировано, что при потреблении мужчинами с высокой степенью интраэпителиальной неоплазии предстательной железы флаван-3-олов, содержащихся в чае, развивается превентивный эффект, заключающийся в ингибировании конверсии неоплазии в рак [39]. Здесь следует отметить и давнюю точку зрения о том, что полифенольные соединения могут образовывать нетоксические хиноидные соединения, которые сами по себе являются субстратом для детоксицирующих ферментов II фазы метаболизма и, таким образом, индуцируют общее повышение защиты организма от токсических ксенобиотиков [40].

Важнейшую роль в механизме противоопухолевого действия флавоноидов играет их способность угнетать процесс пролиферации злокачественных клеток. По-видимому, это в значительной степени обусловлено ингибирующим влиянием данных полифенолов на цепь биохимических событий, связанных с клеточным ростом [9]. Так, еще в ранних исследованиях было показано, что кверцетин подавлял аэробный гликолиз в опухолевых клетках, а также ингибировал белковый синтез в клеточных культурах ряда опухолей и повышал в этих клетках уровень циклического аденозинмонофосфата (АМФ) [1, 41, 42]. В этом контексте отметим роль активируемой 5' АМФ протеинкиназы АМФК (АМРК), контролирующей энергетический баланс клетки. Блокируя синтез жирных кислот и ускоряя их окисление, АМФК регулирует клеточный цикл и пролиферацию клеток. Активация АМФК подавляет развитие в первую очередь раковых клеток, что сочетается со стимулированием их апоптоза. Неудивительно поэтому, что применение флавонона кризина, активируя АМФК, обеспечивало ингибирование роста клеток рака легкого и индуцировало их апоптоз [43]. Недавно было высказано предположение, что антипролиферативный эффект флавонона гесперетина в отношении клеток рака молочной железы обусловлен подавлением поглощения глюкозы [44]. Подобный эффект был позднее выявлен у флавонола кемпферола [45].

Однако сегодня большинство авторов полагают, что в основе антипролиферативного дей-

ствия флавоноидов, как и замедления клеточного цикла, лежит ингибирующее воздействие на процессы внутриклеточной трансдукции в опухолевых клетках. Причем особое значение придается угнетению активности серин/треониновых и тирозиновых протеинкиназ [9]. Особо цитируемые авторы отмечают роль РКС, тирозинкиназы эпидермального фактора роста (EGFR) и киназы фокальной адгезии (ФАК). Оказалось, что увеличение экспрессии протеинкиназ характерно для опухолевых клеток, а развитие ряда опухолей сопровождается повышенной активностью этих ферментов. В экспериментах *in vitro* способность ингибировать активность отмеченных протеинкиназ установлена для кверцетина, лютеолина, битеина, генистеина [46–54]. В последнее время появились сведения о важной роли сигнального пути Wnt, участвующем в контроле за клеточной дифференцировкой, пролиферацией и клеточной подвижностью, которую клетки приобретают в процессе эпителиально-мезенхимального перехода и которая необходима для реализации инвазии и метастазирования. Нарушение регуляции, активация или мутационные изменения этого пути способствуют развитию меланомы, рака прямой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, желудочной карциномы, глиобластомы, лейкемии, рака молочной железы [55–58]. Появились сведения, согласно которым антипролиферативная активность флавоноидов может быть связана с их способностью ингибировать этот путь на разных уровнях. По крайней мере, гликозилированная форма кверцетина изокверцетин, а также генистеин, изорамнетин и эпигаллокатехин-галлат (EGCG) прямо угнетали ядерную транслокацию белка  $\beta$ -катенина, важного модулятора Wnt-пути, обеспечивая существенный антипролиферативный эффект в отношении опухолевых клеток [59–63].

Значительное число исследований, посвященных противоопухолевому действию флавоноидов, касается их влияния на апоптоз. Известно, что активация апоптоза является одним из важнейших путей, посредством которых противоопухолевые препараты подавляют рост раковых клеток. Апоптоз, как комплексный запрограммированный процесс, включает рецептор-зависимый (внешний) и митохондриальный (внутренний) сигнальный пути. Рецептор-зависимый путь обеспечивается активацией лигандами и трансмембранными рецепторами смерти, которые через стимуляцию внутриклеточных адаптерных белков обуславливают активацию инициаторных каспаз, формируя сигнальный комплекс DISC. Митохондриальный путь реализуется через действие таких

проапоптозных факторов, как Вах, Bak, Bax/Mtd. Эти факторы повышают проницаемость наружных мембран митохондрий, обеспечивая выход из межмембранного пространства в цитоплазму растворимых белков цитохрома С, прокаспаз, AIF. Оба пути, которые на определенном этапе, как правило, перекрещиваются, приводят к активированию эффекторных каспаз инициаторными, что обуславливает формирование апоптозных телец. Важную роль в процессе регулирования апоптоза, кроме упомянутых выше проапоптозных факторов, играют антиапоптозные факторы Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w и другие, а также фактор транскрипции p53, наиболее известный супрессор опухолей, выполняющий функцию сенсора повреждения ДНК. При необходимости этот ген останавливает клеточный цикл и индуцирует репарацию. Если же повреждение ДНК необратимо – направляет клетку по пути апоптоза [64].

Исследования последних десятилетий убедительно показывают, что целый ряд пищевых флавоноидов способен индуцировать апоптоз на различных моделях канцерогенеза [19, 21, 65–67]. При этом именно с индукцией апоптоза связывают выявленную в последние годы противораковую активность кверцетина, лютеолина, генистеина, дайдзеина, апигенина, EGCG, байкалеина, нарингенина, гесперетина, кемпферола, мирицетина, галангина, изорамнетина, тангереина [14, 68–80]. Следует отметить, что стимуляция апоптоза способствует решению одной из ключевых проблем лечения злокачественных опухолей – резистентности опухолевых клеток к действию цитостатических агентов. И в этом контексте флавоноиды, многие из которых активируют апоптоз, могут вносить существенный вклад в консервативное лечение злокачественных новообразований. К сожалению, несмотря на то, что наши знания, касающиеся сигнальных путей развития апоптоза, за последние годы существенно расширились, многое в механизме действия флавоноидов остается не до конца понятным.

Не вдаваясь в детали механизмов апоптоза и его регуляции, отметим, что, по всей видимости, пути, с помощью которых флавоноиды инициируют этот процесс в различных клеточных культурах и на разнообразных моделях, существенно различаются. Так, получены сведения, согласно которым флавоноиды способны: 1) наряду с каспазами и проапоптозными белками активировать лиганды и рецепторы смерти; 2) подавлять экспрессию антиапоптозных белков в результате негативной регуляции активности транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и многих других внутри-

клеточных путей трансдукции; 3) фосфорилировать и стабилизировать белок p53; 4) объединять несколько из перечисленных механизмов. Например, EGCG ингибировал клеточную пролиферацию и индуцировал апоптоз в различных типах опухолевых клеток, угнетая активацию рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) и подавляя экспрессию ингибитора апоптоза сурвивина, что, вероятно, было связано со стимуляцией активности белка p53. Кроме того, EGCG увеличивал экспрессию проапоптозного белка Bax, повышал известное соотношение про- и антиапоптозных белков Bax/Bcl-2 с последующей активацией каспаз. Таким образом, этот катехин сдвигал баланс про- и антиапоптозных протеинов в сторону индукции апоптоза [64, 81–87]. Подобное действие было обнаружено у флаванонов нарингенина, тангеретина и гесперетина [88–91], флавонов апигенина и лютеолина [92–95], флавонолов кверцетина, кемпферола и мирицитина [95–100], изофлавонов дайдзеина и генистеина [71, 77].

Как выяснилось, индукция апоптоза может быть обусловлена подавлением полифункционального транскрипционного фактора NF-κB, кодируемого геном *REL*, который активируется антиапоптозными сигналами, передаваемыми с рецепторов смерти TRAF-1 и TRAF-2 по R13K-пути. Активируя экспрессию антиапоптозных генов семейств Bcl-2 и IAP, NF-κB обуславливает такие аспекты канцерогенеза, как бесконтрольная пролиферация, предотвращение апоптоза, опухолевый ангиогенез и метастазирование [64, 101]. В экспериментах на культурах клеток опухоли толстой кишки и рака предстательной железы человека антоцианидин делфинидин индуцировал апоптоз и обеспечивал задержку клеточного цикла [102, 103]. Способность подавлять активность фактора NF-κB выявлена и у других флавоноидов, включая флаваноны нарингенин и гесперетин, флавоны лютеолин, изофлавоны генистеин [14, 90, 104, 105].

Хорошо известно, что степень инвазивного роста и метастазирования в значительной мере определяет опасность развития опухолевых заболеваний. Эти процессы обеспечиваются способностью опухолевых клеток расщеплять компоненты внеклеточного матрикса, включающего базальную мембрану и межтканевую строму, состоящую из различных структурных белков. В свое время возможность антиинвазивного действия связывалась с предполагаемым прямым влиянием флавоноидов на структурные элементы внеклеточного матрикса [106]. В последние годы

установлено, что ключевую роль в функционировании внеклеточного матрикса играет ряд матриксных металлопротеиназ (ММП), протеолитических  $Zn^{2+}$ -содержащих кальций-зависимых ферментов, способных лизировать компоненты внеклеточного матрикса, индуцируя инвазию опухолевых клеток, и стимулировать неоангиогенез в опухолевой ткани. Установлено, что при злокачественных опухолях предстательной и молочной желез, яичников, шейки матки, печени, поджелудочной железы, толстого кишечника, легких, гортани, мочевого пузыря, почек продукция некоторых ММП (главным образом ММП-2, ММП-7 и ММП-9) прямо коррелирует с инвазией и метастазированием рака [9, 107, 108].

Исходя из изложенного, ясно, что ингибирование активности ряда ММП является перспективной стратегией в лечении многих опухолевых заболеваний. В этом контексте следует отметить некоторые обнадеживающие результаты применения флавоноидов. Так, показано, что в некоторых типах клеток флавоноиды проявили способность ингибировать биосинтез ММП [109, 110]. Обнаружено, что кверцетин, наряду с лютеолином, уменьшал инвазию некоторых раковых клеток параллельно с подавлением секреции ММП-2 и ММП-9, а также дозозависимо снижал активность проматаллопротеиназы-9 [9, 111]. Подобное действие было выявлено у изофлавоны генистеина, который *in vitro* ингибировал активность высоко метастазирующих клеток рака молочной железы параллельно с угнетением активности ММП-9 [112, 113]. Наконец, в прямых экспериментах было обнаружено ингибирующее действие лютеолина, кверцетина и апигенина в отношении активности ММП-2 и ММП-9 [114]. Снижение активности отмеченных металлопротеиназ было выявлено также в условиях применения зеленого чая и фруктовых экстрактов, богатых флавоноидами [115–117].

Относительно механизмов угнетения матриксных металлопротеиназ под влиянием флавоноидов исчерпывающих сведений не существует. Не исключено, что данный эффект обусловлен уже отмечавшимся антитирозинкиназным влиянием флавоноидов. Так, на клеточной культуре показано, что эпидермальный фактор роста (EGF) активировал секрецию ММП-2 и ММП-9 опухолевыми клетками, а лютеолин и кверцетин подавляли это действие. Исходя из этих результатов, авторами было сделано предположение, согласно которому вещества, угнетающие тирозинкиназу EGFR, могут быть потенциальными ингибиторами метастазирования [9]. Ранее подобная мысль



была высказана относительно антиинвазивного действия ингибитора тирозинкиназ изофлаво-на генистеина [118]. А недавно были получены сведения, касающиеся способности флавонола кемпферола одновременно ингибировать инвазию клеток рака молочной железы и активность ММП-9 путем блокирования протеинкиназного сигнального пути РКС/МАРК/АР-1 [80].

Одним из факторов, увеличивающих злокачественный потенциал опухоли и способствующих метастазированию, является опухолевый ангиогенез, несмотря на определенную неполноценность вновь образующихся сосудов. При этом ряд факторов, таких как гипоксия, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста, выделяемый тромбоцитами (PDGF), факторы роста фибробластов (FGF-1, FGF-2), ангиопоэтин-1 (ang-1) и другие, вырабатываемые клетками опухоли, стромы, эндотелия и крови, а также внеклеточным матриксом, способны стимулировать опухолевый ангиогенез. Соответственно, существуют и факторы в виде антиангиогенных молекул, препятствующие формированию опухолевых сосудов. Преобладание ангиогенных факторов над антиангиогенными в значительной степени определяет пролиферацию опухоли и ее метастазирование. Причем одним из ключевых моментов ангиогенеза является деструкция базальной мембраны, что обуславливает миграцию эндотелиальных клеток, необходимых для процесса неоваскуляризации [21, 108, 119, 120].

Как выяснилось, противоопухолевая активность ряда флавоноидов может быть обусловлена их ингибирующим воздействием на неоангиогенез. Антиангиогенный потенциал, например, был обнаружен у EGCG [121]. Флавоноид апигенин в экспериментах *in vitro* и *in vivo* подавлял опухолевый ангиогенез через снижение экспрессии VEGF и индуцирующего гипоксию фактора HIF-1 $\alpha$ . В другом исследовании апигенин ингибировал экспрессию VEGF и мРНК эритропоэтина, являющегося типичным индуцируемым гипоксией геном, посредством деградации HIF-1 $\alpha$  [122]. Кроме того, было показано, что апигенин значительно ингибировал индуцируемую VEGF/FGF стимуляцию активности металлопротеиназ ММП-1 и МТ1-ММП и активность активатора плазминогена PAI-1, а также обеспечивал активацию ингибиторов ММП, что в совокупности обеспечивало угнетение ангиогенеза [109]. В экспериментах *in vivo* тот же апигенин ингибировал ангиогенез и полностью предупреждал метастазирование опухоли предстательной железы у мышей, что, по-видимому, модулировалось влиянием на сиг-

нальный путь, вовлекающий фосфатидилинозитольный каскад [123]. Угнетающее ангиогенез действие выявлено и у кверцетина. Давно известно, что этот флавоноид нарушает стимулируемую TNF индукцию молекул эндотелиальной клеточной адгезии [9, 124, 125]. Совсем недавно в экспериментах на мышах с раком молочной железы обнаружено, что кверцетин угнетал ангиогенез посредством подавления пути, обеспечиваемого рецепторами VEGFR2 [126]. Убедительные данные в обсуждаемом контексте получены при изучении изофлавонов, в первую очередь генистеина и его метаболитов. Благодаря усилиям греческих исследователей установлено, что генистеин существенно ослабляет ангиогенез [127–129]. Попутно отметим, что этой же группой авторов было продемонстрировано угнетающее ангиогенез действие другого флавоноида лютеолина. Это действие предположительно было обусловлено влиянием на фосфатидилинозитольный каскад и приводило к ингибированию собственного VEGF эффекта [130]. Возвращаясь к генистеину, отметим, что, как и в вышеприведенных экспериментах с использованием апигенина, ингибирование генистеином опухолевого ангиогенеза, по-видимому, было обусловлено угнетением активности металлопротеиназ и плазминогена, а также повышением активности ингибиторов ММП [109]. Столь выраженный эффект генистеина позволил назвать этот флавоноид «представителем нового класса антиангиогенных соединений» [9]. Касаясь другого изофлавоноидов формонетина, отметим, что в недавних экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что это полифенольное соединение подавляло опухолевый ангиогенез, ингибируя запускаемую FGF-2 активацию FGFR2 и PI/AKT/mTOR сигнальный путь [131].

Как известно, дисрегуляция клеточного цикла ведет к нарушению роста и развития эукариотических клеток, а неконтролируемая пролиферация вносит существенный вклад в их злокачественный фенотип. Раковые клетки развиваются в условиях недостаточного контроля за клеточным циклом, что обуславливает их сверхактивную пролиферацию. Последовательность клеточного цикла включает четко регулируемые фазы G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> и M. В постмитотический период (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) клетка находится в состоянии покоя. В этот период происходит накопление материала (РНК) с целью подготовки к переходу в фазу синтеза S, когда происходит репликация ДНК. Временная точка, характеризующаяся моментом необратимого перехода к делению (из фазы G<sub>1</sub> к фазе S), называется точкой рестрикции R. Вторая подоб-

ная точка выявлена в фазу G2 и предупреждает необходимость перехода фазы G2 в фазу M до тех пор, пока не произойдет восстановление поврежденной ДНК. Во время фазы G2 осуществляются контроль за точностью произошедшей редупликации ДНК с исправлением, возможно, допущенных неточностей, а также накопление энергетических ресурсов для предстоящего митоза. Наконец, в фазу M происходит митоз (деление ядра) и цитокинез (деление цитоплазмы). Важно отметить, что описываемый процесс находится под жестким генетическим контролем. Регуляторными протеинами клеточного цикла являются циклины (A, B, D, E) и циклинзависимые киназы (Cdk-1, Cdk-2, Cdk-4, Cdk-6), ингибиторы Cdk, такие как p21WAF1, p27KIP1, p73 и другие, а также фосфорилированная ретинобластома pRb. Перечисленные ингибиторы называются опухолевыми супрессорами. Отсутствие их экспрессии или потеря активности проявляются в прогрессировании канцерогенеза [64, 132, 133].

Сегодня выяснено, что многие флавоноиды регулируют активность протеинов клеточного цикла, что обуславливает ингибирование пролиферации раковых клеток. При этом обеспечивается воздействие на различные точки этого процесса. Например, показано, что апоптоз сопровождается уменьшением количества клеток, пребывающих в периоде G0/G1, и увеличением числа клеток, находящихся в периоде G2/M, что указывает на задержку клеточного цикла в фазах G2 и M [21, 134].

Обращаясь к действию конкретных флавоноидов, отметим, что кверцетин вызывал задержку периода G2/M клеток линии сквамозной эзофагальной карциномы посредством повышения экспрессии ингибиторов Cdkp73 и p21WAF1, а это приводило к снижению активности циклина B1 [135]. В недавнем исследовании выявлено, что кверцетин задерживал прогрессию клеточного цикла раковых клеток в фазу S, прямо воздействуя на ДНК. Последнее привело к активации апоптоза. Авторы цитируемой работы назвали кверцетин многообещающим кандидатом в терапии рака [136]. При изучении действия другого флавонола – кемпферола выяснилось, что он индуцировал задержку клеточного цикла в фазу G1 в пределах 6 ч и периода G2/M в пределах 12 ч в клетках толстой кишки человека. При этом задержка клеточного цикла наблюдалась на фоне ингибирования как циклинов A, D1 и E, так и циклинзависимых киназ Cdk-2, Cdk-4 и Rb [137]. В экспериментах, проведенных на клетках лейкемии человека, кемпферол активировал точку рестрикции фазы G2, что обусловило не толь-

ко задержку клеточного цикла, но и активацию фосфорилирования протеина p53 с последующей индукцией митохондриального апоптоза [138]. Сходным образом флавоноид апигенин повышал скорость апоптоза, индуцируя задержку клеточного цикла в период G2/M в клетках гепатомы. Показано также, что апигенин блокировал пролиферацию клеток лейкемии не только в период G2/M, но и в более ранний период G0/G1 [104, 139]. Задержка клеточного цикла, наблюдавшаяся в клетках лейкемии при использовании другого флавоноид байкалеина, была обусловлена воздействием на раннюю фазу G1 [140]. Подобным образом флаван-3-ол EGCG наряду с индукцией апоптоза вызывал задержку клеточного цикла клеток анапластической тиреоидной карциномы, угнетая циклин B1 и Cdk-1, одновременно активируя ингибитор Cdk p21 [85]. Флаванон гесперидин вызывал задержку клеточного цикла клеток рака шейки матки, подавляя на клеточном уровне экспрессию циклинов D1 и E1, а также циклинзависимой киназы Cdk-2 [141]. Существенная задержка клеточного цикла выявлена при изучении ряда изофлавонов. Так, цитотоксичность дайдзеина на различных клеточных линиях наряду с индукцией апоптоза за счет ингибирования экспрессии антиапоптозных протеинов была обусловлена задержкой клеточного цикла в период G2/M [142]. Интересно, что отмеченные в приведенной работе изменения происходили на фоне индуцирования повышенного уровня реактивных форм кислорода. Формонетин подавлял пролиферацию клеток рака легкого человека, индуцируя задержку клеточного цикла в фазе G1. Причем выявленному эффекту сопутствовали изменения протеинов циклина A, циклина D1 и протеина p21. Наряду с этим активировался апоптоз, что было обусловлено повышением фосфорилированного протеина p53 [143]. В другой работе этот же изофлавоноид проявил активность в виде задержки клеточного цикла в фазе G1 клеток рака предстательной железы, что было обусловлено инактивацией каскада Akt/циклин D1/Cdk-4 [144].

Следует заметить, что в механизмах противоопухолевого действия флавоноидов сохраняется много белых пятен. До сих пор, например, не ясна роль прооксидантного эффекта некоторых флавоноидов в развитии канцерогенеза. Не исключено, что стимулирование образования активных форм кислорода должно усиливать цитотоксичность в отношении опухолевых клеток.

Подводя итоги обзора, отметим, что сегодня не вызывает сомнений благоприятное влияние пищевых флавоноидов на организм человека, обуслов-

ленное их высокой биологической активностью. В последние десятилетия установлено, что рассматриваемыми выше видами действия биологическая активность флавоноидов отнюдь не исчерпывается. Кроме хорошо известных антиоксидантного, противовоспалительного и противоопухолевого эффектов следует отметить такие виды активности, как противоишемическая, антигипертензивная, противодиабетическая, противомикробная, противовирусная, антитромбогенная, эстрогенная, нейротропная и др. Это косвенно подтверждается огромным количеством эпидемиологических исследований, проведенных в последние годы.

В то же время существует много проблем, препятствующих как целенаправленному клиническому применению флавоноидов, так и созданию на их основе индивидуальных высокоэффективных лекарственных препаратов. Первая из них определяется особенностями фармакокинетики флавоноидов. Подавляющее большинство выявленных видов фармакологической активности подтверждено в экспериментах *in vitro*, но достигнуть их адекватной концентрации в организме ввиду особенностей метаболизма удается далеко не всегда. К существенному же повышению дозировки большинство клиницистов относится с оправданной настороженностью по причине возможных и пока не установленных побочных эффектов. Кроме того, механизмы их фармакологического действия, учитывая современные подходы к требованиям доказательной медицины, нуждаются в дальнейшем углубленном комплексном изучении. Тем не менее нам близок оптимистический взгляд на перспективу клинического применения флавоноидов, что, кроме выявленного многообразия биологической активности, обусловлено относительной дешевизной получения лекарственных препаратов и большой распространенностью этих пищевых полифенолов в окружающей нас природе.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Soulinna E.M., Buchsbaum R.N., Racker E. The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Res.* 1975; 35 (7): 1865–1872.
2. Edwards J.M., Raffauf R.F., Le Quesne P.W. Antineoplastic activity and cytotoxicity of flavones, isoflavones and flavanones. *J. Nat. Prod.* 1979; 42 (1): 85–91. DOI: 10.1021/np50001a002.
3. Molnár J., Béládi I., Domonkos K., Földeák S., Boda K., Veckenstedt A. Antitumor activity of flavonoids on NK/Ly ascites tumor cells. *Neoplasma.* 1981; 28 (1): 11–18.
4. Castillo M.H., Perkins E., Campbell J.H., Doerr R., Hassett J.M., Kandaswami C., Middleton E. The effects of the bioflavonoids quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin. *Am. J. Surg.* 1989; 158 (4): 351–355. DOI: 10.1016/0002-9610(89)90132-3.
5. Caltagirone S., Rossi C., Poggi A., Ranelletti F.O., Natali P.G., Brunetti M., Aiello F.B., Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int. J. Cancer.* 2000; 87 (4): 595–600. DOI: 10.1002/1097-0215(20000815)87: 4<595::aid-ijc21>3.0.co; 2-5.
6. Denison M.S., Pandini A., Nagy S.R., Baldwin E.P., Bonati L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* 2002; 141 (1–2): 3–24. DOI: 10.1016/s0009-2797(02)00063-7.
7. Denison M.S., Nagy S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003; 43 (1): 309–334. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828.
8. Murakami A., Ashida H., Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* 2008; 269 (2): 315–325. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.046.
9. Kandaswami C., Lee L.T., Lee P.P., Hwang J.J., Ke F.C., Huang Y.T., Lee M.T. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo.* 2005; 19 (5): 895–909.
10. Christensen K.Y., Naidu A., Parent M.E., Pintos J., Abrahamowicz M., Siemiatycki J., Koushik A. The risk of lung cancer related to dietary intake of flavonoids. *Nutr. Cancer.* 2012; 64 (7): 964–974. DOI: 10.1080/01635581.2012.717677.
11. Zamora-Ros R., Not C., Guiny E., Luján-Barroso L., Garcia R.M., Biondo S., Salazar R., Moreno V. Association between habitual dietary flavonoid and lignin intake and colorectal cancer in a Spanish case-control study (The Bellvitge Colorectal Cancer Study). *Cancer Causes Control.* 2013; 24 (3): 549–557. DOI: 10.1007/s10552-012-9992-z.
12. Woo H.D., Lee J., Choi I.I., Kim C., Lee J., Kwon O., Kim J. Dietary flavonoids and gastric cancer risk in a Korean population. *Nutrients.* 2014; 6 (11): 4961–4973. DOI: 10.3390/nu6114961.
13. Tse G., Eslick G.D. Soy and isoflavone consumption and risk of gastrointestinal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Nutr.* 2016; 55 (1): 63–73. DOI: 10.1007/s00394-014-0824-7.
14. Zhou Y., Zheng J., Li Y., Xu D.P., Li S., Chen Y.M., Li H.B. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients.* 2016; 8 (8): E515. DOI: 10.3390/nu 8080515.
15. Hui C., Qi X., Qianrong Z., Xiaoli P., Jundong Z., Mantian M. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *PloS One.* 2013; 8 (1): e54318. DOI: 10.1371/journal.pone.0054318.
16. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn. Rev.* 2014; 8 (16): 122–146. DOI: 10.4103/0973-7847.134247.
17. Yin F., Giuliano A.E., Law R.E., Van Herle A.J. Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating

- cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2001; 21 (1A): 413–420.
18. Johnson I.T., Williamson G., Musk S.R.R. Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients? *Nutr. Res. Rev.* 1994; 7 (1): 175–204. DOI: 10.1079/nrr19940011.
  19. Amin A.R.M.R., Kucuk O., Khuri F.R., Shin D.M. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27 (16): 2712–2725. DOI: 10.1200/jco.2008.20.6235.
  20. Pandey K.B., Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Long.* 2009; 2 (5): 270–278. DOI: 10.4161/oxim.2.5.9498.
  21. Pratheeshkumar P., Sreekala C., Zhang Z., Budhraj A., Ding S., Son Y.O., Wang X., Hitron A., Kim H.J., Wang L., Lee J.C., Shi X. Cancer prevention with promising natural products: Mechanisms of action and molecular targets. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012; 12 (10): 1159–1184. DOI: 10.2174/187152012803833035.
  22. Romano B., Pagano E., Montanaro V., Fortunato A.L., Milic N., Borrelli F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytother. Res.* 2013; 27 (11): 1588–1596. DOI: 10.1002/ptr.5023.
  23. Kozłowska A., Szostak-Wegierek D. Flavonoids – food sources and health benefits. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 2014; 65 (2): 79–85.
  24. Li Q., Ren F.Q., Yang C.L., Zhou L.M., Liu Y.Y., Xiao J., Zhu L., Wang Z.G. Anti-proliferation effects of isorhamnetin on lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015; 16 (7): 3035–3042. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.7.3035.
  25. Amararathna M., Johnston M.R., Rupasinghe H.P.V. Plant polyphenols as chemopreventive agents for lung cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (8): 1352. DOI: 10.3390/ijms17081352.
  26. Middleton E.Jr., Kandaswami C., Theoharidis T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for inflammations, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52 (4): 673–751.
  27. Mantena S.K. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2005; 27 (8): 1682–1691. DOI: 10.1093/carcin/bgl030.
  28. Chachar M.K., Sharma N., Dobhal M.P., Joshi Y.C. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.* 2011; 5 (9): 1–12. DOI: 10.4103/0973-7847.79093.
  29. Kilani-Jaziri S., Frachet V., Bhouri W., Ghedira K., Chekir-Ghedira L., Ronot X. Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis. *Drug. Chem. Toxicol.* 2012; 35 (1): 1–10. DOI: 10.3109/01480545.2011.564180.
  30. Majewski G., Lubecka-Pietruszewska K., Kaufman-Szymczak A., Fabianowska-Majewska K. Anticarcinogenic capabilities of plant polyphenols: Flavonoids and stilbene. *Pol. J. Public Health.* 2012; 122 (4): 434–439. DOI: 10.12923/j.0044-2011/122-4/a.19.
  31. Li F., Li S., Li H.B., Deng G.F., Ling W.H., Xu X.R. Antiproliferative activities of tea and herbal infusions. *Food Funct.* 2013; 4 (4): 530–538. DOI: 10.1039/c2fo30252g.
  32. Li F., Li S., Li H.B., Deng G.F., Ling W.H., Wu S., Xu X.R., Chen F. Antiproliferative activity of peels, pulps and seeds of 61 fruits. *J. Funct. Foods.* 2013; 5 (3): 1298–1309. DOI: 10.1016/j.jff.2013.04.016.
  33. Li A.N., Li S., Zhang Y.J., Xu X.R., Chen Y.M., Li H.B. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients.* 2014; 6 (12): 6020–6047. DOI: 10.3390/nu6126020.
  34. Scalbert A., Manach C., Morand C., Révész C., Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005; 45 (4): 287–306. DOI: 10.1080/1040869059096.
  35. Aoki Y., Hashimoto A.H., Amanuma K., Matsumoto M., Hiyoshi K., Takano H., Masumura K., Itoh K., Nohmi T., Yamamoto M. Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient gpt delta mice. *Cancer Res.* 2007; 67 (12): 5643–5648. DOI: 10.1158/0008-5472.can-06-3355.
  36. Krajka-Kuźniak V. Induction of phase II enzymes as a strategy in the chemoprevention of cancer and other degenerative diseases. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2007; 61: 627–638.
  37. Xiao H., Lü F., Stewart D., Zhang Y. Mechanisms underlying chemopreventive effects of flavonoids via multiple signaling nodes within Nrf2-ARE and AhR-XRE gene regulatory networks. *Curr. Chem. Biol.* 2013; 7 (2): 151–176. DOI: 10.2174/2212796811307020008.
  38. Zhai X., Lin M., Zhang F., Hu Y., Xu X., Li Y., Liu K., Ma X., Tian X., Yao J. Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013; 57 (2): 249–259. DOI: 10.1002/mnfr.201200536.
  39. Khan N., Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett.* 2008; 269 (2): 269–280. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.04.014.
  40. Talalay P., De Long M.J., Prochaska H.J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85 (21): 8261–8265. DOI: 10.1073/pnas.85.21.8261.
  41. Graziani Y., Winikoff J., Chayoth R. Regulation of cyclic AMP level and lactic acid production in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977; 497 (2): 499–506. DOI: 10.1016/0304-4165(77)90207-0.
  42. Jullien M., Villaudy J., Golde A., Harel L. Inhibition by quercetin of the release of density-dependent inhibition of cell growth in RCV-transformed chicken cells. *Cell. Biol. Int. Rep.* 1984; 8 (11): 939–947. DOI: 10.1016/0309-1651(84)90192-9.

43. Shao J.J., Zhang A.P., Qin W., Zheng L., Zhu Y., Chen X. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation is involved in chrysin-induced growth inhibition and apoptosis in cultured A549 lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 423 (3): 448–453. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.123.
44. Yang Y., Wolfram J., Boom K., Fang X., Shen H., Ferrari M. Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells. *Cell. Biochem. Funct.* 2013; 31 (5): 374–379. DOI: 10.1002/cbf.2905.
45. Azevedo C., Correia-Branco A., Araújo J.R., Guimarães J.T. The chemopreventive effect of the dietary compound kaempferol on the MCF-7 human breast cancer cell lines is dependent in inhibition of glucose cellular uptake. *Nutr. Cancer.* 2015; 67 (3): 504–513. DOI: 10.1080/01635581.2015.1002625.
46. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. Genistein a specific inhibitor of tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 1987; 262 (12): 5592–5595.
47. Merlino G.T., Xu Y.H., Ishii S., Clark A., Semba K., Toyoshima K., Yamamoto T., Pastan I. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science.* 1994; 224 (4647): 417–419. DOI: 10.1126/science.6200934.
48. Agullo G., Gamet-Payrastra L., Manenti S., Viala C., Révész C., Chap H., Payrastra B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 1997; 53 (11): 1649–1657. DOI: 10.1016/s0006-2952(97)82453-7.
49. Kyle E., Neckers L., Takimoto C., Curt G., Bergan R. Genistein-induced apoptosis of prostate cancer cells is preceded by a specific decrease in focal adhesion kinase activity. *Mol. Pharmacol.* 1997; 51 (2): 193–200. DOI: 10.1124/mol.51.2.193.
50. Yang E.B., Zhang K., Cheng L.Y., Mack P. Butein, a specific protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 245 (2): 435–438. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8452.
51. Huang Y.T., Hwang J.J., Lee P.P., Ke F.C., Huang J.H., Huang C.J., Kandaswami C., Middleton E., Lee M.T. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 128 (5): 999–1010. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702879.
52. Lee L.T., Huang Y.T., Hwang J.J., Lee P.P., Ke F.C., Nair M.P., Kanadaswami C., Lee M.T. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res.* 2002; 22 (3): 2103–2114.
53. Lee E.J., Oh S.Y., Sung M.K. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50 (11): 4136–4143. DOI: 10.1016/j.fct.2012.08.025.
54. Ruan J., Zhang L., Yan L., Liu Y., Yue Z., Chen L., Wang A.Y., Chen W., Zheng S., Wang S., Lu Y. Inhibition of hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition by luteolin in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 2012; 6 (1): 232–238. DOI: 10.3892/mmr.2012.884.
55. Куликова К.В., Кибардин А.В., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Сигнальный путь Wnt и его значение для развития меланомы. *Современные технологии в медицине.* 2012; 3: 107–112. [Kulikova K.V., Kibardin A.V., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Larin S.S. The Wnt signaling pathway and its significance for the development of melanoma. *Sovremennye tekhnologii v meditsine – Modern Technologies in Medicine.* 2012; 3: 107–112 (in Russ.)].
56. Татарский В.В. Сигнальный путь Wnt: перспективы фармакологического регулирования. *Успехи мол. онкол.* 2016; 3 (1): 28–31. [Tatarskiy V.V. Wnt signaling pathway: perspectives of pharmacological regulation. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii – Advances in Molecular Oncology.* 2016; 3 (1): 28–31 (in Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-28-31.
57. Amado N.G., Fonseca B.F., Cerqueira D.M., Neto V.M., Abreu J.G. Flavonoids: potential WNT/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sci.* 2011; 89 (15–16): 545–554. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.05.003.
58. Martinez N.P., Kanno D.T., Pereira J.A., Cardinali I.A., Priolli D.G. Beta-catenin and E-cadherin tissue “content” as prognostic markers in left-side colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2011; 8 (3): 129–135. DOI: 10.3233/dma-2011-0843.
59. Tanaka T., Ashii T., Mizuno D., Mori T., Yamaji R., Nakamura Y., Kumazawa S., Nakayama T., Akagawa M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses growth of AZ521 human gastric cancer cells by targeting the DEAD-box RNA helicase p68. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50 (10): 1324–1335. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.024.
60. Saud S.M., Young M.R., Jones-Hall Y.L., Ileva L., Evbuomwan M.O., Wise J., Colburn N.H., Kim Y.S., Bobe G. Chemopreventive activity of plant flavonoid isorhamnetin in colorectal cancer is mediated by oncogenic Src and beta-catenin. *Cancer Res.* 2013; 73 (17): 5473–5484. DOI: 10.1158/0008-5472.can-13-0525.
61. Lepri S.R., Zanelatto L.C., Da S.P., Sartori D., Ribeiro L.R., Mantovani M.S. Effects of genistein and daidzein on cell proliferation kinetics in HT29 colon cancer cells: The expression of CTNNBIP1 (beta-catenin) and BIRC5 (survivin). *Hum. Cell.* 2014; 27 (2): 78–84. DOI: 10.1007/s13577-012-0051-6.
62. Orfali G.C., Duarte A.C., Bonadio V., Martinez N.P., de Araújo M.E.M.B., Priviero F.B.M., Carvalho P.O., Priolli D.G. Review of anticancer mechanisms of isoquercetin. *WJCO.* 2016; 7 (2): 189–199. DOI: 10.5306/wjco.v7.i2.189.
63. Srinivasan A., Thangavel C., Liu Y., Shoyele S., Den R.B., Selvakumar P., Lakshmikuttyamma A. Quercetin regu-

- lates beta-catenin signaling and reduces the migration of triple negative breast cancer. *Mol. Carcinog.* 2016; 55 (5): 743–756. DOI: 10.1002/mc.22318.
64. Князькин И.В., Цыган В.Н. Апоптоз в онкоурологии. СПб.: Наука, 2007: 240. [Knyazkin I.V., Tsygan V.N. Apoptosis in oncurology. SPb.: Science, 2007: 240 (in Russ.)].
  65. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* 2007; 18 (7): 427–442. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2006.11.004.
  66. Pan M.H., Ho C.T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem. Soc. Rev.* 2008; 37 (11): 2558–2574. DOI: 10.1039/b801558a.
  67. Surh Y.J. NF-kappa B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2008; 17 (Suppl. 1): 269–272.
  68. Kumi-Diaka J., Sanderson N.A., Hall A. The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, DU 145 and LNCaP. *Biol. Cell.* 2000; 92 (8-9): 595–604. DOI: 10.1016/s0248-4900(00)01109-6.
  69. Hu M.L. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: More questions than answers. *Chang Gung Med. J.* 2011; 34 (5): 449–460.
  70. Kim D.A., Jeon Y.K., Nam M.J. Galangin induces apoptosis in gastric cancer cells via regulation of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase isozyme L1 and glutathione S-transferase P. *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50 (3–4): 684–688. DOI: 10.1016/j.fct.2011.11.039.
  71. Pan H., Zhou W., He W., Liu K., Ding Q., Ling L., Zha X., Wang S. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF-kappaB activity via the Notch-1 pathway. *Int. J. Mol. Med.* 2012; 30 (2): 337–343. DOI: 10.3892/ijmm.2012.990.
  72. Ramachandran L., Manu K.A., Shanmugam M.K., Li F., Siveen K.S., Vali S., Kapoor S., Abbasi T., Surana R., Smoot D.T., Ashktorab H., Tan P., Ahn K.S., Yap C.W., Kumar A.P., Sethi G. Isorhamnetin inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis through the modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation pathway in gastric cancer. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (45): 38028–38040. DOI: 10.1074/jbc.m112.388702.
  73. Tsui K.H., Chung L.C., Feng T.H., Chang P.L., Juang H.H. Upregulation of prostate-derived Ets factor by luteolin causes inhibition of cell proliferation and cell invasion in prostate carcinoma cells. *Int. J. Cancer.* 2012; 130 (12) : 2812–2823. DOI: 10.1002/ijc.26284.
  74. Wang L.M., Xie K.P., Huo H.N., Shang F., Zou W., Xie M.J. Luteolin inhibits proliferation induced by IGF-1 pathway dependent ERalpha in human breast cancer MCF-7 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012; 13 (4): 1431–1437. DOI: 10.7314/apjcp.2012.13.4.1431.
  75. Bishayee K., Ghosh S., Mukherjee A., Sadhukhan R., Mondal J., Khuda-Bukhsh A.R. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: Signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell. Prolif.* 2013; 46 (2): 153–163. DOI: 10.1111/cpr.12017.
  76. Huang W.W., Tsai S.C., Peng S.F., Lin M.W., Chiang J.H., Chiu Y.J., Fushiya S., Tseng M.T., Yang J.S. Kaempferol induces autophagy through AMPK and AKT signaling molecules and causes G2/M arrest via downregulation of CDK1/cyclin B in SK-HEP-1 human hepatic cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2013; 42 (6): 2069–2077. DOI: 10.3892/ijo.2013.1909.
  77. Park H.J., Jeon Y.K., You D.H., Nam M.J. Daidzein causes cytochrome c-mediated apoptosis via the Bcl-2 family in human hepatic cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 60: 542–549. DOI: 10.1016/j.fct.2013.08.022.
  78. Tian T., Li J., Li B., Wang Y., Li M., Ma D., Wang X. Genistein exhibits anti-cancer effects via down-regulating FoxM1 in H446 small-cell lung cancer cells. *Tumor Biol.* 2014; 35 (5): 4137–4145. DOI: 10.1007/s13277-013-1542-0.
  79. Feng J., Chen X., Wang Y., Du Y., Sun Q., Zang W., Zhao G. Myricetin inhibits proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2015; 408 (1–2): 163–170. DOI: 10.1007/s11010-015-2492-1.
  80. Li C., Zhao Y., Yang D., Yu Y., Guo H., Zhao Z., Zhang B., Yin X. Inhibitory effects of kaempferol on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Cell. Biol.* 2015; 93 (1): 16–27. DOI: 10.1139/bcb-2014-0067.
  81. Hayakawa S., Saeki K., Sazuka M., Suzuki Y., Shoji Y., Ohta T., Kaji K., You A., Isemura M. Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285 (5): 1102–1106. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5293.
  82. Hastak K., Gupta S., Ahmad N., Agarwal M.K., Agarwal M.L., Mukhtar H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene.* 2003; 22 (31): 4851–4859. DOI: 10.1038/sj.onc.1206708.
  83. Kawai K., Tsuno N.H., Kitayama J., Okaji Y., Yazawa K., Asakage M., Sasaki S., Watanabe T., Takahashi K., Nagawa H. Epigallocatechin gallate induces apoptosis of monocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115 (1): 186–191. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.10.005.
  84. Nishikawa T., Nakajima T., Moriguchi M., Jo M., Sekoguchi S., Ishii M., Takashima H., Katagishi T., Kimura H., Minami M., Itoh Y., Kagawa K., Okanoue T. A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *J. Hepatol.* 2006; 44 (6): 1074–1082. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.11.045.
  85. Lim Y.C., Cha Y.Y. Epigallocatechin 3 gallate induces growth inhibition and apoptosis of human anaplastic thy-

- roid carcinoma cells through suppression of EGFR/ERK pathway and cyclin B1/CDK1 complex. *J. Surg. Oncol.* 2011; 104 (7): 776–780. DOI: 10.1002/jso.21999.
86. Onoda C., Kuribayashi K., Nirasawa S., Tsuji N., Tanaka M., Kobayashi D., Watanabe N. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression. *Int. J. Oncol.* 2011; 38, (5): 1403–1408. DOI: 10.3892/ijo.2011.951.
  87. Shimizu M., Adachi S., Masuda M., Kozawa O., Moriwa-ki H. Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55 (6): 832–843. DOI: 10.1002/mnfr.201000622.
  88. Hirano T., Abe K., Gotoh M., Oka K. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br. J. Cancer.* 1995; 72 (6): 1380–1388. DOI: 10.1038/bjc.1995.518.
  89. Arul D., Subramanian P. Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathol. Oncol. Res.* 2013; 19 (4): 763–770. DOI: 10.1007/s12253-013-9641-1.
  90. Sambantham S., Radha M., Paramasivam A., Anandan B., Malathi R., Chandra S.R., Jayaraman G. Molecular mechanism underlying hesperetin-induced apoptosis by in silico analysis and in prostate cancer PC-3 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013; 14 (7): 4347–4352. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.7.4347.
  91. Palit S., Kar S., Sharma G., Das P.K. Hesperetin induces apoptosis in breast carcinoma by triggering accumulation of ROS and activation of ASK1/JNK pathway. *J. Cell. Physiol.* 2015; 230 (8): 1729–1739. DOI: 10.1002/jcp.24818.
  92. Choi E.J., Kim G.H. Apigenin induces apoptosis through a mitochondria/caspase-pathway in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2009; 44 (3): 260–265. DOI: 10.3164/jcbs.08-230.
  93. Cai J., Zhao X.L., Liu A.W., Nian H., Zhang S.H. Apigenin inhibits hepatoma cell growth through alteration of gene expression patterns. *Phytomedicine.* 2011; 18 (5): 366–373. DOI: 10.1016/j.phymed.2010.08.006.
  94. Lu H.F., Chie Y.J., Yang M.S., Lu K.W., Fu J.J., Yang J.S., Chen H.Y., Hsia T.C., Ma C.Y., Ip S.W., Chung J.G. Apigenin induces apoptosis in human lung cancer H460 cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Hum. Exp. Toxicol.* 2011; 30 (8): 1053–1061. DOI: 10.1177/0960327110386258.
  95. Alshatwi A.A., Ramesh E., Periasamy V.S., Subash-Babu P. The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2013; 27 (6): 581–592. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2012.01061.x.
  96. Kim M.E., Ha T.K., Yoon J.H., Lee J.S. Myricetin induces cell death of human colon cancer cells via BAX/BCL2-dependent pathway. *Anticancer Res.* 2014; 34 (2): 701–706.
  97. Lee H.S., Cho H.J., Yu R., Chun H., Park J. Mechanisms underlying apoptosis-inducing effects of Kaempferol in HT-29 human colon cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15 (2): 2722–2737. DOI: 10.3390/ijms15022722.
  98. Dai W., Gao Q., Qiu J., Yuan J., Wu G., Shen G. Quercetin induces apoptosis and enhances 5-FU therapeutic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* 2015; 37 (5): 6307–6313. DOI: 10.1007/s13277-015-4501-0.
  99. Iyer S.C., Gopal A., Halagowder D. Myricetin induces apoptosis by inhibiting P21 activated kinase 1 (PAK1) signaling cascade in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cell. Biochem.* 2015; 407 (1–2): 223–237. DOI: 10.1007/s11010-015-2471-6.
  100. Jo S., Ha T.K., Han S.H., Kim M.E., Jung I., Lee H.W., Bae S.K., Lee J.S. Myricetin induces apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells via mitochondria dysfunction. *Anticancer Res.* 2017; 37 (4): 1705–1710. DOI: 10.21873/anticancer.11502.
  101. Герштейн Е.С., Щербakov А.М., Ошкина Н.Е., Кушлинский Н.Е., Огнерубов Н.А. Ключевые компоненты NF-κB-сигнального пути в опухолях больных раком молочной железы. *Вестник Тамбовского университета.* 2013; 18 (6–2): 3292–3297. [Gershtein E.S., Shcherbakov A.M., Oshkina N.E., Kushlinskiy N.E., Ognerubov N.A. Key components of NF-κB-signaling pathway in tumors of patients with breast cancer. *Vestnik Tambovskogo universiteta – Bulletin of Tambov University.* 2013; 18 (6-2): 3292–3297 (in Russ.)].
  102. Bin H.B., Asim M., Siddiqui I.A., Adhami V.M., Murta-za I., Mukhtar H. Delphinidin, a dietary anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables: A new weapon to blunt prostate cancer growth. *Cell. Cycle.* 2008; 7 (21): 3320–3326. DOI: 10.4161/cc.7.21.6969.
  103. Yun J.M., Afaq F., Khan N., Mukhtar H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. *Mol. Carcinog.* 2009; 48 (3): 260–270. DOI: 10.1002/mc.20477.
  104. Cai X., Ye T., Liu C., Lu W., Lu M., Zhang J., Wang M., Cao P. Luteolin induces G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. *Toxicol. Vitro.* 2011; 25 (7): 1385–1391. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.05.009.
  105. Yen H.R., Liu C.V.J., Yeh C.C. Naringenin suppresses TPA-induced tumor invasion by suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Chem. Biol. Interact.* 2015; 235: 1–9. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.04.003.
  106. Bracke M.E., Castronovo V., Van Cauwenberge R.M., Coopman P., Vakaet L., Strojny P., Foidart J.M., Mareel M.M. The antiinvasive flavonoid (+)-catechin binds to laminin and abrogates the effect of laminin on cell morphology and adhesion. *Exp. Cell. Res.* 1987; 173 (1): 193–205. DOI: 10.1016/0014-4827(87)90345-4.
  107. Кондакова И.В., Клишо Е.В., Савенкова О.В., Шишкин Д.А., Чойнзонов Е.А. Патогенетическая значи-



- мость системы матричных металлопротеиназ при плоскоклеточном раке головы и шеи. *Сибирский онкол. журнал*. 2011; 1: 29–33. [Kondakova I.V., Klishe E.V., Savenkova O.V., Choinzonov E.L. Pathogenetic significance of the system of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal – Siberian Oncological Journal*. 2011; 1: 29–33 (in Russ.)].
108. Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Матричные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия. *Журнал акуш. и жен. бол.* 2012; 61 (1): 113–125. [Yarmolinskaya M.I., Molotkov A.S., Denisova V.M. Matrix metalloproteinases and inhibitors: classification, mechanism of action. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney – Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2012; 61 (1): 113–125 (in Russ.)].
  109. Kim M.H. Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis *in vitro* by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J. Cell. Biochem.* 2003; 89 (3): 529–538. DOI: 10.1002/jcb.10543.
  110. Moon S.K., Cho G.O., Jung S.Y., Gal S.W., Kwon T.K., Lee Y.C., Madamanchi N.R., Kim C.H. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: Role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 301 (4): 1069–1078. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00091-3.
  111. Zhang X.M., Huang S.P., Xu Q. Quercetin inhibits the invasion of murine melanoma B16-BL6 cells by decreasing pro-MMP-9 via the PKC pathway. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004; 53 (1): 82–88. DOI: 10.1007/bf02665357.
  112. Shao Z.M., Wu J., Shen Z.Z. Barsky S.H. Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human breast carcinoma cell lines. *Anti-cancer Res.* 1998; 18 (3A): 1435–1439.
  113. Magee P.J., McGlynn H., Rowland I.R. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vivo*. *Cancer Lett.* 2004; 208 (1): 35–41. DOI: 10.1016/j.canlet.2003.11.012.
  114. Ende C., Gebhardt R. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med.* 2004; 70 (10): 1006–1008. DOI: 10.1055/s-2004-832630.
  115. Demeule M., Brossard M., Pagé M., Gingras D., Béliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1478 (1): 51–60. DOI: 10.1016/s0167-4838(00)00009-1.
  116. Garbisa S., Sartor L., Biggin S., Salvato B., Benelli R., Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer.* 2001; 91 (4): 822–832. DOI: 10.1002/1097-0142(20010215)91:4<822::aid-cnrc1070>3.0.co;2-g.
  117. Tate P., God J., Bibb R., Lu Q., Larcom L.L. Inhibition of metalloproteinase activity by fruit extracts. *Cancer Lett.* 2004; 212 (2): 153–158. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.03.025.
  118. Scholar E.M., Toews M.L. Inhibition of invasion of murine mammary carcinoma cells by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Cancer Lett.* 1994; 87 (2): 159–162. DOI: 10.1016/0304-3835(94)90217-8.
  119. Sounni N.E., Paye A., Host L., Noël A. MT-MMPS as regulators of vessel stability associated with angiogenesis. *Front. Pharmacol.* 2011. 2-article 111. DOI: 10.3389/fphar.2011.00111.eCollection 2011.
  120. Basagiannis D., Zografou S., Murphy C., Fotsis T., Morbidelli L., Ziche M., Bleck C., Mercer J., Christoforidis S. VEGF induces signalling and angiogenesis by directing VEGFR2 internalisation through micropinocytosis. *J. Cell. Sci.* 2016; 129 (21): 4091–4104. DOI: 10.1242/jcs.188219.
  121. Singh A.K., Seth P., Anthony P., Husain M.M., Madhavan S., Mukhtar H., Maheshwari R.K. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenic differentiation of human endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 401 (1): 29–37. DOI: 10.1016/s0003-9861(02)00013-9.
  122. Osada M., Imaoka S., Funae Y. Apigenin suppress the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1 [alpha] protein. *FEBS Lett.* 2004; 575 (1–3): 59–63. DOI: 10.1016/febslet.2004.08.036.
  123. Shukla S., Bhaskaran N., Babcook M.A., Fu P., MacLennan G.T., Gupta S. Apigenin inhibits prostate cancer progression in TRAMP mice via targeting PI3K/Akt/FoxO pathway. *Carcinogenesis.* 2014; 35 (2): 452–460. DOI: 10.1093/carcin/bgt316.
  124. Walsh L.J., Trinchieri G., Waldorf H.A., Whitaker D., Murphy G.F. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88 (10): 4220–4224. DOI: 10.1073/pnas.88.10.4220.
  125. Middleton E.Jr., Anné S. Quercetin inhibits of lipopolysaccharide-induced expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995; 107 (1–3): 435–436. DOI: 10.1159/000237071.
  126. Zhao X., Wang Q., Yang S., Chen C., Li X., Liu J., Zou Z., Cai D. Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer. *Eur. J. Pharmacol.* 2016; 781: 60–68. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.03.063.
  127. Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E., Breit S., Rasku S., Adlercreutz H., Wähälä K., Montesano R., Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer Res.* 1997; 57 (14): 2916–2921.
  128. Kruse F.E., Jossen A.M., Fotsis T., Schweigerer L., Rohrschneider K., Völcker H.E. Inhibition of neovascularization of the eye by dietary factors exemplified by isoflavonoids. *Ophthalmologie.* 1997; 94 (2): 152–156. DOI: 10.1007/s003470050097.

129. Bellou S., Karali E., Bagli E., Al-Maharik N., Morbidelli L., Ziche M., Adlercreutz H., Murphy C., Fotsis T. The isoflavone metabolite 6-methoxyequol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol. Cancer*. 2012; 11 (1): 35. DOI: 10.1186/1476-4598-11-35.
130. Bagli E., Stefaniotou M., Morbidelli L., Ziche M., Psillas K., Murphy C., Fotsis T. Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis: Inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity. *Cancer Res.* 2004; 64 (21): 7936–7946. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-3104.
131. Wu X.Y., Xu H., Wu Z.F., Chen C., Liu J.Y., Wu G.N., Yao X.Q., Liu F.K., Li G., Shen L. Formononetin, a novel FGFR2 inhibitor, potently inhibits angiogenesis and tumor growth in preclinical models. *Oncotarget*. 2015; 6 (42): 44563–44578. DOI: 10.18632/oncotarget.6310.
132. Malumbers M., Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer*. 2009; 9 (3): 153–166. DOI: 10.1038/nrc2602.
133. Araújo J.R., Gonzalves P., Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.* 2011; 31 (2): 77–87. DOI: 10.1016/j.nutres.2011.01.006.
134. Jun D.Y., Park H.S., Kim J.S., Kim J.S., Park W., Song B.H., Kim H.S., Taub D., Kim Y.H. 17[alpha]-Estradiol arrests cell cycle progression at G2/M and induces apoptotic cell death in human acute leukemia Jurkat T cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008; 231 (3): 401–412. DOI: 10.1016/j.taap.2008.05.023.
135. Zhang Q., Zhao X.H., Wang Z.J. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicol. in Vitro*. 2009; 23 (5): 797–807. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.04.007.
136. Srivastava S., Somasagara R.R., Hedge M., Nishana M., Tadi S.K., Srivastava M., Choudhary B., Raghavan S.C. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Sci. Rep.* 2016; 6: 24049. DOI: 10.1038/srep.24049.
137. Cho H.J., Park J. H.Y. Kaempferol induces cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J. Cancer Prev.* 2013; 18 (3): 257–263. DOI: 10.15430/jcp.2013.18.3.257.
138. Kim K.Y., Jang W.Y., Lee J.Y., Jun D.Y., Ko J.Y., Yun Y.H., Kim Y.H. Kaempferol activates G2-checkpoint of the cell cycle resulting in G2-arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human acute leukemia Jurkat T cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26 (2): 287–294. DOI: 10.4014/jmb.1511.11054.
139. Ruela-de-Sousa R., Fuhler G., Blom N., Ferreira C.V., Aoyama H., Peppelenbosch M.P. Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: Implications for prevention and therapy. *Cell. Death Dis.* 2010; 1 (1): e19. DOI: 10.1038/cddis.2009.18.
140. Yu C., Zeng J., Yan Z., Ma Z., Liu S., Huang Z. Baicalein antagonizes acute megakaryoblastic leukemia in vitro and in vivo by inducing cell cycle arrest. *Cell Biosci.* 2016; 6: 20. DOI: 10.1186/s13578-016-0084-8.
141. Wang Y., Yu H., Zhang J., Gao J., Ge X., Lou G. Hesperidin inhibits HeLa cell proliferation through apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress pathways and cell cycle arrest. *BMC Cancer*. 2015; 15: 682. DOI: 10.1186/s12885-015-1706-y.
142. Han B.J., Li W., Jiang G.B., Lai S.H., Zhang C., Zeng C.C., Liu Y.J. Effects of daidzein in regards to cytotoxicity in vitro, apoptosis, reactive oxygen species level, cell cycle arrest and the expression of caspase and Bcl-2 family proteins. *Oncol. Rep.* 2015; 34 (3): 1115–1120. DOI: 10.3892/or.2015.4133.
143. Yang Y., Zhao Y., Ai X., Cheng B., Lu S. Formononetin suppresses the proliferation of human non-small cell lung cancer through induction of cell arrest and apoptosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014; 7 (12): 8453–8461.
144. Li T., Zhao X., Mo Z., Huang W., Yan H., Ling Z., Ye Y. Formononetin promotes cell cycle arrest via downregulation of Akt/cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2014; 34 (4): 1351–1358. DOI: 10.1159/000366342.

## Сведения об авторе

Зверев Яков Федорович, д-р мед. наук, профессор, кафедра фармакологии, АМГУ, г. Барнаул.

(✉) Зверев Яков Федорович, e-mail: zver@agmu.ru.

Поступила в редакцию 22.05.2017

Подписана в печать 14.12.2018

## Author information

Zverev Yakov F., DM, Professor, Department of Pharmacology, ASMU, Barnaul, Russian Federation.

(✉) Zverev Yakov F., e-mail: zver@agmu.ru.

Received 22.05.2017

Accepted 14.12.2018

## Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе

Зенков Н.К.<sup>1</sup>, Чечушков А.В.<sup>1</sup>, Кожин П.М.<sup>1</sup>, Мартинович Г.Г.<sup>2</sup>,  
Кандалинцева Н.В.<sup>3</sup>, Меньщикова Е.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ)  
Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет (БГУ)  
Республика Беларусь, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4

<sup>3</sup> Новосибирский государственный педагогический университет (НГПУ)  
Россия, 630126, г. Новосибирск, ул. Виллюйская, 28

### РЕЗЮМЕ

Аутофагия является основным катаболическим процессом удаления из клеток поврежденных органелл, агрегированных белков и внутриклеточных патогенов. Развитие окислительного стресса сопровождается усилением аутофагии, которая оказывает защитное действие посредством поддержания качественного состава митохондрий (митофагия) и пероксисом (пексофагия) с последующей лизосомальной деградацией органелл с высокой продукцией активных форм кислорода. Посредством агрефагии также удаляются токсические продукты, образующиеся при окислительном и карбонильном стрессе. Кроме того, аутофагия может активировать систему антиоксидант-респонсивного элемента и повышать экспрессию генов антиоксидантных ферментов. Защитная роль аутофагии может быть полезной при многих патологиях, сопровождающихся развитием окислительного стресса, и в то же время служить причиной химиорезистентности и снижать эффективность противоопухолевой терапии.

**Ключевые слова:** аутофагия, окислительный стресс, митохондрии, пероксисомы, система Keap1/Nrf2/ARE.

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

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант 16-54-00050 Бел\_а) и БФФИ (грант M16P-022).

**Для цитирования:** Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 195–214. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-195-214>.

## Autophagy as a protective mechanism in oxidative stress

Zenkov N.K.<sup>1</sup>, Cheshushkov A.V.<sup>1</sup>, Kozhin P.M.<sup>1</sup>, Martinovich G.G.<sup>2</sup>,  
Kandalintseva N.V.<sup>3</sup>, Menshchikova E.B.<sup>1</sup>

---

✉ Меньщикова Елена Брониславовна, e-mail: lemen@centercem.ru.

<sup>1</sup> *Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine  
2, Timakova Str., Novosibirsk, 630117, Russian Federation*

<sup>2</sup> *Belarusian State University (BSU)  
4, Nezavisimosti Av., Minsk, 220030, Republic of Belarus*

<sup>3</sup> *Novosibirsk State Pedagogical University  
28, Vilyuiskaya Str., Novosibirsk, 630126, Russian Federation*

## ABSTRACT

Autophagy is the main catabolic process required for the removal of damaged organelles, aggregated proteins and intracellular pathogens from cells. Oxidative stress is accompanied by an increase in autophagy, which has a protective effect by maintaining the qualitative composition of mitochondria (mitophagy) and peroxisomes (pexophagy) followed by lysosomal degradation of organelles with high production of reactive oxygen species. Aggrephagy also removes toxic products formed during oxidative and carbonyl stress. Furthermore, autophagy can activate the antioxidant response element system and increase the expression of antioxidant enzyme genes. The protective role of autophagy can be useful in many pathological processes accompanied by the development of oxidative stress while at the same time it may cause chemoresistance, reducing the effectiveness of anti-tumor therapy.

**Keywords:** autophagy, oxidative stress, mitochondria, peroxisomes, Keap1/Nrf2/ARE system.

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

**Source of financing.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research RFBR (Grant 16-54-00050 Bel\_a) and Belarusian Foundation for Fundamental Research BFFR (Grant M16P-022).

**For citation:** Zenkov N.K., Cheshushkov A.V., Kozhin P.M., Martinovich G.G., Kandalintseva N.V., Menshchikova E.B. Autophagy as a protective mechanism in oxidative stress. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 195–214. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-195-214>.

## ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс (превышение продукции активных форм кислорода и азота над их инактивацией антиоксидантами) является важным патогенетическим фактором, вызывающим развитие сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, воспалительных и инфекционных патологий, злокачественных новообразований [1]. С возрастом снижается уровень антиоксидантной защиты клеток, что также усиливает патогенетическую роль окислительного стресса [2]. Это делает актуальным поиск и создание антиоксидантных препаратов для борьбы с окислительным стрессом. Исследования последних 20 лет выявили существенные противоречия между изучением антиоксидантных свойств препаратов в системах *in vitro* и их действием в организме [3]. Поэтому в последнее десятилетие особое внимание уделяется исследованиям эндогенных механизмов антиоксидантной защиты, в

числе которых в настоящее время рассматривается аутофагия [4].

Активированные кислородные метаболиты (АКМ) являются эффективными индукторами аутофагии [4–6]. При этом главным источником сигнальных АКМ, регулирующих аутофагию, являются митохондрии, а NADPH-оксидазы (Nox2) играют роль, по всей видимости, при LC3-фагоцитозе [4]. Возможно, это связано с тем, что аутофагия, являясь чрезвычайно чувствительной к снижению поступления нутриентов в клетку, участвует в регуляции энергетического баланса. При этом дефицит нутриентов вызывает дефицит АТФ и повышает нагрузку на цепь переноса электронов в митохондриях, что наряду с дефицитом переносчиков электронов (NADPH) сопровождается утечкой супероксидного анион-радикала  $O_2^{\bullet-}$ . Еще одной интересной особенностью редокс-регуляции аутофагии является участие пероксиом в этом процессе. Белок туберин (TSC2, tuberous sclerosis complex 2), участвующий в инициации

каскада аутофагии, локализуется на цитоплазматической поверхности пероксисом и активируется в ответ на продукцию АКМ этими органеллами [7].

В целом к настоящему моменту накопилось большое количество свидетельств того, что АКМ являются регуляторами активации аутофагии, и этот процесс необходим клеткам как для защиты от развития окислительного стресса, так и для устранения его последствий. В контексте окислительного стресса важность аутофагии определяется тем, что она участвует в удалении практически всех органелл и макромолекул, поврежденных в результате активного протекания свободнорадикальных процессов. Своевременная и эффективная активация аутофагии предотвращает необратимое накопление внутриклеточных белковых агрегатов [8], поврежденных митохондрий, которые являются инициаторами внутреннего пути апоптоза [9], и других поврежденных органелл и мембранных структур, которые в противном случае могут служить субстратом для патологических процессов. Развитие окислительного стресса, а также нарушения аутофагии являются характерной чертой всех заболеваний, связанных с дегенерацией тканей (нервной, мышечной), вызванной различными причинами: генетическими (болезни накопления, нейродегенеративные заболевания), ишемическими, травматическими [10, 11].

В настоящем обзоре нами проведен анализ механизмов защитного действия аутофагии в условиях развития окислительного стресса.

## АУТОФАГИЯ

Термин «аутофагия» (от др.-греч. αὐτός – «сам» и φαγεῖν – «есть») был введен в 1963 г. бельгийским цитологом и биохимиком, лауреатом Нобелевской премии Кристианом де Дювом (Christian de Duve) для описания процесса получения питательных веществ в результате катаболизма внутриклеточных компартментов лизосомами. Аутофагия является основным катаболическим процессом удаления из клеток агрегированных белков, поврежденных органелл и внутриклеточных патогенов [12]. Филогенетический анализ позволяет говорить о том, что аутофагия сопровождала появление эукариот на Земле и является древнейшим механизмом поддержания клеточного гомеостаза и защиты от патогенной инвазии. Выделяют макроаутофагию (формирование фагофора с двойной изолирующей мембраной, захватывающего внутриклеточные структуры для слияния с лизосомами), микроаутофагию (захват содержимого цитоплазмы путем инвагинации мембраны лизосом) и шаперон-опосредованную аутофагию (поврежденные молекулы доставляются в лизосомы белками-шаперонами) (рис. 1).

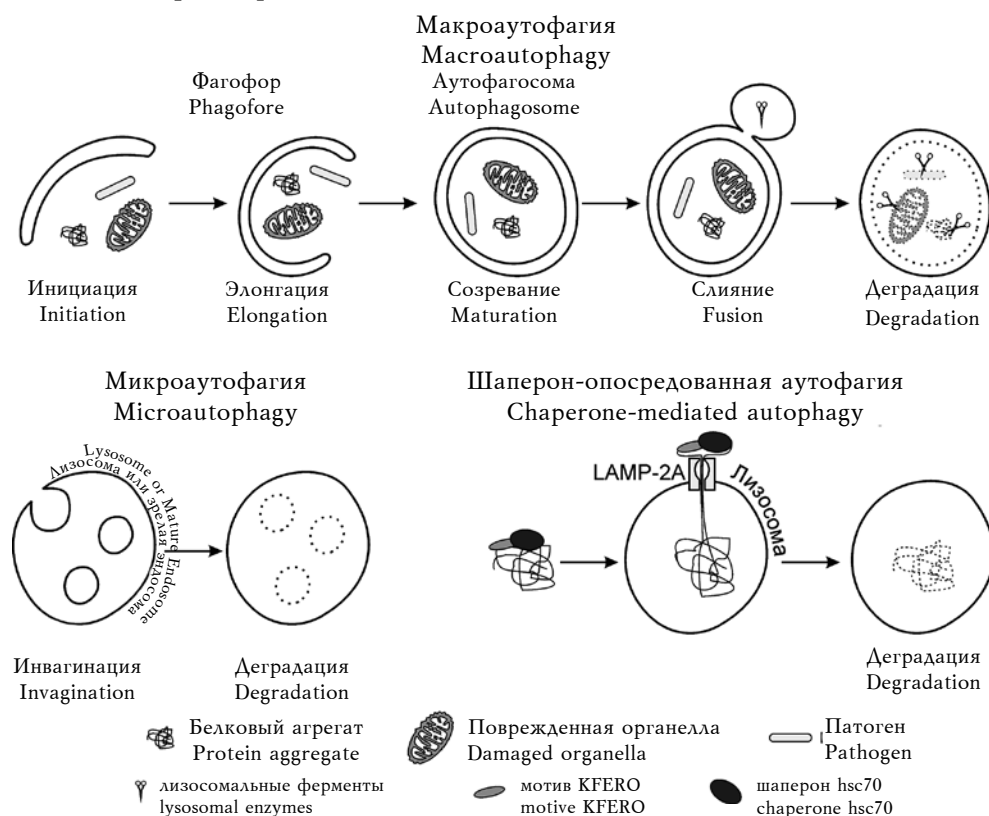


Рис. 1. Основные типы аутофагии

Fig. 1. The main types of autophagy

Макроаутофагия может быть неселективной, когда определенная область цитоплазмы окружается мембраной, или селективной, направленной на удаление белковых агрегатов (агрефагия), поврежденных митохондрий (митофагия), рибосом (рибофагия), пероксисом (пексофагия), эндоплазматического ретикулаума (ретикулофагия), секреторных гранул (кринофагия), липидных капель (липофагия), а также различных внутриклеточных патогенов, бактерий и вирусов (ксенофагия) [13–15]. Главным механизмом поддержания клеточного гомеостаза является макроаутофагия, которую в последующем мы будем называть просто аутофагией.

Интенсивность аутофагии зависит от наличия и выраженности индукторов, к которым могут относиться как внутренние (нехватка питательных веществ, наличие поврежденных органелл, денатурировавших белков и их агрегатов, окислительный, метаболический или токсический стресс), так и внешние, например рапамицин, интерферон  $\gamma$  или витамин D<sub>3</sub> [16, 17]. После воздействия выраженного стимула индукция аутофагии развивается в течение 1 ч, однако через 24 ч процесс тормозится [18]. Важным внутриклеточным «выключателем» неселективной аутофагии является белковый комплекс mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), который регулируется рядом киназ, таких как AMPK (AMP-activated protein kinase), поддерживает активность mTORC1 и отвечает на энергетическое голодание – недостаток АТФ; ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) ингибирует mTORC1 и усиливает аутофагию при нехватке аминокислот; PI3K (phosphoinositide 3-kinase) активирует mTORC1 в ответ на действие факторов роста [19]. Исследования на клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* позволили выделить 35 необходимых для аутофагии генов, которые объединили в общую группу *Atg* (Autophagy-related genes). Многие аналоги дрожжевых белков *Atg* выявлены у млекопитающих, однако исследования показывают, что в процессы аутофагии в той или иной степени вовлекаются более 400 белков, поэтому его полная картина крайне запутана и не вполне понятна.

Если неспецифическая аутофагия активируется в ответ на голодание или гипоксию и захватывает широкий спектр внутриклеточных компонентов, то в индукции селективной аутофагии важная роль принадлежит «грузовым» рецепторам (cargo receptors), которые инициируют формирование фагофоров вокруг определенных клеточных структур [15, 20, 21]. «Грузовые» ре-

цепторы необходимы для обозначения поврежденных структур и индукции аутофагии, а для формирования аутофагофора и слияния его с лизосомами задействуются адаптерные белки двух семейств – LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) и GABARAP ( $\gamma$ -aminobutyric acid receptor-associated protein), которые являются ортологами дрожжевого белка Atg8 [13, 22]. Каждое семейство включает по четыре белка LC3 (LC3A, LC3B, LC3B2 и LC3C) и GABARAP (GABARAP, GABARAP-L1, GABARAP-L2/GATE-16 и GABARAP-L3) [23]. В зависимости от спектра привлекаемых рецепторов иногда выделяют убиквитин-зависимые и убиквитин-независимые формы аутофагии [24]. Так как аутофагия является одним из основных механизмов поддержания клеточного гомеостаза, в том числе при стрессовых ситуациях (нехватка АТФ или аминокислот), нами рассмотрены механизмы ее защитного действия в условиях развития окислительного стресса.

## МИТОФАГИЯ

У большинства эукариот аэробное энергообразование осуществляется в митохондриях – специализированных сложно организованных внутриклеточных органеллах. Помимо основной функции образования АТФ, митохондрии участвуют в синтезе гема и стероидов, отвечают за процесс теплопродукции в клетках бурого жира, участвуют в регуляции гомеостаза ионов кальция, играют важную роль в развитии индуцированного разными факторами апоптоза и некроза. Количество митохондрий в клетках различных организмов существенно различается: так, некоторые зеленые водоросли имеют лишь одну гигантскую митохондрию, тогда как амеба *Chaos chaos* содержит до 500 тыс. этих органелл. Наибольшее количество митохондрий в пересчете на 1 г ткани млекопитающих выявляется в миокарде, мозге, мышцах, печени. В мышечных клетках на митохондрии приходится до 40% клеточного объема, в кардиомиоцитах – 22–37% [23, 25]. Поддержание качественного и количественного состава митохондрий важно для жизнедеятельности клеток. Митохондрии не образуются *de novo*, их количество поддерживается посредством деления и слияния, деградации в лизосомах посредством аутофагии, а также экспорта из клеток [23, 26].

В большинстве соматических клеток митохондрии являются основным потребителем молекулярного кислорода (до 95%), при этом они часто выступают главными внутриклеточными продуцентами активированных кислородных

метаболитов, образующихся в результате функционирования как дыхательной цепи, так и митохондриальных оксидоредуктаз [27–29]. Необходимо отметить, что существуют методические трудности точного измерения генерации АКМ в митохондриях, связанные с необходимостью сохранения целостности структуры органелл при выделении. Кроме того, митохондрии из разных органов существенно различаются между собой по содержанию антиоксидантов, а также по составу и активности электронпереносящих структур: в частности, активность комплексов I и III в митохондриях печени крыс в 10 и 6 раз ниже, чем в митохондриях из сердца и мышц.

Все это приводит к большому различию как научных результатов, так и научных взглядов на данный вопрос: некоторые исследователи полагают, что в нормальных условиях функционирования клетки АКМ в митохондриях не образуются или синтезируются в очень малых количествах (0,10–0,15% потребляемого кислорода), другие же считают митохондрии главным источником внутриклеточной генерации  $O_2^{\bullet-}$  и оценивают его продукцию в 4–5% поглощаемого кислорода [28]. В любом случае, ни один из исследователей не отрицает возможности образования значительных количеств АКМ в митохондриях при патологических состояниях [29]. Применение различных ингибиторов и субстратов окисления позволяет идентифицировать в составе митохондрий не менее 10 ферментов и структурных элементов, способных продуцировать АКМ [27, 30].

Находящаяся на внешней мембране редуктаза цитохрома  $b_5$  (NADH:феррицитохром- $b_5$ -оксидоредуктаза, КФ 1.6.2.2) является мембрансвязанным ферментом и локализована преимущественно на эндоплазматическом ретикулуме и внешней мембране митохондрий, некоторое количество ее также выявляется на цитоплазматической мембране. Основным назначением этого фермента считаются биосинтез ненасыщенных жирных кислот и холестерина, метаболизм ксенобиотиков, восстановление радикалов аскорбата и метгемоглобина в эритроцитах. Кроме того, редуктаза цитохрома  $b_5$  может действовать как хинонредуктаза и восстанавливать липофильные антиоксиданты убихинон и витамин Е, при этом может образовываться  $O_2^{\bullet-}$ . На внешней мембране митохондрий находятся моноаминоксидазы А и В (КФ 1.4.3.4), которые способны синтезировать  $H_2O_2$  в процессе окисления биогенных аминов. Скорость генерации  $H_2O_2$  моноаминоксидазами при окислительном дезаминировании катехоламинов на два порядка выше, чем скорость генерации  $H_2O_2$  электрон-транспортной цепью ( $4,5 \times 10^{-5}$  и  $2,8 \times 10^{-7}$   $Mc^{-1}$  соответственно) [31]. Во многих исследованиях показывается, что наиболее эффективными участками наработки  $O_2^{\bullet-}$  в митохондриях являются комплекс I (NADH-дегидрогеназа, КФ 1.6.5.3, систематическое название «NADH: убихинонредуктаза ( $H^+$ -транслоцирующая)») и комплекс III (убихинол-цитохром  $c$ -редуктаза, КФ 1.10.2.2, систематическое название «хинол-цитохром  $c$ -оксидоредуктаза»), рис. 2 [23, 29].

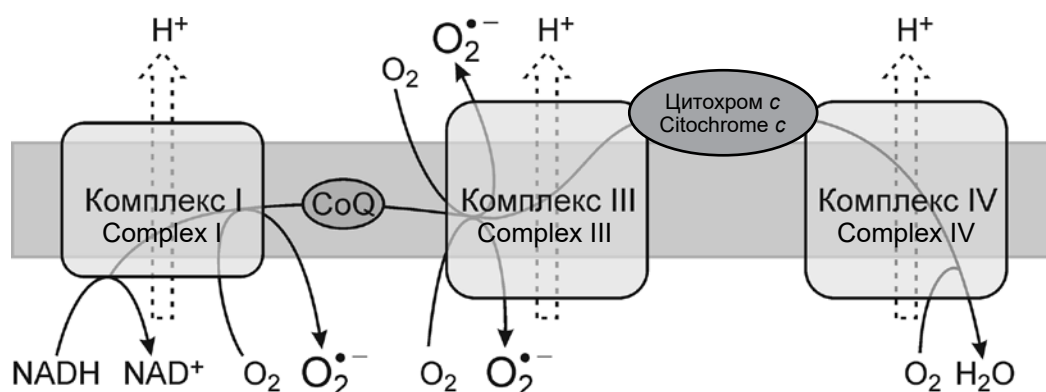


Рис. 2. Главные участки образования  $O_2^{\bullet-}$  в дыхательной цепи митохондрий

Fig. 2. The main sites of  $O_2^{\bullet-}$  generation in the mitochondrial respiratory chain

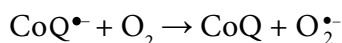
Комплекс I дыхательной цепи является первым звеном окислительного фосфорилирования в митохондриях, у млекопитающих он включает 44 полипептида общей молекулярной массой около 970 кДа, семь белков комплекса кодиру-

ются митохондриальной ДНК [28]. В состав комплекса NADH-дегидрогеназы входят один флавиновый моноклеотид и восемь железосерных кластеров. Некоторые исследователи считают, что в нормальных условиях комплекс I электрон-

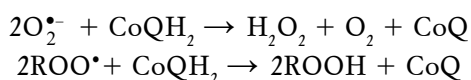


транспортной цепи является главным источником образования  $O_2^{\bullet-}$  в митохондриях. В основе такого мнения лежит тот факт, что введение ротенона (ингибитор комплекса I) существенно снижает продукцию супероксид-аниона. В комплексе I компонентами, с которых возможен перенос электронов на кислород, являются флавин, семиубихинон и не относящийся к основной цепи внутрибелкового переноса электронов железосерный центр N1a. Перенос электрона с иона железа или семихинонового радикала на кислород приводит к образованию  $O_2^{\bullet-}$ . Продуктами взаимодействия флавиновых коферментов с молекулярным кислородом могут являться  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$ . Восстановление кислорода с участием комплекса I цепи переноса электронов в наибольшей степени определяется градиентом pH на внутренней мембране и в меньшей степени – мембранным потенциалом. Наибольшая продукция  $O_2^{\bullet-}$  наблюдается в условиях индукции обратного транспорта электронов с убихинола на  $NAD^+$  [30], такое явление наблюдается при реперфузии ишемизированного органа [32]. Следует также отметить, что образующийся на комплексе I супероксид-анион мигрирует в матрикс митохондрий.

Транспорт электронов от комплексов I и II на цитохром *c* осуществляется с участием убихинона, или коэнзима Q (CoQ). На внутренней мембране митохондрий со стороны матрикса CoQ восстанавливается до  $CoQH_2$ , мигрирует на другую сторону мембраны и высвобождает протоны в межмембранное пространство, а электроны поступают на простетические группы комплекса III (цитохромы  $c_1$  и  $b$ ) (см. рис. 2). Окисляясь и восстанавливаясь в процессе транспорта электронов, убихинон может образовывать семихиноновые радикалы ( $CoQ^{\bullet}$ ), способные восстанавливать молекулярный кислород с образованием  $O_2^{\bullet-}$ :



При этом в восстановленном состоянии убихинон ингибирует супероксидный анион-радикал, восстанавливая его до  $H_2O_2$ , также как и другие органические радикалы:



Таким образом, в митохондриях коэнзим Q является как основным прооксидантом, так и важным антиоксидантом. По некоторым оценкам, с участием убихинона образуется 70–80% продуцируемого митохондриями  $O_2^{\bullet-}$  [33].

Митохондрии чрезвычайно уязвимы к действию АКМ. Митохондриальная ДНК накапли-

вает мутации в десятки раз быстрее ядерной, а система ее репарации существенно менее эффективна, чем система репарации ядерной ДНК [34]. Главным причиной мутаций является повреждение ДНК под действием АКМ, в частности  $O_2^{\bullet-}$ . В норме в клетках с постоянной низкой скоростью происходит аутофагосомальное удаление митохондрий (за сутки удаляется примерно 1 из 20 митохондрий), однако его темпы могут повышаться, например в условиях дефицита питательных веществ. При этом аутофагосомальной деградации предшествует деполяризация митохондриальной мембраны, что свидетельствует о специфичности удаления именно поврежденных митохондрий. Деполяризация митохондриальных мембран происходит в результате активации пор переходной проницаемости (mPTP), которая, в свою очередь, является ответом на снижение эффективности продукции АТФ, усиление генерации АКМ и нарушение обмена кальция между митохондриями и цитозолем [35]. Открытие mPTP также грозит клетке высвобождением цитохрома *c* и запуском внутреннего пути апоптоза, в связи с чем аутофагосомальная деградация поврежденных митохондрий является важным механизмом предотвращения клеточной гибели.

Ключевую роль в запуске митофагии играют киназы PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) и Parkin [36–38]. Серин-треониновая киназа PINK1 (64 кДа; 581 аминокислота) преимущественно локализуется внутри митохондрий, а в цитоплазме быстро разрушается протеасомами. Напротив, убиквитин-Е3-лигаза Parkin (52 кДа; 465 аминокислот) находится в цитоплазме, она способна убиквитинировать широкий спектр белков [38]. Активация mtPTP приводит к локализации PINK1 на внешней мембране митохондрий, где она связывает и активирует Parkin посредством фосфорилирования его серинового остатка (Ser65) [39]. Также PINK1 препятствует высвобождению из митохондрий цитохрома *c*, чем ингибирует развитие апоптоза [40]. После активации Parkin начинает убиквитинировать широкий спектр мембранных белков, выявлено 36 таких белков [41]. С убиквитинированными белками связывается p62 (убиквитинсвязывающий белок p62, он же секвестосом 1), выступающий в качестве «грузового» рецептора [39, 42]. Ряд других белков, таких как оптиневрин (66 кДа), NDP52 (nuclear dot 52 kDa protein) и TAX1BP1 (Tax1-binding protein 1), также могут связываться с убиквитинированными белками и выступать в качестве «грузовых» рецепторов [38, 39, 43]. В ответ на действие  $H_2O_2$  в клетках наблюдается увеличение содержания

Parkin [44]. У нокаутных по PINK1 мышей развивается гипертрофия миокарда, чего не наблюдается у нокаутов по Parkin ввиду компенсаторного действия других убиквитин-E3-лигаз (MUL1, Mulan и MARCH5) [45, 46]. На различных моделях показано, что митохондриальная E3-убиквитинлигаза 1 (MUL1: mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1) усиливает митофагию в ответ на ишемию [47]. Следует также отметить, что Parkin участвует в удалении внутриклеточных бактерий, поэтому снижение его содержания повышает чувствительность животных к *Mycobacterium tuberculosis* и *Salmonella typhi* [48]. Процесс убиквитинирования обратим: деубиквитидазы (USP15, USP30 и USP35) могут конкурировать с Parkin и деубиквитинировать белки, в результате чего происходит угнетение митофагии [12, 49].

Мембранные белки NIX (Nip3-like protein X), BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein-3), FUNDC1 (FUN14 domain-containing protein 1), PARK7 (Parkinsonism associated deglycase; синоним DJ-1), а также многофункциональный белок Drp1 (dynamin-related protein 1) могут запускать митофагию независимо от убиквитина [50–52]. Находящиеся на внешней мембране белки BNIP3 и NIX служат рецепторами митофагии, они связывают LC3 и играют ключевую роль в удалении митохондрий при созревании эритроцитов [21, 50]. У нокаутных по NIX животных наблюдается выраженная анемия [53]. Другой мембранный белок митохондрий

FUNDC1 функционирует как специфический рецептор, отвечающий на ишемию [39, 52]. В нормальных условиях FUNDC1 находится в фосфорилированном состоянии, что препятствует его взаимодействию с LC3, при ишемии же активность фосфатаз повышается, белок дефосфорилируется и индуцирует митофагию [39, 54]. Во взаимодействии с другими митохондриальными белками FUNDC1 участвует в регуляции слияния и фрагментации митохондрий [55]. Усиление тромбообразования у нокаутных по FUNDC1 животных повышает реперфузионное повреждение миокарда [54]. Посредством индукции факторов транскрипции HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) и FOXO3 (forkhead box O3) гипоксия также активирует экспрессию синтеза белков BNIP3 и NIX [56, 57].

При окислении остатка Cys106 редокс-чувствительного белка DJ-1, состоящего из двух 189-аминокислотных субъединиц, он из цитоплазмы перемещается в митохондрии, где взаимодействует с множеством других белков, в том числе LC3 [58]. Кроме того, DJ-1 является шапероном, а также ингибирует убиквитинирование транскрипционного фактора Nrf2 и повышает экспрессию генов антиоксидантных ферментов (каталазы, Mn-COD и тиоредоксина 1) [58, 59]. Белки NIX, Bnip3, FUNDC1 и DJ-1 содержат домены LIR (LC3-interacting region), что позволяет им прямо взаимодействовать с адаптерными белками семейств LC3 и GABARAP (рис. 3).

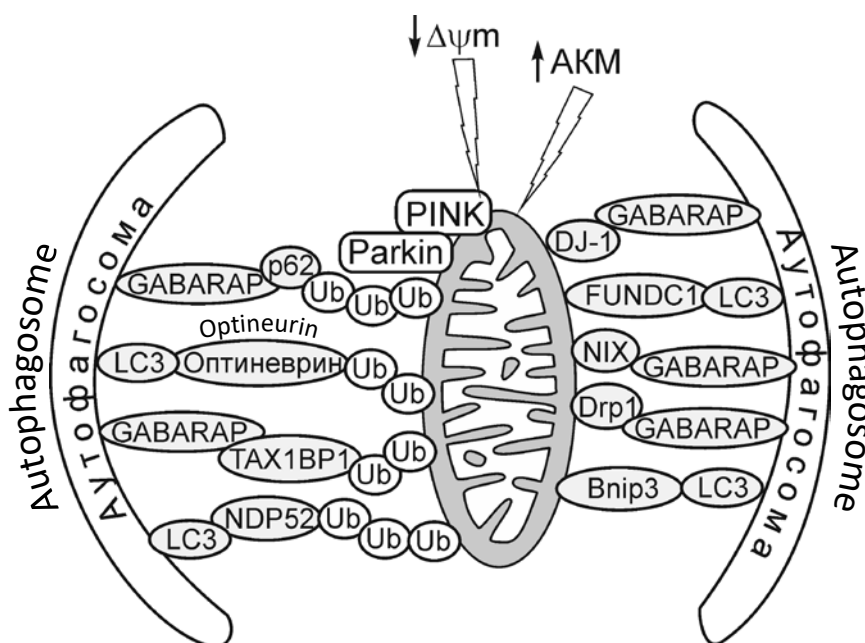


Рис. 3. Убиквитин-зависимые (левая часть) и убиквитин-независимые (правая часть) механизмы митофагии  
Fig. 3. Ubiquitin-dependent (left side) and ubiquitin-independent (right side) mechanisms of mitophagy. Explanations in the text

Главной функцией белка Drp1 (dynamin-related protein 1) являются деление и фрагментация митохондрий, одновременно он может индуцировать митофагию и усиливать слияние аутофагосом с лизосомами [26, 51]. В клетках человека более 25 белков в той или иной степени участвуют в регуляции митофагии [60].

Митофагия играет ключевую роль в поддержании редокс-баланса в клетках [61, 62], что важно при нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваниях [26, 40, 45, 63], а также в индукции иммунного ответа и развитии воспаления [64, 65]. Способствуя уменьшению генерации АКМ, митофагия подавляет опухолевую трансформацию клеток, однако вместе с тем повышает устойчивость злокачественных новообразований к химиотерапии [5]. Сегодня выявлены прямые взаимосвязи между мутациями в генах белков, запускающих митофагию (PINK1, Parkin, DJ-1), и наследственными нейродегенеративными заболеваниями [66, 67]. Поэтому в последние годы идет активный поиск способов и средств регуляции аутофагии и митофагии [68–70]. В этом плане активно исследуются различные растительные продукты [70, 71], изучаются эффекты физических нагрузок и голодания [47, 68, 72], а также разрабатываются препараты с направленным на митохондрии действием [73].

## ПЕКСОФАГИЯ

Пероксисомы представляют собой небольшие цитоплазматические структуры размером 0,3–1,5 мкм, окруженные одинарной мембраной и содержащие хорошо выраженный гранулярный матрикс. Как клеточные структуры пероксисомы впервые были описаны в 1954 г. шведским ученым Йоханнесом Родином (Johannes A.G. Rhodin), а как функциональные элементы – в 1965 г. бельгийским цитологом Кристианом де Дювом. Клетки дрожжей содержат 1–20 пероксисом, клетки млекопитающих – от нескольких сотен до тысяч, однако их нет в зрелых эритроцитах [74]. Количество, размеры и форма пероксисом варьируют в разных тканях: больше всего органелл в клетках печени и почек, меньше (и меньшего размера) – в клетках кожи и мозга. В пероксисомах локализуется более 50 ферментов, которые участвуют в окислении жирных кислот, разрушении токсичных соединений, синтезе желчных кислот и холестерина. При этом для переноса ферментов из цитоплазмы, где они синтезируются на рибосомах, внутрь пероксисом служит система избирательного транспорта. В клетках млекопитающих среднее время обновления пероксисом

составляет 1,3–2,2 сут, а их содержание определяется балансом между образованием новых и удалением существующих органелл [75]. Новые пероксисомы образуются в результате либо деления уже существующих, либо формирования *de novo* из эндоплазматического ретикулума. Дегградация пероксисом проходит по трем механизмам: 1) дегградация матричных белков и ферментов протеазой Lon; 2) аутолиз с участием 15-липсигеназы, окисляющей мембранные липиды; 3) пексофагия с последующей дегградацией в лизосомах [75, 76]. Пексофагия является основным механизмом утилизации пероксисом, посредством нее удаляется 70–80% органелл [74].

В клетках наряду с митохондриями пероксисомы являются основными потребителями  $O_2$ , который используется ферментами для отщепления атомов водорода от некоторых органических субстратов с образованием перекиси водорода, в последующем фенолов, формальдегида, этанола и других соединений [77]. Выступая эффективными продуцентами АКМ, пероксисомы также содержат большое количество ферментов их детоксикации (тиоредоксин 2, глутаредоксины 2 и 5, пероксиредоксины 3 и 5, глутатионпероксидазы и глутатионредуктаза, Cu,Zn- и Mn-супероксиддисмутазы), поэтому рассматриваются как один из главных регуляторов редокс-баланса в клетках [78]. Основными генераторами АКМ в пероксисомах выступают флавиновые оксидазы: полиаминоксидазы, оксидазы D- и L-аминокислот, ксантиноксидаза, уратоксидаза, которые восстанавливают молекулярный кислород до  $H_2O_2$  [79]. Несмотря на высокое содержание каталазы, пероксисомы продуцируют 20–60% внутриклеточного пероксида водорода [29]. Кроме того, пероксисомы содержат ксантиноксидоредуктазу и индуцибельную NO-синтазу, являющиеся потенциальными источниками  $O_2^{\cdot-}$  и  $NO^{\cdot}$  [80]. В отличие от  $O_2^{\cdot-}$ , не имеющие заряда молекулы  $NO^{\cdot}$  и  $H_2O_2$  достаточно легко диффундируют в цитоплазму. Посредством продукции АКМ пероксисомы взаимодействуют с митохондриями и совместно участвуют в регуляции широкого спектра редокс-зависимых процессов в клетках [78].

У дрожжей идентифицированы два рецептора, запускающих пексофагию: Atg30 (*P. pastoris*) и Atg36 (*S. cerevisiae*), которые активируются после фосфорилирования [75]. «Грузовыми» рецепторами для пексофагии в клетках млекопитающих являются пероксины, NBR1 (nuclear Dbf2-related kinase 1), NIX и p62, а главным запускающим процесс редокс-чувствительным

сенсором выступает серин-треониновая киназа ATM (ataxia-telangiectasia mutated kinase) (рис. 4) [21, 62, 75]. В ответ на действие АКМ посредством формирования дисульфидного мостика между остатками цистеина (Cys2991) двух молекул ATM-киназы образуются активные димеры, которые связываются с пероксисомами и фосфорилируют расположенный на их мембране рецептор PEX5 (протеин, играющий важную роль в импорте белков в пероксисомы) по остатку Ser141 [76, 81]. Фосфорилированный PEX5

убиквитинируется и взаимодействует с p62 или NBR1, которые, в свою очередь, связываются с LC3B с формированием фагофора [81, 82]. Кроме того, показано, что в условиях окислительного стресса ATM-киназа аутофосфорилируется по остатку Ser1981 и активирует каскад LKB1/AMPK/TSC2, тем самым ингибируя комплекс mTORC1 и активируя процесс аутофагии [82]. Помимо PEX5 убиквитинлигазной активностью обладают PEX2 и PEX3, которые активируются в ответ на недостаток аминокислот [12, 83].

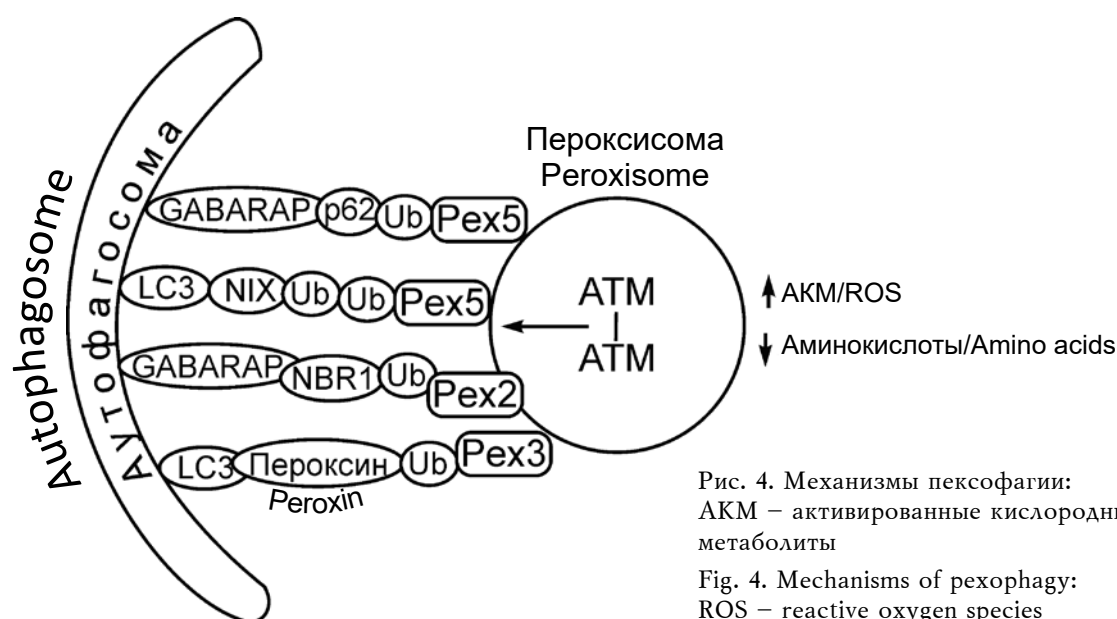


Рис. 4. Механизмы пексофагии:  
АКМ – активированные кислородные  
метаболиты

Fig. 4. Mechanisms of pexophagy:  
ROS – reactive oxygen species

Основная часть пероксисомных болезней связана с недостатком тех или иных ферментов, однако некоторые из них могут быть вызваны нарушениями процесса пексофагии [84]. Так, пероксисомный ААА-комплекс млекопитающих (complex of ATPases associated with diverse cellular activities), в состав которого входят белки PEX1, PEX6 и PEX26, подавляет пексофагию, элиминируя убиквитинированный PEX5; частота встречаемости носителей мутаций в генах *PEX1*, *PEX6* и *PEX26* среди пациентов с нарушениями биогенеза пероксисом составляет 65%, а среди лиц, страдающих одной из самых тяжелых клинических разновидностей этой группы заболеваний, синдромом Целлевегера, – 79% [85].

## РЕТИКУЛОФАГИЯ

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) состоит из разветвленной сети трубочек и карманов, окруженных одинарной мембраной. Площадь мембран ЭПР составляет около половины общей площади всех мембран клетки [86]. Выделяют два

вида ЭПР: гранулярный (шероховатый) и агранулярный (гладкий). На поверхности гранулярного ЭПР находится большое количество рибосом, отвечающих за синтез белков, значительная часть которых (около 35%) транспортируется внутрь ЭПР, где подвергается фолдингу (от англ. folding – складывание) с помощью шаперонов и ферментов. Белки с корректной укладкой отправляются к месту назначения, а белки с нарушенной укладкой подвергаются ассоциированной с эндоплазматической сетью деградации. В задачи гладкого ЭПР входит синтез липидов и стероидов, необходимых для создания новых мембран, в частности ядерной оболочки после митоза, а также метаболизм углеводов, лекарственных веществ и других экзогенных продуктов. ЭПР содержит основной запас внутриклеточного кальция и поддерживает его гомеостаз [86]. Ионы кальция из цитоплазмы транспортируются в ЭПР  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазой. Совместно с митохондриями ЭПР участвует в регуляции многих кальций-зависимых процессов в клетках, в том числе аутофагии [87, 88].

ЭПР свойственна высокая степень окисленности: так, если в цитоплазме соотношение восстановленного и окисленного глутатиона GSH/GSSG (основной показатель редокс-баланса) составляет 50 : 1, то в просвете ЭПР – от 1 : 1 до 3 : 1 [89]. Эта особенность облегчает образование дисульфидных связей при формировании третичной структуры вновь синтезированных

белков (так называемый окислительный фолдинг); реакция протекает с участием изомеразы дисульфидов PDI (protein disulfide isomerase) и оксидоредуктазы ERO1 (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1), который служит главным продуцентом АКМ в ЭПР, так как акцептором протонов выступает молекулярный кислород (рис. 5) [90, 91].

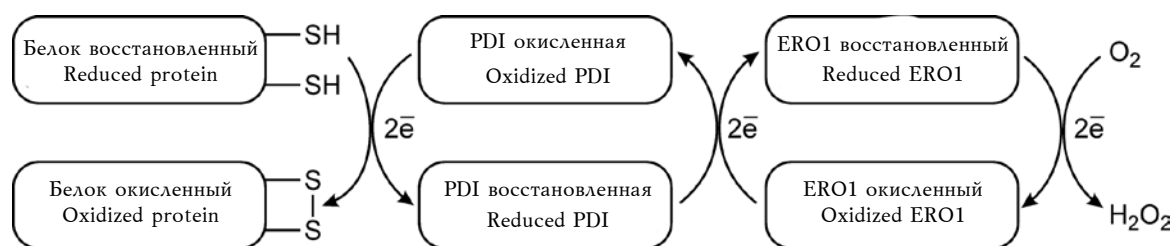


Рис. 5. Окислительный фолдинг белков с участием протеиндисульфидизомеразы PDI и оксидоредуксина ERO1 [84, 85]

Fig. 5. Oxidative protein folding by protein disulfide isomerase PDI and oxidoredoxin ERO1 [84, 85]

Образующаяся в результате окислительного фолдинга перекись водорода может мигрировать в цитоплазму, а также участвовать в окислении глутатиона. ERO1 выявляется у всех эукариот, начиная от простейших, у млекопитающих она представлена двумя изоформами, Ero1 $\alpha$  и Ero1 $\beta$  [92]. Помимо ERO1, оксидоредуктазной активностью обладает ряд других белков, таких как QSOX (quiescin sulphydryl oxidases), глутатионпероксидазы GPx7 и GPx8, пероксиредоксин Prx4 и др. [92].

Другим важным источником H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ЭПР является изоформа NADPH-оксидазы Nox4, которая в отличие других изоформ локализована на внутриклеточных мембранах (ЭПР, митохондрии, ядра) [93]. Семейство NADPH-оксидаз (КФ 1.6) включает семь основных членов: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, а также Duox1 и Duox2, которые специализированы на продукции АКМ. Интересной особенностью Nox4 является то, что она синтезирует преимущественно не O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, а H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – либо за счет прямой диоксигеназной активности, либо благодаря наличию уникального остатка гистидина, который может служить в качестве дополнительного источника протонов [94]. Кроме того, в отличие от иных изоформ Nox, для активации Nox4 не нужны другие внутриклеточные компоненты, в частности субъединицы p22<sup>phox</sup> [93]. В эндотелиальных клетках Nox4 отвечает за синтез 1/3 внутриклеточной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и рассматривается как важный элемент поддержания неселективной аутофагии на физиологическом уровне [95, 96]. Предполагается, что разные изоформы

Nox выступают связующим звеном между нарушениями ЭПР и фолдинга белков, с одной стороны, и окислительным стрессом и апоптозом – с другой [93].

ЭПР не является стабильной структурой и подвержен частым изменениям, прежде всего посредством аутофагии. С ЭПР тесно взаимосвязаны митохондрии и рибосомы, поэтому при формировании аутофагосом ЭПР служит главным источником мембранной структуры [97, 98], в связи с чем все виды аутофагии сопровождаются удалением части ЭПР. Сегодня идентифицированы несколько рецепторов, запускающих селективную ретикулофагию: у дрожжей – белки Atg39 и Atg40, взаимодействующие с Atg8; у млекопитающих – мембрансвязанные белки FAM134 (family with sequence similarity 134), которые содержат домен LIR, позволяющий им прямо взаимодействовать с адаптерными белками семейств LC3 и GABARAP [99, 100].

Считается, что ретикулофагия представляет собой важный механизм защиты от стресса ЭПР, возникающего вследствие интенсивного окислительного фолдинга белков. В то же время очевидно, что ретикулофагия также является важным механизмом предотвращения окислительного стресса, поскольку окислительный фолдинг белков, как было описано выше, служит источником пероксида водорода, внося тем самым существенный вклад в нарушение редокс-гомеостаза [101, 102]. Кроме того, кальций, высвобождаемый из ЭПР при повреждении его мембран и нарушении активного транспорта ионов, быстро по-

глощается митохондриями, тесно связанными с мембранами ЭПР, приводя к активации mPTP и высвобождению цитохрома *c*, что в свою очередь компрометирует работу комплекса III электрон-транспортной цепи. Помимо этого, кальций повышает активность митохондриальных дегидрогеназ, участвующих в цикле Кребса, что влечет за собой увеличение потребления кислорода. Вместе это является причиной избыточной генерации АКМ и приводит к развитию окислительного стресса [103].

Формирование агрегированных структур при стрессе ЭПР запускает воспалительный процесс за счет активации факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и индукции образования инфламмасом [102]. Поэтому аутофагия и ретикулофагия обладают выраженным противовоспалительным эффектом, и с нарушением этих процессов ассоциировано развитие многих заболеваний, связанных с хроническим воспалением, таких как атеросклероз, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Педжета, инфекционные заболевания (туберкулез), лизосомные болезни накопления, аутоиммунные нарушения (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, диабет I типа), злокачественные новообразования [1, 12, 102, 104, 105].

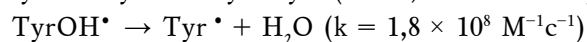
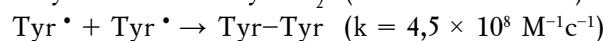
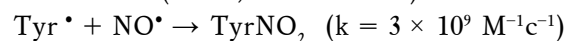
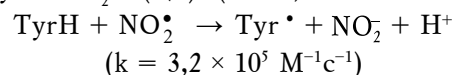
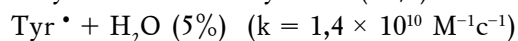
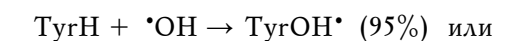
## АГРЕФАГИЯ

Агрегированные структуры в цитоплазме клеток выявляются при многих заболеваниях и патологических процессах: агрегированные α-синуклеины при болезни Паркинсона [8, 106], агрегаты тау-белков и β-амилоиды при болезни Альцгеймера [60, 107, 108], ALIS (aggresome-like induced structures) при стрессовых и иммунных воздействиях [109], с возрастом накапливаются липофусцины [110], прионные агрегаты выявляются при целом ряде прионных заболеваний [108]. Сегодня причины и механизмы формирования белковых и белок-липидных агрегатов во многом не ясны, это могут быть всевозможные мутации, приводящие к нарушению транспорта и фолдинга белков, а также многочисленные индуцированные модификации, в том числе при действии АКМ и карбонильных соединений [8, 111]. Основная часть растворимых модифицированных белков (90%) удаляется 20S и 26S протеасомами, а также с помощью шаперонов hsp70 с последующей лизосомальной деградацией [110, 112], в то время как нерастворимые агрегированные белки удаляются только посредством агрефагии (aggregates + autophagy) [8, 110].

Результатом развития окислительного стресса является повреждение многих молекул, в том

числе и белков [110]. Наиболее подвержены окислительной модификации аминокислотные остатки гистидина, цистеина, метионина, лейцина, а также ароматические аминокислоты (триптофан, тирозин, фенилаланин) [113]. В результате происходят различные варианты изменения физико-химических свойств молекул: формирование белок-белковых сшивок и S-S-мостиков, фрагментация молекул и их агрегация, изменение каталитической активности, вязкости, термической стабильности и подверженности протеолизу. Серосодержащие аминокислоты цистеин и метионин при окислении способны образовывать дисульфидные связи, которые могут вновь восстанавливаться в ферментативных реакциях с глутатионредуктазами, тиоредоксинредуктазами, пероксиредоксинами. Метионин также способен обратимо окисляться АКМ и восстанавливаться метионинсульфоксидредуктазами, которые используют в качестве восстановителя тиоредоксин.

Среди ароматических аминокислот с АКМ радикальной природы ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ) эффективно взаимодействует тирозин, имеющий легко окисляющуюся OH-группу. Образующиеся после отрыва атома водорода радикалы тирозина ( $\text{Tyr}\cdot$ ) также достаточно реакционны и способны взаимодействовать с другими радикалами и между собой, поэтому реально в биологических системах протекают разные реакции модификации тирозиновых остатков:



В организме образование продуктов окисления тирозина может служить показателем развития окислительного стресса. В этом плане удобен для определения дитирозин (битирозин), так как он имеет интенсивную флуоресценцию в области 420 нм при действии возбуждающего излучения с длиной волны 284 нм (кислые растворы) или 315 нм (щелочные растворы). В липопротеинах низкой плотности, выделенных из атеросклеротических бляшек, содержание дитирозина было в 100 раз выше по сравнению с нормальными липопротеинами [114].

Фрагментация белков и образование внутри- и межбелковых сшивок сопровождаются

изменением конформации молекул, их агрегационных свойств и повышением способности к протеолизу. Рассмотрение устойчивости широкого спектра протеинов к повреждающему действию АКМ показывает, что нативные белки более устойчивы по сравнению с конформационно измененными. По-видимому, эволюционно отбирались и закреплялись именно устойчивые к изменению конформации молекулы. Воздействия АКМ в концентрациях, близких к физиологическим, повреждают молекулы и повышают их доступность для протеолитических ферментов, результатом чего является высвобождение свободных аминокислотных остатков, обладающих выраженным ингибирующим эффектом в отношении АКМ. Таким образом, в условиях развития окислительного стресса белки в нативном состоянии, ввиду их высокого содержания и в клетках и межклеточных жидкостях, противостоят повреждениям, с одной стороны, поддерживая оптимальную структуру, а с другой – усиливая антиоксидантную защиту. Это свойство белков чрезвычайно важно для живых организмов, так как позволяет сохранять структуру в условиях регулярных изменений концентраций АКМ.

Следствием накопления в клетках и тканях цитотоксических продуктов катаболизма свободно-радикальных процессов становится карбонильный стресс [115]. К карбонильным соединениям, содержащим группу C=O, относятся альдегиды, кето-

ны, сложные эфиры, амиды и другие соединения. Важным источником образования карбонильных соединений являются ферментативные и неферментативные реакции окисления липидов (рис. 6) [116, 117]. Усиленный синтез карбонильных соединений при диабете связан с неферментативным гликированием белковых аминокислот, приводящим к образованию вначале легко обратимых шиффовых оснований в ходе реакции Майяра с последующим их превращением в более стабильные продукты Амадори, которые могут диссоциировать с высвобождением свободной глюкозы и молекулы протеина, но могут также, через стадию 3-деоксиглюкозона, медленно превращаться в стабильные и неподдающиеся расщеплению конечные продукты неферментативного гликирования (КПНГ; advanced glycation end-products, AGEs) [118, 119]. Формирование КПНГ может индуцироваться и другими  $\alpha$ -оксальальдегидами – глиоксалем и метилглиоксалем, образующимися из трехуглеродных интермедиатов гликолиза – глицеральдегид-3-фосфата и дигидроацетонфосфата. Все эти  $\alpha$ -оксальальдегиды – 3-деоксиглюкозон, глиоксаль и метилглиоксаль – реагируют с лизиновыми и аргининовыми остатками протеинов, формируя специфические КПНГ. Карбонильные соединения могут восстанавливаться карбонилредуктазами, вместе с тем, однажды сформировавшись, КПНГ остаются стабильными и накапливаются в клетках, связываясь с белками [120].

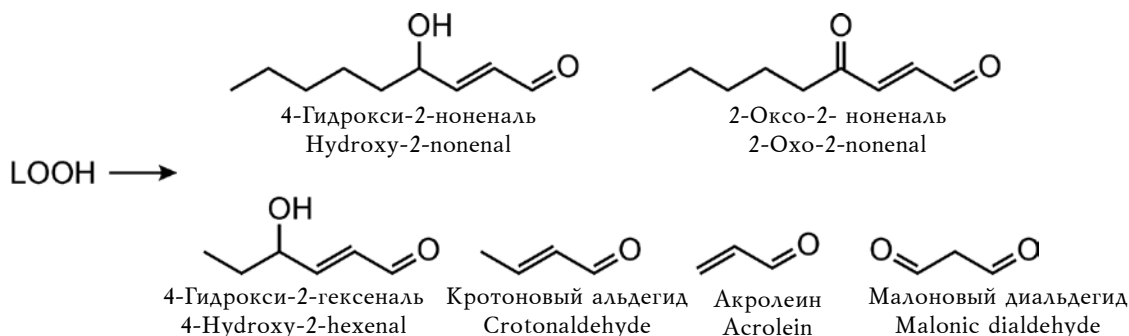


Рис. 6. Образование карбонильных соединений при свободнорадикальном окислении ненасыщенной жирной кислоты

Fig. 6. Formation of carbonyl compounds following the free radical oxidation of an unsaturated fatty acid

Агрегированные белки подвергаются убиквитинированию E3-лигазами. С убиквитинированными белками связываются p62 и NBR1, которые, в свою очередь, через свои LIR-домены взаимодействуют с LC3 и способствуют формированию аутофагофора [8, 15, 121]. При этом p62 можно рассматривать как связующее звено между двумя главными механизмами удаления поврежденных

белков: протеасомальной деградацией и агрефагией. Следует также отметить, что p62 может запускать и аутофагию протеасом [122]. Взаимодействие p62 с убиквитинированными белками значительно усиливается при фосфорилировании его сериновых остатков (S349, S403, S407), важную роль в этом играет фактор транскрипции HSF1 (heat shock transcription factor 1) [123].



Цитозольный белок оптиневрин индуцирует митофагию, ксенофагию и агрефагию, при этом, в отличие от p62 и NBR1, OPTN может стимулировать агрефагию без убиквитинирования белков [124, 125]. Множественное моноубиквитинирование также является триггером агрегации синуклеина и образования телец Леви при болезни Паркинсона. Предполагается, что убиквитинлигаза SIAH (seven in absentia homolog) специфически моноубиквитинирует синуклеин по нескольким определенным остаткам лизина, что способствует образованию массивных агрегатов этого белка и гибели нейронов [126]. Картина агрегации значительно усложняется тем, что агрегированные структуры могут заключаться в специальные компартменты, такие как ALIS, NuAGM и Cyto-AGM (nuclear and cytosolic aggresome) [8].

Считается, что такая изоляция в агресоме необходима для защиты от прионной токсичности. Несмотря на то, что агрегированные структуры выявляются при многих заболеваниях, на сегодняшний день не предложено каких-либо эффективных методов индукции агрегации для борьбы с такими структурами. Вместе с тем неспецифическая активация АМПК и аутофагии метформином дает выраженный защитный эффект при нейродегенеративных заболеваниях и прионных болезнях, многие из которых прямо ассоциированы с накоплением агрегированных структур (β-амилоидов, α-синуклеинов, прионов) [127].

## РЕГУЛЯЦИЯ СИСТЕМЫ Keap1/Nrf2/ARE

Фактор транскрипции Nrf2 играет ключевую роль в поддержании клеточного редокс-баланса при стрессовых воздействиях. В нормальных условиях транскрипционная активность Nrf2 находится на низком уровне вследствие его быстрого убиквитинирования и деградации в 26S-протеасомах, а также благодаря различным модификациям аминокислотных остатков транскрипционного фактора, регулирующих его транспорт в ядро и связывание с ДНК [128]. Если белки Nrf2 после убиквитинирования удаляются протеасомами, то комплексы его ингибитора Keap1 могут удаляться посредством аутофагии [128]. Этому предшествует агрегирование белка Keap1 с помощью адаптерного белка аутофагии p62/SQSTM1, который содержит в своей структуре участки для связывания с Keap1 и LC3 [129]. Домен KIR в составе p62 сходен по структуре с ETGE-последовательностью Nrf2, что позволяет ему взаимодействовать с Keap1, нарушая взаимосвязь с Nrf2 и его убиквитинирование, при этом взаимодействие p62 с Keap1 приводит к деградации последнего

посредством аутофагии. Индукция синтеза p62 в клетках гепатомы мышей Нера-1c1c7 приводила к двукратному снижению времени жизни ( $t_{1/2}$ ) Keap1, с 21,1 до 11,3 ч [130]. Считается, что аутофагия является основным независимым от протеасом механизмом деградации Keap1.

Регуляция SQSTM1/p62 осуществляется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Синтез мРНК гена *SQSTM1* регулируется факторами транскрипции Nrf2, NF-κB, AP-1 и FXR. Тесная взаимосвязь p62 выявляется с редокс-чувствительной сигнальной системой Keap1/Nrf2/ARE, активация которой приводит к усилению синтеза p62 [131]. Аффинность p62-KIR и Keap1 немного ниже, чем у DLGex-, и существенно ниже, чем у ETGE-домена Nrf2. Поэтому такое структурно-функциональное сходство доменов p62 и Nrf2 не играет роли в классической активации системы Nrf2/Keap1/ARE электрофильными соединениями. Для того чтобы p62-опосредованная индукция Nrf2 имела место, необходимы условия, в которых домен p62-KIR оказывается способным конкурировать с доменами DLGex и ETGE за связывание с Keap1. Одним из таких условий может быть увеличение концентрации p62, что повышает вероятность конкурентного вытеснения Nrf2-DLGex из комплекса с Keap1. Этот механизм, вероятно, работает при длительной активации Nrf2 благодаря тому, что Nrf2, связываясь с промотором гена *p62*, повышает его экспрессию. Увеличивающееся в результате количество белка p62 секвестрирует на себе Keap1, а это, в свою очередь, стабилизирует Nrf2 и поддерживает активность последнего [128].

Фосфорилирование p62 в положении Ser349 у человека или Ser351 у мыши (предположительно mTORC1-киназой) существенно увеличивает его сродство к Keap1, которое становится больше, чем взаимодействие Keap1 с Nrf2-ETGE (и, тем более, с Nrf2-DLGex) [132]. Такая модификация возможна только после предварительного фосфорилирования p62 в положении Ser403 киназой TBK1 и последующего формирования агрегатов p62 друг с другом и с убиквитинированными мишенями. Эти агрегаты являются, с одной стороны, мишенями для аутофагии, а с другой – служат сайтами секвестирования Keap1, в результате которого происходит индукция Nrf2/ARE. При этом деградация агрегатов аутофагией снижает активацию Nrf2, тогда как дисфункция аутофагии, вызванная нокаутом гена *Atg7*, служит причиной персистирующей активации Nrf2, связанной с накоплением белка p62 и его

агрегатов [133]. Убиквитинирование Keap1 также усиливает его взаимодействие с p62, однако наиболее значительный вклад в это взаимодействие могут вносить сестрины. Свое название семейство сестринов, состоящее из трех членов (Sesn1, Sesn2 и Sesn3), получило от итальянского городка Сестри-Леванте, где впервые было показано структурное сходство этих стресс-индуцируемых белков. Высокая антиоксидантная активность и способность индуцировать Nrf2 были выявлены у Sesn2, который способен формировать комплексы с p62 и Keap1, а также ингибировать mTORC1, что активирует аутофагию. Наличие в промоторе гена *Sesn2* последовательности ARE усиливает его активирующее действие на систему Keap1/Nrf2/ARE [134].

В промоторах многих генов аутофагии содержатся последовательности ARE, благодаря чему транскрипционный фактор Nrf2 активирует аутофагию [135, 136]. Анализ нуклеотидной последовательности ДНК человека выявил последовательности ARE в промоторах 16 генов, кодирующих белки аутофагии [135]. Транскрипционная активность семи генов повышалась при действии сульфорофана. В промоторе гена, кодирующего белок p62, обнаружено четыре последовательности ARE [135]. Активация сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE снижала токсические эффекты развития стресса эндоплазматического ретикула и оказывала защитный эффект на моделях сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний: назначение  $\alpha$ -липоевой кислоты, производных фумаровой кислоты уменьшает размер инфаркта миокарда и сохраняет сердечную функцию, куркумин ослабляет индуцированную доксорубицином кардиомиопатию, аллицин предотвращает ремоделирование миокарда и сердечную недостаточность при моделировании гипертрофии левого желудочка [137]; аналог куркумина ASC-JM17 снижает токсичность мутантного андрогенового рецептора в модели спинобульбарной мышечной атрофии, диметилфумарат уменьшает гибель дофаминергических нейронов черного вещества при  $\alpha$ -синуклеинопатии (модель болезни Паркинсона), в том числе за счет индукции аутофагии [136].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Защитная функция аутофагии при окислительном стрессе не ограничивается только ролью «чистильщика», удаляющего из клеток потенциально опасные источники АКМ (митофагия, пексофагия), а также токсических продуктов окислительного стресса (агрефагия, липофагия),

посредством аутофагии может активироваться сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE. Важной особенностью этих внутриклеточных механизмов является взаимность регуляции и способность непосредственно активироваться в ответ на интенсивное образование в клетках АКМ, что позволяет рассматривать аутофагию как важный элемент антиоксидантной защиты, возможно, один из самых ранних в эволюционной истории эукариот, поскольку гены и функции белков аутофагии крайне консервативны среди всех представителей этого домена живых организмов.

В настоящее время положительный эффект применения активаторов и ингибиторов аутофагии выявлен при многих заболеваниях, связанных с развитием окислительного стресса (воспалительных, нейродегенеративных, аутоиммунных, атеросклерозе, злокачественных новообразованиях). Разные формы аутофагии открывают новое направление борьбы с возрастными патологиями, что хорошо согласуется со свободнорадикальной теорией старения [138]. Неоднозначная роль аутофагии наблюдается при опухолевых процессах: считается, что она защищает опухолевые клетки в условиях гипоксии и является одной из причин химиорезистентности [139]. Однако следует отметить, что сегодня ученые находятся только на начальном этапе поиска способов и средств эффективного управления процессами аутофагии. Свидетельством тому является экспоненциальный рост числа публикаций по теме «аутофагия».

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008: 284. [Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Bondar' I.A., Trufakin V.A. Oxidative stress. Pathological conditions and diseases. Novosibirsk: ARTA Publ., 2008: 284 (in Russ.).]
2. Lionaki E., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: New insights into a complex interplay. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015; 1847 (11): 1412–1423. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.04.010.
3. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publishing, 2012: 496. [Men'shchikova Ye.B., Lankin V.Z., Kandalintseva N.V. Phenolic antioxidants in biology and medicine]. Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publishing Publ., 2012: 496 (in Russ.).]
4. Filomeni G., De Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic

- needs. *Cell Death Differ.* 2015; 22 (3): 377–388. DOI: 10.1038/cdd.2014.150.
5. Galadari S., Rahman A., Pallichankandy S., Thayyulathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.* 2017; 104: 144–164. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004.
  6. Hewitt G., Korolchuk V.I. Repair, reuse, recycle: The expanding role of autophagy in genome maintenance. *Trends Cell Biol.* 2017; 27 (5): 340–351. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.11.011.
  7. Zhang J., Kim J., Alexander A., Cai S., Tripathi D.N., Dere R., Tee A.R., Tait-Mulder J., Di Nardo A., Han J.M., Kwiatkowski E., Dunlop E.A., Dodd K.M., Folkerth R.D., Faust P.L., Kastan M.B., Sahin M., Walker C.L. A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15 (10): 1186–1196. DOI: 10.1038/ncb2822.
  8. Tan S., Wong E. Kinetics of protein aggregates disposal by aggregophagy. *Methods Enzymol.* 2017; 588: 245–281. DOI: 10.1016/bs.mie.2016.09.084.
  9. Wallace K.B. Mitochondrial toxicity. *Toxicology.* 2017; 391: 1. DOI: 10.1016/j.tox.2017.08.005.
  10. Matsuzawa-Ishimoto Y., Hwang S., Cadwell K. Autophagy and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 2018; 36: 73–101. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053253.
  11. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging.* 2018; 13: 757–772. DOI: 10.2147/CIA.S158513.
  12. Anding A.L., Baehrecke E.H. Cleaning house: Selective autophagy of organelles. *Dev. Cell.* 2017; 41 (1): 10–22. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.02.016.
  13. Khaminets A., Behl C., Dikic I. Ubiquitin-dependent and independent signals in selective autophagy. *Trends Cell Biol.* 2016; 26 (1): 6–16. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.08.010.
  14. Morel E., Mehrpour M., Botti J., Dupont N., Hamai A., Nascimbeni A.C., Codogno P. Autophagy: A druggable process. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2017; 57: 375–398. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104936.
  15. Svenning S., Johansen T. Selective autophagy. *Essays Biochem.* 2013; 55: 79–92. DOI: 10.1042/bse0550079.
  16. Navarro-Yepes J., Burns M., Anandhan A., Khalimonchuk O., del Razo L.M., Quintanilla-Vega B., Pappa A., Panayiotidis M.I., Franco R. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 21 (1): 66–85. DOI: 10.1089/ars.2014.5837.
  17. Scherz-Shouval R., Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 2011; 36 (1): 30–38. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.07.007.
  18. Пупышев А.Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты. *Цитология.* 2014; 56 (3): 179–196. [Pupyshov A.B. Reparative autophagy and autophagic cell death. Functional and regulatory aspects *Tsitologiya* – *Cytology.* 2014; (3): 179–196 (in Russ.)].
  19. Lin M.G., Hurley J.H. Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2016; 39: 61–68. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.02.010.
  20. Kim B.W., Kwon D.H., Song H.K. Structure biology of selective autophagy receptors. *BMB Rep.* 2016; 49 (2): 73–80. DOI: 10.5483/BMBRep.2016.49.2.265.
  21. Xu Z., Yang L., Xu S., Zhang Z., Cao Y. The receptor proteins: pivotal roles in selective autophagy. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2015; 47 (8): 571–580. DOI: 10.1093/abbs/gmv055.
  22. Schaaf M.B., Keulers T.G., Vooijs M.A., Rouschop K.M. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.* 2016; 30 (12): 3961–3978. DOI: 10.1096/fj.201600698R.
  23. Hamacher-Brady A., Brady N.R. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73 (4): 775–795. DOI: 10.1007/s00018-015-2087-8.
  24. Mancias J.D., Kimmelman A.C. Mechanisms of selective autophagy in normal physiology and cancer. *J. Mol. Biol.* 2016; 428 (9 Pt A): 1659–1680. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.02.027.
  25. Kornfeld O.S., Hwang S., Disatnik M.H., Chen C.H., Qvit N., Mochly-Rosen D. Mitochondrial reactive oxygen species at the heart of the matter: new therapeutic approaches for cardiovascular diseases. *Circ. Res.* 2015; 116 (11): 1783–1799. DOI: 10.1161/CIRCRESA-HA.116.305432.
  26. Gao J., Wang L., Liu J., Xie F., Su B., Wang X. Abnormalities of mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases. *Antioxidants (Basel).* 2017; 6 (2): 25. DOI: 10.3390/antiox6020025.
  27. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Старков А.А. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях. *Биохимия.* 2005; 70 (2): 246–264. [Andreyev A.Yu., Kushnareva Yu.E., Starkov A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)*. 2005; 70 (2): 200–214 (in Russ.)]. DOI: 10.1007/s10541-005-0102-7.
  28. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. *Успехи биологической химии.* 2013; 53: 245–296. [Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)*. 2013; 78 (13): 1490–1511 (in Russ.)]. DOI: 10.1134/S0006297913130087.
  29. Di Meo S., Reed T.T., Venditti P., Victor V.M. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016; 2016: 1245049. DOI: 10.1155/2016/1245049.
  30. Scialo F., Fernandez-Ayala D.J., Sanz A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: Potential roles in health and disease. *Front. Physiol.* 2017; 8: 428. DOI: 10.3389/fphys.2017.00428.

31. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. Окислительно-восстановительные процессы в клетках. Минск: БГУ, 2008: 159. [Martynovich G.G., Cherenkevich S.N. Redox processes in cells. Minsk: BSU Publ., 2008: 159 (in Russ.).]
32. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic. Biol. Med.* 2018; 117: 76–89. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024.
33. Wohlgemuth S.E., Calvani R., Marzetti E. The interplay between autophagy and mitochondrial dysfunction in oxidative stress-induced cardiac aging and pathology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014; 71: 62–70. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.007.
34. Yakes F.M., Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94 (2): 514–519.
35. Kaludercic N., Giorgio V. The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016; 2016: 3869610. DOI: 10.1155/2016/3869610.
36. Barodia S.K., Creed R.B., Goldberg M.S. Parkin and PINK1 functions in oxidative stress and neurodegeneration. *Brain Res. Bull.* 2017; 133: 51–59. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.12.004.
37. Rub C., Wilkening A., Voos W. Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell Tissue Res.* 2017; 367 (1): 111–123. DOI: 10.1007/s00441-016-2485-8.
38. Yamano K., Matsuda N., Tanaka K. The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO Rep.* 2016; 17 (3): 300–316. DOI: 10.15252/embr.201541486.
39. Yoo S.M., Jung Y.K. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Mol. Cells.* 2018; 41 (1): 18–26. DOI: 10.14348/molcells.2018.2277.
40. Islam M.T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* 2017; 39 (1): 73–82. DOI: 10.1080/01616412.2016.1251711.
41. Matic I., Strobbe D., Di Guglielmo F., Campanella M. Molecular biology digest of cell mitophagy. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2017; 332: 233–258. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2016.12.003.
42. Kim I., Rodriguez-Enriquez S., Lemasters J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007; 462 (2): 245–253. DOI: 10.1016/j.abb.2007.03.034.
43. Verstrepen L., Verhelst K., Carpentier I., Beyaert R. TAX1BP1, a ubiquitin-binding adaptor protein in innate immunity and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 2011; 36 (7): 347–354. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.03.004.
44. Brennan L., Khoury J., Kantorow M. Parkin elimination of mitochondria is important for maintenance of lens epithelial cell ROS levels and survival upon oxidative stress exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* 2017; 1863 (1): 21–32. DOI: 10.1016/j.bbdis.2016.09.020.
45. Bravo-San Pedro J.M., Kroemer G., Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2017; 120 (11): 1812–1824. DOI: 10.1161/CIRCRESA-HA.117.311082.
46. Wang X., Cui T. Autophagy modulation: a potential therapeutic approach in cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2017; 313 (2): H304–H319. DOI: 10.1152/ajpheart.00145.2017.
47. Lee Y., Kwon I., Jang Y., Song W., Cosio-Lima L.M., Roltsch M.H. Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection. *J. Physiol. Sci.* 2017; 67 (6): 639–654. DOI: 10.1007/s12576-017-0555-7.
48. Manzanillo P.S., Ayres J.S., Watson R.O., Collins A.C., Souza G., Rae C.S., Schneider D.S., Nakamura K., Shiloh M.U., Cox J.S. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature.* 2013; 501 (7468): 512–516. DOI: 10.1038/nature12566.
49. Bingol B., Sheng M. Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free Radic. Biol. Med.* 2016; 100: 210–222. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.015.
50. Ney P.A. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1853 (10 Pt B): 2775–2783. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.02.022.
51. Wu Q., Luo C.L., Tao L.Y. Dynamin-related protein 1 (Drp1) mediating mitophagy contributes to the pathophysiology of nervous system diseases and brain injury. *Histol. Histopathol.* 2017; 32 (6): 551–559. DOI: 10.14670/HH-11-841.
52. Yamaguchi O., Murakawa T., Nishida K., Otsu K. Receptor-mediated mitophagy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016; 95: 50–56. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.010.
53. Sandoval H., Thiagarajan P., Dasgupta S.K., Schumacher A., Prchal J.T., Chen M., Wang J. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature.* 2008; 454 (7201): 232–235. DOI: 10.1038/nature07006.
54. Zhang W., Siraj S., Zhang R., Chen Q. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial homeostasis and protects the heart from I/R injury. *Autophagy.* 2017; 13 (6): 1080–1081. DOI: 10.1080/15548627.2017.1300224.
55. Chen M., Chen Z., Wang Y., Tan Z., Zhu C., Li Y., Han Z., Chen L., Gao R., Liu L., Chen Q. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy.* 2016; 12 (4): 689–702. DOI: 10.1080/15548627.2016.1151580.
56. Li L., Tan J., Miao Y., Lei P., Zhang Q. ROS and autophagy: Interactions and molecular regulatory mechanisms. *Cell Mol. Neurobiol.* 2015; 35 (5): 615–621. DOI: 10.1007/s10571-015-0166-x.
57. Liu L., Sakakibara K., Chen Q., Okamoto K. Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Res.* 2014; 24 (7): 787–795. DOI: 10.1038/cr.2014.75.

58. Milani P., Ambrosi G., Gammoh O., Blandini F., Cereda C. SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: a clue for antioxidant therapeutic potential in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013; 2013: 836760. DOI: 10.1155/2013/836760.
59. Im J.Y., Lee K.W., Woo J.M., Junn E., Mouradian M.M. DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21 (13): 3013–3024. DOI: 10.1093/hmg/dds131.
60. Kerr J.S., Adriaanse B.A., Greig N.H., Mattson M.P., Cader M.Z., Bohr V.A., Fang E.F. Mitophagy and Alzheimer's disease: Cellular and molecular mechanisms. *Trends Neurosci.* 2017; 40 (3): 151–166. DOI: 10.1016/j.tins.2017.01.002.
61. Lee J., Giordano S., Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Biochem. J.* 2012; 441 (2): 523–540. DOI: 10.1042/BJ20111451.
62. Yan Y., Finkel T. Autophagy as a regulator of cardiovascular redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* 2017; 109: 108–113. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.003.
63. Moyzis A.G., Sadoshima J., Gustafsson A.B. Mending a broken heart: the role of mitophagy in cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2015; 308 (3): H183–H192. DOI: 10.1152/ajpheart.00708.2014.
64. Jin H.S., Suh H.W., Kim S.J., Jo E.K. Mitochondrial control of innate immunity and inflammation. *Immune Netw.* 2017; 17 (2): 77–88. DOI: 10.4110/in.2017.17.2.77.
65. Picca A., Lezza A.M.S., Leeuwenburgh C., Pesce V., Calvani R., Landi F., Bernabei R., Marzetti E. Fueling inflamm-aging through mitochondrial dysfunction: mechanisms and molecular targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (5): E902. DOI: 10.3390/ijms18050933.
66. Springer M.Z., Macleod K.F. Mitophagy: mechanisms and role in human disease. *J. Pathol.* 2016; 240 (3): 253–255. DOI: 10.1002/path.4774.
67. Trempe J.F., Fon E.A. Structure and function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the three musketeers of neuroprotection. *Front. Neurol.* 2013; 4: 38. DOI: 10.3389/fneur.2013.00038.
68. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Levine B., Green D.R., Kroemer G. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017; 16 (7): 487–511. DOI: 10.1038/nrd.2017.22.
69. Palikaras K., Daskalaki I., Markaki M., Tavernarakis N. Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacol. Ther.* 2017; 178: 157–174. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.04.005.
70. Wang Z.Y., Liu J.Y., Yang C.B., Malampati S., Huang Y.Y., Li M.X., Li M., Song J.X. Neuroprotective natural products for the treatment of Parkinson's disease by targeting the autophagy-lysosome pathway: A systematic review. *Phytother. Res.* 2017; 31 (8): 1119–1127. DOI: 10.1002/ptr.5834.
71. Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Kandantintseva N.V., Martinovich G.G., Menshchikova E.B. Plant phenols and autophagy. *Biochemistry (Mosc.)* 2016; 81 (4): 297–314. DOI: 10.1134/S0006297916040015.
72. Sanchez A.M., Bernardi H., Py G., Candau R.B. Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014; 307 (8): R956–R969. DOI: 10.1152/ajpregu.00187.2014.
73. Wani W.Y., Gudup S., Sunkaria A., Bal A., Singh P.P., Kandimalla R.J., Sharma D.R., Gill K.D. Protective efficacy of mitochondrial targeted antioxidant MitoQ against dichlorvos induced oxidative stress and cell death in rat brain. *Neuropharmacology.* 2011; 61 (8): 1193–1201. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.008.
74. Till A., Lakhani R., Burnett S.F., Subramani S. Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes. *Int. J. Cell Biol.* 2012; 2012: 512721. DOI: 10.1155/2012/512721.
75. Zientara-Rytter K., Subramani S. Autophagic degradation of peroxisomes in mammal. *Biochem. Soc. Trans.* 2016; 44 (2): 431–440. DOI: 10.1042/BST20150268.
76. Zhang J., Tripathi D.N., Jing J., Alexander A., Kim J., Powell R.T., Dere R., Tait-Mulder J., Lee J.H., Paull T.T., Pandita R.K., Charaka V.K., Pandita T.K., Kastan M.B., Walker C.L. ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS. *Nat. Cell Biol.* 2015; 17 (10): 1259–1269. DOI: 10.1038/ncb3230.
77. Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1822 (9): 1363–1373. DOI: 10.1016/j.bbdis.2011.12.001.
78. Pascual-Ahuir A., Manzanares-Estreder S., Proft M. Pro- and antioxidant functions of the peroxisome-mitochondria connection and its impact on aging and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017; 2017: 9860841. DOI: 10.1155/2017/9860841.
79. Antonenkov V.D., Grunau S., Ohlmeier S., Hiltunen J.K. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid. Redox Signal.* 2010; 13 (4): 525–537. DOI: 10.1089/ars.2009.2996.
80. Del Rio L.A., Lopez-Huertas E. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol.* 2016; 57 (7): 1364–1376. DOI: 10.1093/pcp/pcw076.
81. Tripathi D.N., Zhang J., Jing J., Dere R., Walker C.L. A new role for ATM in selective autophagy of peroxisomes (pexophagy). *Autophagy.* 2016; 12 (4): 711–712. DOI: 10.1080/15548627.2015.1123375.
82. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24 (5): 981–990. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
83. Sargent G., van Zutphen T., Shatseva T., Zhang L., Di Giovanni V., Bandsma R., Kim P.K. PEX2 is the E3 ubiquitin ligase required for pexophagy during starvation. *J. Cell Biol.* 2016; 214 (6): 677–690. DOI: 10.1083/jcb.201511034.

84. Nazarko T.Y. Pexophagy is responsible for 65% of cases of peroxisome biogenesis disorders. *Autophagy*. 2017; 13 (5): 991–994. DOI: 10.1080/15548627.2017.1291480.
85. Waterham H.R., Ebberink M.S. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1822 (9): 1430–1441. DOI: 10.1016/j.bbdis.2012.04.006.
86. Дедов И.И., Смирнова О.М., Горелышев А.С. Стресс эндоплазматического ретикула: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека. *Проблемы эндокринологии*. 2012; 58 (5): 57–65. [Dedov I.I., Smirnova O.M., Gorelyshev A.S. Endoplasmic reticulum stress: a cytological scenario of human disease pathogenesis. *Problems of Endocrinology*. 2012; 58 (5): 57–65 (in Russ.)].
87. Заводник И.Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация. *Биомедицинская химия*. 2016; 62 (3): 311–317. [Zavodnik I.B. Mitochondria, calcium homeostasis and calcium signaling. *Biomedical Chemistry*. 2016; 62 (3): 311–317 (in Russ.)]. DOI: 10.18097/PBMC20166203311.
88. Bootman M.D., Chehab T., Bultynck G., Parys J.B., Rietdorf K. The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium*. 2018; 70: 32–46. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.08.005.
89. Bhandary B., Marahatta A., Kim H.R., Chae H.J. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 14 (1): 434–456. DOI: 10.3390/ijms14010434.
90. Delaunay-Moisan A., Appenzeller-Herzog C. The antioxidant machinery of the endoplasmic reticulum: Protection and signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2015; 83: 341–351. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.019.
91. Zito E. ERO1: A protein disulfide oxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producer. *Free Radic. Biol. Med.* 2015; 83: 299–304. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.011.
92. Araki K., Inaba K. Structure, mechanism, and evolution of Ero1 family enzymes. *Antioxid. Redox Signal.* 2012; 16 (8): 790–799. DOI: 10.1089/ars.2011.4418.
93. Laurindo F.R., Araujo T.L., Abrahao T.B. Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 20 (17): 2755–2775. DOI: 10.1089/ars.2013.5605.
94. Takac I., Schroder K., Zhang L., Lardy B., Anilkumar N., Lambeth J.D., Shah A.M., Morel F., Brandes R.P. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (15): 13304–13313. DOI: 10.1074/jbc.M110.192138.
95. Forte M., Palmerio S., Yee D., Frati G., Sciarretta S. Functional role of Nox4 in autophagy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017; 982: 307–326. DOI: 10.1007/978-3-319-55330-6\_16.
96. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017; 11: 613–619. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
97. Cebollero E., Reggiori F., Kraft C. Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. *Int. J. Cell Biol.* 2012; 2012: 182834. DOI: 10.1155/2012/182834.
98. Hayashi-Nishino M., Fujita N., Noda T., Yamaguchi A., Yoshimori T., Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11 (12): 1433–1437. DOI: 10.1038/ncb1991.
99. Khaminets A., Heinrich T., Mari M., Grumati P., Huebner A.K., Akutsu M., Liebmann L., Stolz A., Nietzsche S., Koch N., Mauthe M., Katona I., Qualmann B., Weis J., Reggiori F., Kurth I., Hubner C.A., Dikic I. Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature*. 2015; 522 (7556): 354–358. DOI: 10.1038/nature14498.
100. Nakatogawa H., Mochida K. Reticulophagy and nucleophagy: New findings and unsolved issues. *Autophagy*. 2015; 11 (12): 2377–2378. DOI: 10.1080/15548627.2015.1106665.
101. Fan T., Chen L., Huang Z., Mao Z., Wang W., Zhang B., Xu Y., Pan S., Hu H., Geng Q. Autophagy decreases alveolar macrophage apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Oncotarget*. 2016; 7 (52): 87206–87218. DOI: 10.18632/oncotarget.13560.
102. Zhang C., Syed T.W., Liu R., Yu J. Role of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and inflammation in cardiovascular disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2017; 4: 29. DOI: 10.3389/fcvm.2017.00029.
103. Cao S.S., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 21 (3): 396–413. DOI: 10.1089/ars.2014.5851.
104. Lapaquette P., Guzzo J., Bretillon L., Bringer M.A. Cellular and molecular connections between autophagy and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 398483. DOI: 10.1155/2015/398483.
105. Linxweiler M., Schick B., Zimmermann R. Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine. *Signal Transduct. Target Ther.* 2017; 2: 17002. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.2.
106. Dias V., Junn E., Mouradian M.M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 2013; 3 (4): 461–491. DOI: 10.3233/JPD-130230.
107. Correia S.C., Resende R., Moreira P.I., Pereira C.M. Alzheimer's disease-related misfolded proteins and dysfunctional organelles on autophagy menu. *DNA Cell Biol.* 2015; 34 (4): 261–273. DOI: 10.1089/dna.2014.2757.
108. Currais A., Fischer W., Maher P., Schubert D. Intraneuronal protein aggregation as a trigger for inflammation and neurodegeneration in the aging brain. *FASEB J.* 2017; 31 (1): 5–10. DOI: 10.1096/fj.201601184.
109. Fujita K., Srinivasula S.M. TLR4-mediated autophagy in macrophages is a p62-dependent type of selective autophagy of aggresome-like induced structures

- (ALIS). *Autophagy*. 2011; 7 (5): 552–554. DOI: 10.4161/auto.7.5.15101.
110. Hohn A., Jung T., Grune T. Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 2014; 71: 70–89. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.028.
  111. Ланкин В.З., Тихазе А.К. Важная роль свободно-радикальных процессов в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета. *Кардиология*. 2016; 56 (12): 97–105. [Lankin V.Z., Tikhaze A.K. Free radical processes play an important role in the etiology and pathogenesis of atherosclerosis and diabetes. *Cardiology*. 2016; 56 (12): 97–105 (in Russ.)].
  112. Jackson M.P., Hewitt E.W. Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays Biochem.* 2016; 60 (2): 173–180. DOI: EBC20160005 [pii].
  113. Trnkova L., Drsata J., Bousova I. Oxidation as an important factor of protein damage: Implications for Maillard reaction. *J. Biosci.* 2015; 40 (2): 419–439.
  114. Heinecke J.W. Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32 (11): 1090–1101. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00792-X.
  115. Давыдов В.В., Божков А.И. Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза. Журнал НАМН України. 2014; 20 (1): 25–34. [Davydov V.V., Bozhkov A.I. Carbonyl stress as a nonspecific factor of pathogenesis. *Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine*. 2014; 20 (1): 25–34 (in Russ.)].
  116. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 482 (3): 419–425. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
  117. Hauck A.K., Bernlohr D.A. Oxidative stress and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* 2016; 57 (11): 1976–1986. DOI: 10.1194/jlr.R066597.
  118. Ансари Н.А., Рашид З. Неферментативное гликирование белков: от диабета до рака. *Биомедицинская химия*. 2010; 56 (2): 168–178. [Ansari N.A., Rasheed Z. Non-enzymatic glycation of proteins: from diabetes to cancer. *Biomedical Chemistry*. 2010; 56 (2): 168–178 (in Russ.)].
  119. Singh V.P., Bali A., Singh N., Jaggi A.S. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2014; 18 (1): 1–14. DOI: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1.
  120. Rashid M.A., Haque M., Akbar M. Detoxification of carbonyl compounds by carbonyl reductase in neurodegeneration. *Adv. Neurobiol.* 2016; 12: 355–365. DOI: 10.1007/978-3-319-28383-8\_19.
  121. Kenific C.M., Debnath J. NBR1-dependent selective autophagy is required for efficient cell-matrix adhesion site disassembly. *Autophagy*. 2016; 12 (10): 1958–1959. DOI: 10.1080/15548627.2016.1212789.
  122. Cohen-Kaplan V., Ciechanover A., Livneh I. p62 at the crossroad of the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Oncotarget*. 2016; 7 (51): 83833–83834. DOI: 10.18632/oncotarget.13805.
  123. Watanabe Y., Tsujimura A., Taguchi K., Tanaka M. HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis. *Autophagy*. 2017; 13 (1): 133–148. DOI: 10.1080/15548627.2016.1248018.
  124. Korac J., Schaeffer V., Kovacevic I., Clement A.M., Jungblut B., Behl C., Terzic J., Dikic I. Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J. Cell Sci.* 2013; 126 (Pt 2): 580–592. DOI: 10.1242/jcs.114926.
  125. Ying H., Yue B.Y. Optineurin: The autophagy connection. *Exp. Eye Res.* 2016; 144: 73–80. DOI: 10.1016/j.exer.2015.06.029.
  126. Бунеева О.А., Медведев А.Е. Роль атипичного убиквитинирования в клеточной регуляции. *Биомедицинская химия*. 2016; 62 (5): 496–509. [Buneeva O.A., Medvedev A.E. Role of atypical ubiquitination in cell regulation. *Biomedical Chemistry*. 2016; 62 (5): 496–509 (in Russ.)]. DOI: 10.18097/PBMC20166205496.
  127. Shah S.Z.A., Zhao D., Hussain T., Yang L. Role of the AMPK pathway in promoting autophagic flux via modulating mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases: Insight into prion diseases. *Ageing Res. Rev.* 2017; 40: 51–63. DOI: 10.1016/j.arr.2017.09.004.
  128. Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Мартинovich Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньшикова Е.Б. Лабиринты регуляции Nrf2. *Биохимия*. 2017; 82 (5): 757–767. [Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Martinovich G.G., Kandalintseva N.V., Menshchikova E.B. Mazers of Nrf2 Regulation. *Biochemistry (Mosc.)*. 2017; 82 (5): 556–564 (in Russ.)]. DOI: 10.1134/S0006297917050030.
  129. Katsuragi Y., Ichimura Y., Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* 2015; 282 (24): 4672–678. DOI: 10.1111/febs.13540.
  130. Copple I.M., Lister A., Obeng A.D., Kitteringham N.R., Jenkins R.E., Layfield R., Foster B.J., Goldring C.E., Park B.K. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *J. Biol. Chem.* 2010; 285 (22): 16782–16788. DOI: 10.1074/jbc.M109.096545.
  131. Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta*. 2018; 1865 (5): 721–733. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.
  132. Ichimura Y., Waguri S., Sou Y.S., Kageyama S., Hasegawa J., Ishimura R., Saito T., Yang Y., Kouno T., Fukutomi T., Hoshii T., Hirao A., Takagi K., Mizushima T., Motohashi H., Lee M.S., Yoshimori T., Tanaka K., Yamamoto M., Komatsu M. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell*. 2013; 51 (5): 618–631. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.003.
  133. Ishimura R., Tanaka K., Komatsu M. Dissection of the role of p62/Sqstm1 in activation of Nrf2 during xenophagy.



- agy. *FEBS Lett.* 2014; 588 (5): 822–828. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.01.045.
134. Rhee S.G., Bae S.H. The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1. *Free Radic. Biol. Med.* 2015; 88 (Pt B): 205–211. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.007.
135. Pajares M., Jimenez-Moreno N., Garcia-Yague A.J., Escoll M., de Ceballos M.L., Van Leuven F., Rabano A., Yamamoto M., Rojo A.I., Cuadrado A. Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes. *Autophagy*. 2016; 12 (10): 1902–1916. DOI: 10.1080/15548627.2016.1208889.
136. Pajares M., Cuadrado A., Rojo A.I. Modulation of proteostasis by transcription factor NRF2 and impact in neurodegenerative diseases. *Redox Biol.* 2017; 11: 543–553. DOI: 10.1016/j.redox.2017.01.006.
137. Cominacini L., Mozzini C., Garbin U., Pasini A., Stranieri C., Solani E., Vallerio P., Tinelli I.A., Fratta Pasini A. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2015; 88 (Pt B): 233–242. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.027.
138. Nakamura S., Yoshimori T. Autophagy and longevity. *Mol. Cells*. 2018; 41 (1): 65–72. DOI: 10.14348/molcells.2018.2333.
139. Das C.K., Mandal M., Kogel D. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2018; 37 (4): 749–766. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s10555-018-9727-z.

## Сведения об авторах

**Зенков Николай Константинович**, д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория молекулярных механизмов свободно-радикальных процессов, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-1476-4098.

**Чечушков Антон Владимирович**, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск.

**Кожин Пётр Михайлович**, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория молекулярных механизмов свободно-радикальных процессов, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-9989-9778.

**Мартинovich Григорий Григорьевич**, д-р биол. наук, зав. кафедрой биофизики, БГУ, г. Минск. ORCID iD 0000-0003-1972-6891.

**Кандалинцева Наталья Валерьевна**, канд. хим. наук, директор Института естественных и социально-экономических наук, НГПУ, г. Новосибирск.

**Меньщикова Елена Брониславовна**, д-р мед. наук, зав. лабораторией молекулярных механизмов свободно-радикальных процессов, ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-2367-0114.

(✉) **Меньщикова Елена Брониславовна**, e-mail: lemen@centercem.ru

## Authors information

**Zenkov Nikolay K.**, DBSc, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1476-4098.

**Cechushkov Anton V.**, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation.

**Kozhin Peter M.**, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9989-9778.

**Martinovich Grigory G.**, DBSc, Head of the Department of Biophysics, Belarusian State University, Minsk, Belarus. ORCID iD 0000-0003-1972-6891.

**Kandalintseva Natalia V.**, PhD, Director of the Institute of Natural and Social and Economic Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation.

**Menshchikova Elena B.**, DM, Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2367-0114.

(✉) **Menshchikova Elena B.**, e-mail: lemen@centercem.ru

Поступила в редакцию 23.03.2018  
Подписана в печать 14.12.2018

Received 23.03.2018  
Accepted 14.12.2018

## Особенности анализа выживаемости на примере пациентов в «листе ожидания» трансплантации почки

Зулькарнаев А.Б.

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

### РЕЗЮМЕ

Анализ выживаемости является одним из самых распространенных методов статистического анализа в медицине. Статистический анализ вероятности трансплантации (или смерти) в зависимости от времени ожидания в «листе ожидания» – редкий случай, когда анализ выживаемости применяется действительно для оценки времени до наступления события, а не для косвенной оценки рисков. Однако чтобы оценка была адекватной, причина цензурирования должна быть независима от интересующего исхода. Больные в листе ожидания подвержены риску не только умереть, они могут быть исключены из этого листа по причине ухудшения коморбидного фона или в результате трансплантации почки. Оценки Каплана – Мейера, Нельсона – Аалена, как и причинно-специфическая регрессионная модель пропорциональных рисков Кокса, являются заведомо предвзятыми оценками выживаемости в условиях наличия конкурирующих рисков. Поскольку конкурирующие события цензурятся, непосредственно оценить влияние ковариат на их частоту невозможно, так как отсутствует прямая связь между регрессионными коэффициентами и интенсивностью событий. Определение медианного времени ожидания на основе такого анализа порождает смещение отбора, что неизбежно приводит к предвзятой оценке.

Таким образом, в условиях конкурирующих рисков эти методы позволяют исследовать особенности причинно-следственных связей, но не дают возможность сделать индивидуальный прогноз вероятности конкретного события. В регрессионной модели конкурирующих рисков коэффициенты регрессии монотонно связаны с кумулятивной функцией инцидентности и конкурирующие события оказывают непосредственное влияние на коэффициенты регрессии. Существенное ее преимущество – это аддитивный характер функций кумулятивной инцидентности, всех возможных событий. При изучении этиологических ассоциаций лучше использовать регрессионную модель Кокса, которая позволяет оценить размер эффекта различных факторов. Регрессионная модель конкурирующих рисков, в свою очередь, имеет большую прогностическую ценность и позволяет оценить вероятность конкретного исхода в течение определенного времени у отдельно взятого пациента.

**Ключевые слова:** анализ выживаемости, статистика, причинно-специфический риск, метод Каплана – Мейера, модель пропорциональных рисков Кокса, регрессионная модель Файна и Грея, конкурирующий риск.

**Конфликт интересов.** Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

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

**Для цитирования:** Зулькарнаев А.Б. Особенности анализа выживаемости на примере пациентов в «листе ожидания» трансплантации почки. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 215–222. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-215-222>.

---

✉ Зулькарнаев Алексей Батырбаевич, e-mail: 7059899@gmail.com.

## Features of survival analysis on patients on the «waiting list» for kidney transplantation

Zulkarnaev A.B.

*Moscow Regional Research and Clinical Institute*

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

### ABSTRACT

Survival analysis is one of the most common methods of statistical analysis in medicine.

The statistical analysis of the transplantation (or death) probability dependent on the waiting time on the "waiting list" is a rare case when the survival analysis is used to estimate the time before the event rather than to indirectly assess the risks. However, for an assessment to be adequate, the reason for censoring must be independent of the outcome of interest. Patients on the waiting list are not only at risk of dying, they can be excluded from the waiting list due to deterioration of the comorbid background or as a result of kidney transplantation. Kaplan – Meier, Nelson – Aalen estimates, as well as a cause-specific Cox proportional hazards regression model, are consciously biased estimates of survival in the presence of competing risks. Since competing events are censored, it is impossible to directly assess the impact of covariates on their frequency, because there is no direct relationship between the regression coefficients and the intensity of these events. The determination of the median waiting time on the basis of such analysis generates a selection bias, which inevitably leads to a biased assessment.

Thus, in presence of competing risks, these methods allow us to investigate the features of cause-and-effect relationships, but do not allow us to make a prediction of the individual probability of a particular event based on the value of its covariates. In the regression model of competing risks, the regression coefficients are monotonically related to the cumulative incidence function and the competing events have a direct impact on the regression coefficients. Its significant advantage is the additive nature of the cumulative incidence functions of all possible events. In the study of etiological associations, it is better to use Cox regression model, which allows to estimate the size of the effect of various factors. The regression model of competing risks, in turn, has a greater prognostic value and allows to estimate the probability of a specific outcome within a certain time in a single patient.

**Key words:** survival analysis, statistics, cause-specific risk, Kaplan – Meier method, Cox proportional hazards model, Fine and Gray regression model, competing risk.

**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

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

Zulkarnaev A.B. Features of survival analysis on patients on the «waiting list» for kidney transplantation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 215–222. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-215-222>.

### ВВЕДЕНИЕ

Анализ выживаемости является одним из самых распространенных методов статистического анализа в медицине. Наиболее часто используются процедура (ниже – метод) Каплана – Мейера и регрессионная модель пропорциональных рисков Кокса. В условиях наличия конкурирующих рисков практическое применение этих методов

сопряжено с рядом особенностей и ограничений, а также требует специфической клинической интерпретации.

С момента появления указанных методов были разработаны новые способы анализа выживаемости, которые позволяют существенно дополнить имеющиеся возможности научных изысканий. Рассмотрим эти методы подробнее.

## ОЦЕНКА ФУНКЦИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ

В основе оценки выживаемости пациентов в листе ожидания (ЛО) обычно лежит подход «время до наступления события» (time-to-event). Отличительной особенностью практического применения такого подхода является наличие неполных, т.е. цензурированных наблюдений. Исследователь фиксирует факт того, что событие (допустим, смерть или трансплантация) произошло, а также время от начала наблюдения до события. Если пациент выбывает из исследования до наступления события, такое наблюдение считается цензурированным, и все, что может зафиксировать исследователь, – это время от начала исследования до выбытия пациента.

Наиболее распространенным методом анализа в условиях цензурированных наблюдений является процедура, названная в честь Эдварда Каплана (Edward Lynn Kaplan) и Пола Мейера (Paul Meier) [1]. Выживаемость – процесс не случайный, а представляет собой функцию, зависящую от времени. Пусть  $T$  – время до наступления события, непрерывная случайная величина. В результате применения процедуры Каплана – Мейера мы получаем кривую, которая представляет собой функцию выживаемости («дожития», survival function), или, используя технический термин, – функцию надежности (reliability function):  $S(t) = P(T \geq t)$ . Иными словами, значение этой функции представляет собой вероятность  $P$  не умереть по прошествии определенного времени  $t$ , при условии, что пациент дожил до этого момента.

Этот метод, позволяющий эмпирически оценить вероятность пережить определенное время при наличии цензурированных наблюдений, получил большое распространение благодаря доступности в большинстве статистических пакетов и возможности его применения без априорной информации о виде функции выживаемости (что дает возможность охарактеризовать его как непараметрический). В то же время этот метод не лишен недостатков, среди которых можно выделить позволяет оценить влияние на выживаемость только одного категориального предиктора (например, модальность диализной терапии или пол) и отсутствие возможности провести коррекцию на ковариаты (например, возраст и длительность диализной терапии и др.), а также предположение о неинформативном цензурировании [2].

Процедуру Каплана – Мейера также можно применить для оценки не функции выживаемости, а опосредованной оценки обратной функции –

риска, которую часто именуют функцией отказов (failure function):  $F(t) = 1 - S(t)$ . Альтернативой этому подходу может быть оценка кумулятивного риска  $H(t)$  (cumulative hazard rate) по методу Нельсона – Аалена (Nelson – Aalen) [3, 4]. Этот метод также непараметрический и применяется в случае цензурированных наблюдений. Не стоит путать оценки риска  $F(t)$ , выживаемости  $S(t)$  и кумулятивного риска  $H(t)$ . Значение  $F(t)$  можно интерпретировать как вероятность, что у случайно выбранного субъекта событие произойдет как минимум один раз по прошествии времени  $t$ , значение  $S(t)$  представляет собой вероятность того, что у случайно выбранного субъекта к моменту  $t$  событие не произойдет ни разу. Значение функции  $H(t)$  не имеет непосредственной вероятностной интерпретации и представляет собой ожидаемое количество событий у случайно выбранного субъекта к моменту  $t$ , если бы субъект мог бы испытать событие более одного раза. Таким образом, значение кумулятивного риска может превышать единицу. Несмотря на то, что в контексте анализа выживаемости значения кумулятивного риска более единицы затрудняют интуитивную интерпретацию, этот метод достаточно широко применяется. Если событие может произойти более одного раза (например, эпизод острого отторжения трансплантата), такая оценка будет наглядна и легко интерпретируема.

Поскольку функции выживаемости и кумулятивного риска связаны отношением  $H(t) = -\ln\{S(t)\}$ , тогда  $S(t) = \exp\{-H(t)\}$ , они позволяют непосредственно или косвенно оценить одни и те же параметры. При этом значения, рассчитанные на основе оценок Каплана – Мейера и Нельсона – Аалена, асимптотически эквиваленты. В целом метод имеет те же преимущества, недостатки и ограничения, что и оценка Каплана – Мейера [5, 6].

## ОЦЕНКА ФУНКЦИИ РИСКА

Потенциально влияние предикторов на выживаемость можно оценить, например, методом линейной логистической регрессии, предложенным Дэвидом Коксом (David Roxbee Cox) в 1958 г. [7]. Однако этот метод не допускает наличия неполных наблюдений. Полупараметрическая регрессионная модель пропорциональных рисков Кокса, предложенная им в 1972 г. [8], рассматривает «опасность» (hazard) в качестве меры риска как функцию, зависящую от времени. Она моделирует влияние предикторов на уровень опасности (hazard rate) с учетом периода наблюдения

и допускает наличие неполных (цензурированных) наблюдений. Функция риска  $h(t)$  описывает мгновенную вероятность события для субъектов, которые все еще подвержены риску.

Поскольку в данном случае вероятность отнесена ко времени (интервалу  $\Delta t$ ),  $h(t)$  можно трактовать как частный случай функции интенсивности. В общем виде уравнение модели представляет собой произведение двух функций: базовой функции риска, одинаковой для всех наблюдений и зависящей только от времени, и экспоненты суммы изучаемых предикторов модели с соответствующими коэффициентами [9, 10]. Таким образом, это уравнение мультипликативно, т.е. эффект предикторов умножается на базовую функцию риска. Одним из основных допущений модели является условие пропорциональности рисков (т.е. риск наступления события для любых двух объектов в каждый интервал времени пропорционален, что свидетельствует о независимости его от времени).

Согласно Д. Коксу, если предположение о пропорциональной опасности верное, можно оценить размер эффекта без учета функции базовой опасности. Таким образом, очевидно, что пропорциональность рисков – основополагающий фактор, определяющий возможность применения этого метода [9]. Если это допущение о пропорциональности рисков не соблюдается, возможно применение регрессии Кокса с ковариатами, зависящими от времени [11].

Модель пропорциональных рисков Кокса является полупараметрической, поскольку не предполагает наличия априорной информации о базовой функции отказов (непараметрический компонент), однако определен вид (логлинейный) регрессионной функции (параметрический компонент). Если же определены оба компонента, то модель можно охарактеризовать как параметрическую (при этом ее часто именуют не моделью Кокса, а согласно распределению функции опасности: например, пропорциональных рисков Вейбулла, Гомперца и др.) [12].

В отличие от оценки Каплана – Мейера, регрессия Кокса моделирует функцию риска, а не выживаемость. Тем не менее она позволяет получить скорректированную оценку выживаемости. Данная модель не предполагает определение абсолютного риска, но может быть использована для оценки относительного риска. В качестве меры относительного риска выступает показатель «hazard ratio» (HR).

При таком анализе (Каплана – Мейера, Нельсона – Аалена и регрессионной модели Кокса)

исследователь учитывает только одно «событие интереса». При наступлении другого (конкурирующего) события, наблюдения цензурируются, т.е., иначе говоря, попросту не учитываются при дальнейшем анализе. В таком случае, чтобы оценка риска во времени была правильной, причина цензурирования должна быть независима от интересующего исхода (неинформативное цензурирование).

Иными словами, пациенты, подвергшиеся цензурированию в определенный момент времени, должны быть подвержены риску наступления события интереса так же, как и те пациенты, которые все еще наблюдаются в этот момент. В реальных условиях такое бывает редко. Больные в листе ожидания подвержены риску не только умереть, они могут быть исключены из ЛО по причине ухудшения коморбидного фона или в результате трансплантации почки. Смерть пациента в ЛО, например, исключает возможность трансплантации (событие интереса). Когда возникновение события, представляющего интерес, исключается другим событием, допущение независимости нарушается (информативное цензурирование). Эти события не являются полностью независимыми и называются конкурирующими, а риск их наступления – конкурирующим риском [13].

## АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПРИ НАЛИЧИИ КОНКУРИРУЮЩИХ РИСКОВ

Наиболее известные методы анализа конкурирующих рисков – это причинно-специфическая модель пропорциональных рисков Кокса (cause-specific Cox proportional hazards model), модель подраспределения пропорциональных рисков (subdistribution proportional hazards model), также известная как регрессионная модель конкурирующих рисков Файна и Грея (Fine and Gray competing risk regression model) и более сложные модели смеси.

Причинно-специфическая модель пропорциональных рисков Кокса. К концу 1970–1980-х гг. были созданы теоретические предпосылки, которые позволили предложить новые виды анализа выживаемости в условиях конкурирующих рисков [14]. Так, в 1978 г. R.L. Prentice и соавт. предложили использовать причинно-специфическую модель пропорциональных рисков Кокса [15]. Важно правильно интерпретировать результаты такого анализа. Функция риска конкретного события представляет собой мгновенную вероятность события  $k$  (например, смерти в листе ожидания) среди пациентов, которые дожили до

данного момента и не подверглись ни одному из конкурирующих событий (исключение из листа ожидания или трансплантация) [9]. Однако при таком подходе конкурирующие события игнорируются (цензурируются), поэтому непосредственно оценить влияние ковариат на их частоту невозможно, так как отсутствует прямая связь между регрессионными коэффициентами и интенсивностью событий.

Важной особенностью такого причинно-специфического подхода, реализуемого при помощи модели пропорциональных рисков Кокса, является то, что в отличие от метода Каплана – Мейера для получения достоверных оценок не требуется независимости конкурирующих событий. Однако важно понимать, что поскольку конкурирующие события рассматриваются как цензурированные наблюдения (как и в случае применения метода Каплана – Мейера), полученные оценки (причинно-специфический относительный риск – *cause-specific hazard ratio*) относятся к тем пациентам, у которых (еще) не произошло событие интереса или конкурирующее событие [16]. Оценки Каплана – Мейера, Нельсона – Аалена, как и регрессия Кокса, являются заведомо предвзятыми оценками выживаемости в условиях наличия конкурирующих рисков.

Регрессионная модель конкурирующих рисков. В 1999 г. Файн и Грей предложили подход, получивший значительную популярность, который основан на подраспределении функции риска (*hazard subdistribution*) – регрессионную модель конкурирующих рисков [17]. В этой модели коэффициенты регрессии монотонно связаны с кумулятивной функцией инцидентности (*cumulative incidence function, CIF*), и конкурирующие события оказывают непосредственное влияние на коэффициенты регрессии. Данный метод также предполагает пропорциональность рисков.

Подраспределение риска события  $k$  определяется как вероятность субъекта подвергнуться этому событию в бесконечно малом промежутке времени среди пациентов, у которых это событие еще не произошло, включая и тех пациентов, у которых произошло конкурирующее событие [9]. В модели конкурирующих рисков пациенты, у которых наступило конкурирующее событие, не цензурируются, а сохраняются в анализе (их присутствие при этом смягчается постепенно уменьшающимся весовым коэффициентом) [18, 19].

Существенное преимущество регрессии конкурирующих рисков Файна и Грея перед регрессией Кокса – это аддитивный характер функций кумулятивной инцидентности. Совокупная вероятность всех событий разделяется на составляющие

ее вероятности каждого события. Таким образом, в любой момент времени вероятность всех событий представляет собой сумму вероятностей событий, представляющего интерес, и вероятности конкурирующих событий. Поскольку существует прямая связь между ковариатами и кумулятивной функцией инцидентности, регрессионная модель конкурирующих рисков обеспечивает более точный индивидуальный прогноз на основе значения ковариат. Иными словами, она позволяет оценить вероятность каждого события, учитывая характеристики пациента [19].

Эта модель приобретает все большую популярность несмотря на то, что представлена в тяжелых для освоения пакетах – Stata, SAS, R и др. Примерами могут быть анализ риска утраты функции трансплантата (конкурирующее событие – смерть с функционирующим трансплантатом) [20], анализ вероятности трансплантации (конкурирующее событие – смерть в ЛО) [21, 22] или анализ факторов риска смерти у пациентов на перитонеальном диализе и гемодиализе (конкурирующее событие – смена модальности диализной терапии) [23].

Функция выживаемости (или риска) не всегда носит унимодальный характер и может быть описана при помощи классических статистических распределений. Если функция выживаемости носит мультимодальный характер, то параметрическая статистическая модель с приемлемой точностью может быть основана на сочетании двух (например, экспоненциальное и гамма, экспоненциальное и Вейбулла, гамма и Вейбулла) [24] или трех распределений (экспоненциальное, гамма, Вейбулла) [25]. Также были предложены более гибкие распределения времени выживания, например обобщенное трехпараметрическое гамма-распределение [26]. В случае гетерогенных данных при правильном подборе распределения параметрические модели обладают большей мощностью по сравнению с полупараметрическими – регрессией Кокса или Файна и Грея. При решении вопроса о правомочности использования параметрической регрессионной модели проверка на соответствие плотности распределения определенному закону обычно сводится к анализу распределения остатков модели при помощи одного из критериев согласия.

Альтернативные методы оценки выживаемости. Другой подход был предложен M.G. Larson и G.E. Dinse в 1985 г. В этом подходе конкурирующие риски анализируются путем выражения совместного распределения: маргинального распределения вероятности конкретного события  $K$

и условного распределения времени  $T$  до наступления соответствующего события:  $P(K, T) = P(x = K) \times P(T < t | x = K)$  [27]. Значение  $P(x = K)$  можно интерпретировать как вероятность, например, трансплантации (при этом сумма вероятностей трансплантации, исключения из ЛО и смерти в ЛО не может быть больше единицы), а площадь под условной функцией выживаемости  $1 - P(T < t | x = K)$  – как среднее время ожидания среди трансплантированных пациентов. Для оценки влияния интересующих ковариат на тип событий может быть использована полиномиальная логистическая регрессия, для оценки их влияния на время отказа (конкретного события) – параметрическая (кусочно-экспоненциальная) регрессионная модель пропорциональных рисков [14]. Авторы с успехом применили свою модель к анализу результатов трансплантации сердца, где событием интереса была смерть в результате отторжения трансплантата, а конкурирующим событием – смерть от других причин [27].

Похожий подход, но основанный на полупараметрической модели пропорциональных рисков, был предложен А.У.С. Кук в 1992 г. [28]. Также известен альтернативный подход – вертикальное моделирование, предложенный М.А. Николае и соавт. в 2010 г. В его основе лежит иной принцип факторизации совместного распределения вероятности конкретных событий и времени наступления этих событий. Это распределение может быть представлено как совместное распределение времени наступления каждого из событий и относительное распределение вероятности конкретного события в определенный момент:  $P(T, K) = P(T | t) \times P(x = K | t = T)$  [29, 30].

При трансплантации почек информация о среднем времени ожидания с учетом риска всех возможных (конкурирующих) событий представляет собой не только интерес для пациента, но и дает важную информацию доктору, позволяя выбрать оптимальный вариант лечения на данном этапе при конкретных обстоятельствах. Например, ждать хорошей совместимости или выполнить трансплантацию, учитывая совместимость по только HLA-DR локусу? То есть сделать индивидуальный прогноз, на основе которого выбрать подход, обеспечивающий наибольшую расчетную продолжительность жизни. Метод, предложенный М.Г. Larson и Г.Е. Dinse, лег в основу другого интересного исследования [31]. Авторы использовали параметрическую регрессионную модель смеси (parametric mixture regression model) для оценки долгосрочной вероятности двух конкурирующих событий: трансплантации

и смерти на диализе, а также среднего времени до каждого из этих событий с учетом различных факторов (возраст, группа крови, индекс массы тела, причина хронической болезни почек, наличие сахарного диабета, кардиоваскулярных и онкологических заболеваний, время на диализе, наличие анти-HLA антител, регион проживания и др.). Несмотря на существующий скепсис в отношении применимости регрессионных моделей для индивидуального прогноза, этот подход оказался весьма эффективным: валидация модели показала ее приемлемую точность [32]. При прогнозе на 5 лет площадь под ROC кривой составила 0,72 (95%-й ДИ 0,68; 0,76).

### ОСОБЕННОСТИ АНАЛИЗА ВЫЖИВАЕМОСТИ КАНДИДАТОВ НА ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ПОЧКИ

Следует отметить, что статистический анализ вероятности трансплантации (или смерти) в зависимости от времени ожидания в «листе ожидания» – редкий случай, когда анализ выживаемости применяется действительно для оценки времени до наступления события, а не для косвенной оценки рисков в зависимости от применяемого метода лечения. Крупные национальные регистры предоставляют обобщенную информацию о сроке ожидания трансплантации. Однако возможность индивидуального прогноза (а такой прогноз, с практической точки зрения, представляет наибольший интерес) сопряжена с двумя объективными трудностями.

Во-первых, среднее время ожидания определено для пациентов, получивших трансплантат, а не для всего пула пациентов в ЛО, подверженных также риску исключения и смерти. Чаще всего такой анализ проводится при помощи метода Каплана – Мейера, который позволяет оценить долю пациентов, которые все еще ожидают трансплантации в определенный момент времени. Однако пациенты, исключенные из ЛО не по причине трансплантации, подвергаются цензурированию или вовсе не учитываются при расчете времени ожидания. Определение медианного времени ожидания на основе такого анализа порождает смещение отбора, что неизбежно приводит к предвзятой оценке, поскольку он не принимает во внимание важный факт, что значительная доля кандидатов не подвергнется трансплантации [33], а, например, половина кандидатов старше 60 лет умрет до трансплантации [34].

Во-вторых, время ожидания трансплантации может варьироваться в широких пределах, что определяется совокупностью индивидуальных факторов (группа крови, HLA-фенотип, иммунизация



против HLA, особенности трансплантационного центра и др.). Это требует субъективной интерпретации результатов эпидемиологических исследований, целью которых, как правило, является не индивидуальный прогноз, а выявление факторов, связанных с увеличением срока ожидания трансплантации или смерти до трансплантации.

При изучении этиологических ассоциаций (причинной-следственной связи различных факторов и исхода) лучше использовать регрессионную модель Кокса, которая позволяет оценить размер эффекта различных факторов. Регрессионная модель конкурирующих рисков Файна и Грея, в свою очередь, имеет большую прогностическую ценность и позволяет оценить вероятность конкретного исхода в течение определенного времени у отдельно взятого пациента [9, 16, 35]. Тем не менее как этиологический, так и прогностический аспекты трудно разделить, когда целью является информирование пациентов в условиях конкурирующих рисков. Важно учитывать не только средний срок ожидания трансплантата, но и вероятность трансплантации как таковой, а также вероятности других событий.

Исторически сложилось так, что функция кумулятивной инцидентности отражает информацию, вторичную по отношению к выживаемости или функции риска. Важно понимать разницу между этими методами, поскольку они дают разные по сути оценки и, соответственно, требуют различной интерпретации. Если первый подход фокусируется на влиянии ковариат на риск конкретного события, то второй является более описательным и делает акцент на вероятности каждого из событий. Для лучшего понимания различий этих методов важно помнить, что определенный показатель может увеличивать инцидентность конкретного события, снижая инцидентность других событий, не влияя непосредственно на интенсивность события интереса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ выживаемости может быть выполнен с использованием разных методов, каждый из которых предназначен для определенных задач, имеет свои преимущества, недостатки и ограничения. Использование оптимального в каждом конкретном случае подхода обеспечит наибольшую объективность исследования.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kaplan E.L., Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958; 53 (282): 457–481.
2. Stel V.S., Dekker F.W., Tripepi G., Zoccali C., Jager K.J. Survival analysis I: the Kaplan – Meier method. *Nephron Clin. Pract.* 2011; 119 (1): c83–88. DOI: 10.1159/000324758.
3. Hobbs B.P. On nonparametric hazard estimation. *J. Biom. Biostat.* 2015; 6 (2): 232. DOI: 10.4172/2155-6180.1000232.
4. Xian Liu. Survival analysis: models and applications. John Wiley & Sons, 2012: 457.
5. Colosimo E., Ferreira F., Oliveira M., Sousa C. Empirical comparisons between Kaplan – Meier and Nelson – Aalen survival function estimators. *J. Stat. Comput. Simul.* 2002; 72 (4): 299–308. DOI: 10.1080/00949650212847.
6. Saranya P., Karthikeyan S.M. A comparison study of Kaplan – Meier and Nelson – Aalen methods in survival analysis. *International Journal for Research in Emerging Science and Technology.* 2015; 2 (11): 34–38.
7. Cox D.R. The regression analysis of binary sequences. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological).* 1958; 20 (2): 215–242.
8. Cox D.R. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B.* 1972; 34 (2): 187–220.
9. Austin P.C., Lee D.S., Fine J.P. Introduction to the analysis of survival data in the presence of competing risks. *Circulation.* 2016; 133 (6): 601–609. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017719.
10. Stel V.S., Dekker F.W., Tripepi G., Zoccali C., Jager K.J. Survival analysis II: Cox regression. *Nephron Clin. Pract.* 2011; 119 (3): c255–260. DOI: 10.1159/000328916.
11. Austin P.C. Generating survival times to simulate Cox proportional hazards models with time-varying covariates. *Stat. Med.* 2012; 31 (29): 3946–3958. DOI: 10.1002/sim.5452.
12. Gao H., Liu Y., Zhang T., Yang R., Prows D.R. Parametric proportional hazards model for mapping genomic imprinting of survival traits. *J. Appl. Genet.* 2013; 54 (1): 79–88. DOI: 10.1007/s13353-012-0120-2.
13. Wolbers M., Koller M.T., Stel V.S., Schaer B., Jager K.J., Leffondry K., Heinze G. Competing risks analyses: objectives and approaches. *Eur. Heart J.* 2014; 35 (42): 2936–2941. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu131.
14. Haller B., Schmidt G., Ulm K. Applying competing risks regression models: an overview. *Lifetime Data Anal.* 2013; 19 (1): 33–58. DOI: 10.1007/s10985-012-9230-8.
15. Prentice R.L., Kalbfleisch J.D., Peterson A.V.Jr., Flournoy N., Farewell V.T., Breslow N.E. The analysis of failure times in the presence of competing risks. *Biometrics.* 1978 Dec.; 34 (4): 541–554.
16. Noordzij M., Leffondry K., van Stralen K.J., Zoccali C., Dekker F.W., Jager K.J. When do we need competing risks methods for survival analysis in nephrology? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013; 28 (11): 2670–2677. DOI: 10.1093/ndt/gft355.
17. Fine J.P., Gray R.J. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.* 1999; 94 (446): 496–509.
18. Dianatkah M., Rahgozar M., Talaei M., Karimloua M., Sadeghi M., Oveisgharan S., Sarrafzadegan N. Compar-

- ison of competing risks models based on cumulative incidence function in analyzing time to cardiovascular diseases. *ARYA Atheroscler.* 2014; 10 (1): 6–12.
19. Andersen P.K., Geskus R.B., de Witte T., Putter H. Competing risks in epidemiology: possibilities and pitfalls. *Int. J. Epidemiol.* 2012 June; 41 (3): 861–870. DOI: 10.1093/ije/dyr213.
  20. Arce C.M., Lenihan C.R., Montez-Rath M.E., Winkelmayer W.C. Comparison of longer-term outcomes after kidney transplantation between Hispanic and non-Hispanic whites in the United States. *Am. J. Transplant.* 2015; 15 (2): 499–507. DOI: 10.1111/ajt.13043.
  21. Sapir-Pichhadze R., Pintilie M., Tinckam K.J., Laupacis A., Logan A.G., Beyene J., Kim S.J. Survival analysis in the presence of competing risks: The example of waitlisted kidney transplant candidates. *Am. J. Transplant.* 2016 July; 16 (7): 1958–1966. DOI: 10.1111/ajt.13717.
  22. Arce C.M., Goldstein B.A., Mitani A.A., Lenihan C.R., Winkelmayer W.C. Differences in access to kidney transplantation between Hispanic and non-Hispanic whites by geographic location in the United States. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2013; 8 (12): 2149–2157. DOI: 10.2215/CJN.01560213.
  23. Kim H., An J.N., Kim D.K., Kim M.H., Kim H., Kim Y.L., Park K.S., Oh Y.K., Lim C.S., Kim Y.S., Lee J.P. CRC for ESRD investigators. Elderly peritoneal dialysis compared with elderly hemodialysis patients and younger peritoneal dialysis patients: Competing risk analysis of a Korean prospective cohort study. *PLoS One.* 2015; 10 (6): e0131393. DOI: 10.1371/journal.pone.0131393.
  24. Erişoğlu Ü., Erişoğlu M., Erol H. A mixture model of two different distributions approach to the analysis of heterogeneous survival data. *International Journal of Computational and Mathematical Sciences.* 2011; 5 (2): 75–79.
  25. Yusuf Abbakar Mohammed, Bidin Yatim, Suzilah Ismail. A parametric mixture model of three different distributions: An approach to analyse heterogeneous survival data. *AIP Conference Proceedings.* 2014: 1605–1040. DOI: 10.1063/1.4887734.
  26. Lau B., Cole S.R., Moore S.R., Gange S.J. Evaluating competing adverse and beneficial outcomes using a mixture model. *Stat. Med.* 2008; 27 (21): 4313–4327. DOI: 10.1002/sim.3293.
  27. Larson M.G., Dinse G.E. A mixture model for the regression analysis of competing risks data. *J. of the Royal Stat. Soc. Ser. C.* 1985; 34: 201–211.
  28. Kuk A.Y.C. A semiparametric mixture model for the analysis of competing risks data. *Austral. J. Statist.* 1992; 34: 169–180.
  29. Nicolaie M.A., van Houwelingen H.C., Putter H. Vertical modeling: a pattern mixture approach for competing risks modeling. *Stat. Med.* 2010; 29 (11): 1190–1205. DOI: 10.1002/sim.3844.
  30. Nicolaie M.A., Taylor J.M.G., Legrand C. Vertical modeling: analysis of competing risks data with a cure fraction. *Lifetime Data Anal.* 2019; 25 (1): 1–25. DOI: 10.1007/s10985-018-9417-8.
  31. Trébern-Launay K., Kessler M., Bayat-Makoei S., Quirard A.H., Brianzon S., Giral M., Foucher Y. Horizontal mixture model for competing risks: a method used in waitlisted renal transplant candidates. *Eur. J. Epidemiol.* 2018; 33 (3): 275–286. DOI: 10.1007/s10654-017-0322-3.
  32. Andersen P.K., Keiding N. Interpretability and importance of functionals in competing risks and multistate models. *Stat. Med.* 2012; 31 (11–12): 1074–1088. DOI: 10.1002/sim.4385.
  33. Hart A., Smith J.M., Skeans M.A., Gustafson S.K., Wilk A.R., Robinson A., Wainright J.L., Haynes C.R., Snyder J.J., Kasiske B.L., Israni A.K. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Kidney. *Am. J. Transplant.* 2018; 18 Suppl. 1: 18–113. DOI: 10.1111/ajt.14557.
  34. Schold J., Srinivas T.R., Sehgal A.R., Meier-Kriesche H.U. Half of kidney transplant candidates who are older than 60 years now placed on the waiting list will die before receiving a deceased-donor transplant. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 4 (7): 1239–1245. DOI: 10.2215/CJN.01280209.
  35. Lau B., Cole S.R., Gange S.J. Competing risk regression models for epidemiologic data. *Am. J. Epidemiol.* 2009; 170 (2): 244–256. DOI: 10.1093/aje/kwp107.

## Сведения об авторе

Зулькарнаев Алексей Батыргараевич, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, хирургическое отделение трансплантологии и диализа, МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

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

## Author information

Zulkarnaev Alexey B., DM, Principal Researcher, Surgical Department of Transplantation and Dialysis, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation.

(✉) Zulkarnaev Alexey B., e-mail: 7059899@gmail.com

Поступила в редакцию 05.12.2018  
Подписана в печать 10.06.2019

Received 05.12.2018  
Accepted 10.06.2019

## Принципы и опыт применения роботизированных реабилитационных технологий у пациентов после инсульта

Королева Е.С., Алифирова В.М., Латыпова А.В., Чебан С.В., Отт В.А.,  
Бразовский К.С., Толмачев И.В., Бразовская Н.Г., Сёмкина А.А., Катаева Н.Г.

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

### РЕЗЮМЕ

Обзор литературы посвящен изучению последних достижений в области нейрореабилитации с использованием роботизированных технологий. Цель – изучить опыт применения, клиническую эффективность и влияние на молекулярные механизмы нейропластичности роботизированных реабилитационных технологий у пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения. Осуществлялся поиск по ключевым словам в базах данных Web of Science, Core Collection, Scopus, Pubmed по зарубежным журналам.

Роботизированная нейрореабилитация занимает определенное место в комплексной реабилитации больных с моторным дефицитом после острых нарушений мозгового кровообращения. Особенно важными в использовании реабилитационных методов, имплементирующих передовые достижения робототехники и информационных технологий, являются междисциплинарный пациент-ориентированный подход и преемственность на всех этапах лечебно-восстановительного лечения больных после инсульта. Реабилитация с применением высокотехнологичных компьютеризированных реабилитационных комплексов, работающих в режиме биологической обратной связи, является одним из перспективных направлений и требует дальнейшего проведения нейробиологических и лабораторных исследований для создания научно обоснованных методических подходов, что позволит добиться ощутимого экономического эффекта от повышения качества нейрореабилитации, уменьшения времени на ее проведение и будет иметь огромную социальную значимость.

**Ключевые слова:** инсульт, нейрореабилитация, роботизированные реабилитационные технологии, нейропластичность, биологическая обратная связь, принцип двигательного научения, экзоскелеты.

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

**Источник финансирования.** Обзор подготовлен в рамках выполнения гранта РНФ «Разработка научных основ роботизированной нейромиеореабилитации» (№ 18-15-00082 173).

**Для цитирования:** Королева Е.С., Алифирова В.М., Латыпова А.В., Чебан С.В., Отт В.А., Бразовский К.С., Толмачев И.В., Бразовская Н.Г., Сёмкина А.А., Катаева Н.Г. Принципы и опыт применения роботизированных реабилитационных технологий у пациентов после инсульта. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 223–233. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-223–233](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-223-233).

УДК 616.831-005.1-085.82:681.5

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-223-233>

## Principles and global experience of applying robotic rehabilitation technologies in patients after stroke

Koroleva E.S., Alifirova V.M., Latypova A.V., Cheban S.V., Ott V.A.,  
Brazovskiy K.S., Tolmachev I.V., Brazovskaya N.G., Semkina A.A., Kataeva N.G.

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

### ABSTRACT

This literature review is devoted to the study of recent advances in the field of neurorehabilitation using robotic technologies.

Objective: to study best practices of applying robotic rehabilitation technologies in stroke patients, its clinical efficacy and influence on the molecular mechanisms of neuroplasticity.

Keywords were searched in the Web of Science, Core Collection, Scopus and PubMed databases.

**Results.** Robotic neurorehabilitation occupies a certain place in the comprehensive rehabilitation of patients with motor deficiency after stroke. An interdisciplinary patient-oriented approach and consistency at all stages of medical rehabilitation are especially important when using rehabilitation methods that implement advances in robotics and information technologies in patients after stroke. Rehabilitation with the use of high-tech computerized rehabilitation systems operating in the biofeedback mode is one of the promising areas and requires further neurophysiological and laboratory studies to create scientifically based methodological approaches. It will have great social significance and tangible economic effects from improving the quality of neurorehabilitation and reducing its duration.

**Keywords:** stroke, neurorehabilitation, robotic rehabilitation technologies, neuroplasticity, biological feedback, the principle of motor learning, exoskeletons.

**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 review was supported by the grant of the Russian Science Foundation “Developing the scientific foundations of robotic neurorehabilitation” (No. 18-15-00082 173).

**For citation:** Koroleva E.S., Alifirova V.M., Latypova A.V., Cheban S.V., Ott V.A., Brazovskiy K.S., Tolmachev I.V., Brazovskaya N.G., Semkina A.A., Kataeva N.G. Principles and global experience of applying robotic rehabilitation technologies in patients after stroke. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 223–233. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-223-233>.

### ВВЕДЕНИЕ

Инсульт – это гетерогенное состояние с двумя основными подтипами: ишемическим и геморрагическим. По данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире регистрируют до 15 млн инсультов в год. Количество больных с тяжелым инвалидизирующим резидуальным неврологическим дефицитом после инсульта, требующих особых условий для выживания и специальных методов реабилитации, ежегодно увеличивается на 5 млн человек и в настоящее время составляет около 4% населения мира –

примерно 150 млн человек. Подсчитано, что этот показатель будет увеличиваться и возрастет на 12% к 2030 г. [1–3].

Реабилитация неврологических пациентов всегда была и остается одним из наиболее сложных и затратных этапов лечебно-восстановительных мероприятий, связанным с привлечением значительных человеческих ресурсов на каждого пациента с двигательными нарушениями. По эпидемиологическим данным 2016 г., расходы на лечение неврологических больных достигают до 20% всех затрат на здравоохранение России. В структуре мировой стоимости лечения стои-

мость реабилитации неврологических больных после перенесенных острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) составляет 23% [4]. По современным прогнозам, восстановительное лечение с использованием роботизированных комплексов поможет снизить затраты здравоохранения на данную категорию пациентов не менее, чем на 25% [5].

Именно с этой точки зрения среди физических методов восстановительного лечения в XXI в. на первое место выходят современные методы нейрореабилитации, имплементирующие передовые достижения робототехники и информационных технологий.

## РОБОТИЗИРОВАННАЯ НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИЯ

Высокотехнологичные компьютеризированные реабилитационные комплексы, работающие в режиме биологической обратной связи, во всем мире являются приоритетным направлением двигательной реабилитации больных после ишемического инсульта в последние 20 лет. Рациональность их использования обусловлена возможностью проведения стандартизированных тренировочных сессий с одновременной информацией о биологическом ответе на физические аспекты проводимого тренинга и его эффектах, т.е. с информацией о прогрессе восстановления функций, что важно для принятия клинических решений и дизайна рандомизированных исследований [6]. В отличие от традиционных реабилитационных подходов, роботизированные комплексы полностью удовлетворяют таким основополагающим принципам нейрореабилитации, как раннее начало, систематичность, длительность, комплексность, мультидисциплинарность, социальная направленность, активное участие в реабилитационном процессе самого больного, использование методов адекватного контроля и эффективности, лучший профиль безопасности для пациента и меньшая механическая трудоёмкость для медицинского персонала [5, 7].

Восстановление двигательных функций конечностей после ОНМК происходит нелинейно. Максимальный регресс моторного дефицита возможен в первые 3 мес после инсульта и, очевидно, связан с комбинацией процессов компенсации, субституции и реституции функций, обусловленных двигательным обучением в подострый период болезни [8]. Роботизированные технологии позволяют начать функциональную целенаправленную тренировку раньше, по сравнению с традиционными реабилитационными подходами,

способны обеспечить достаточную интенсивность процесса, адекватный афферентный feedback и эффективно применяются при восстановлении функций руки и ходьбы [9]. Восстановление в первые 3 мес после инсульта является важным фактором, который может интерферировать с оценкой эффективности нейрореабилитационных мероприятий, тогда как дальнейший регресс моторного дефицита связан с адаптационными стратегиями [10].

Использование роботизированных комплексов в неврологической реабилитации позволяет оптимизировать объективную оценку состояния пациента и эффективность тренировок. Роботы обеспечивают не только достаточную повторяемость движений, но и регуляцию необходимого уровня сложности тренировки для каждого конкретного пациента за счет биологической обратной связи с целью сохранения баланса между желательными и нежелательными эффектами терапии и создания оптимальных условий для обучения и восстановления моторных навыков [11, 12].

К роботизированным устройствам с доказанной эффективностью относятся MIT-MANUS, ARM Trainer, mirror-image motion enable (MIME) robot, Armeo для восстановительного лечения верхней конечности; Erigo, Lokomat, Lokohelp, Rehabot, Gait Trainer, Lopes – для механотерапии нижней конечности. По состоянию на июнь 2009 г. в мире уже насчитывается около 240 роботов Lokomat, производимых в Швейцарии и являющихся наиболее изученными роботизированными комплексами. В 2010 г. в Италии появилась система BTS ANYMOV – роботизированная больничная койка для функциональной реабилитации пациентов, перенесших инсульт, позволяющая проводить тренировки, построенные на плавных, пассивных упражнениях [8, 13].

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБРАТНАЯ СВЯЗЬ И ПЛАСТИЧНОСТЬ МОЗГА

Основной принцип неврологической реабилитации – принцип двигательного научения. Важным фактором научения является повторение.

Двигательное научение представляет собой двигательную адаптацию, основанную на коррекции ошибок между заданными и фактически выполненными движениями, возможную за счет биологической обратной связи. Двигательная адаптация осуществляется в течение минут – часов, прекращение тренировок или изменение условий их проведения приводит к «забыванию» адаптаций за относительно короткие периоды времени [14–16]. Для закрепления в памяти

головного мозга двигательного акта необходимо сделать упражнение не менее 400 раз, что можно обеспечить только роботизированными системами. Выделяют также ассоциативное научение и имплицитное двигательное научение, происходящее после повторения новых двигательных навыков [17, 18].

Обучение простым и сложным двигательным актам пациентов после ОНМК с использованием современных роботизированных комплексов индуцирует пластичность нейронов двигательной коры больших полушарий мозга за счет внешнего стимулирующего воздействия. Именно способность центральной нервной системы к длительной или постоянной модификации функций или структурной реорганизации ее элементов является основополагающим механизмом в способности мозга к научению [19–22].

Адаптивное поведение, обучение и память находятся на вершине иерархии многоуровневой системы нейропластичности. В основании же пирамиды заложены молекулярные взаимодействия на клеточных и синаптических уровнях, а также уровень нейронных сетей.

Клеточным эквивалентом обучения является изменение нейрональной структуры и силы синаптической передачи, отраженных в феноменах долговременной потенциации (ДВП) и долговременной депрессии (ДВД), в основе которых лежит стимуляция экспрессии генов первичной моторной коры мозга с последующим синтезом синаптических белков. При этом синтез нейротрофических факторов имеет место не только во время тренировки, но и в период отдыха, что отражает процессы консолидации [23]. Гены, индуцируемые двигательным обучением – *immediateearly genes* (IEG, факторы транскрипции), экспрессируются в моторной коре полушарий только во время обучения двигательным навыкам [24].

ДВП и ДВД по сути являются клеточными механизмами памяти. ДВП стимулируется высококачественным повторением или синхронизацией двух сигналов, конвергирующих на одном нейроне, и потенциально отражает феномен ассоциативного научения и повышения эффективности нейрональных синаптических связей. ДВД стимулируется низкочастотным повторением и ведет к долговременной редукции силы синаптической передачи. Эти процессы активно протекают в двигательной коре головного мозга и играют роль в обучении двигательным навыкам [25, 26].

Параллельно с синаптической пластичностью происходит реорганизация нейрональных сетей,

удлиняются апикальные и базальные дендриты [27].

Все виды двигательного научения зависят от функционирования и взаимодействия нейронных систем, а не отдельных структур. Изменение кортикальной репрезентации зон при двигательном научении представляет собой системную пластичность. В начале обучения имеет место захват больших прилежащих зон коры. При отработке навыка происходит сокращение площади активации и возникает более сфокусированная активность.

Эффекты любых двигательных заданий зависят от достаточной проприоцептивной обратной связи, участвующей в реорганизации нейронных сетей внутри спинного мозга [28]. Это чаще всего достигается путем функционального тренинга. Доказано, что нейрональная дисфункция ниже очага инсульта усиливается при отсутствии использования локомоторных зон. Параллельная стимуляция мышц и кортикальных зон эффективна в восстановлении утраченных функций [29].

Таким образом, механизмы нейропластичности ведут к формированию следов двигательной памяти, используемых в процессе обучения и лежащих в основе реализации биологических обратных связей, формирующихся в биотехнической системе «пациент – реабилитационный комплекс».

Оценить состояние головного мозга на основе его электрической активности во время проведения реабилитационных мероприятий при помощи компьютерных программ на сегодняшний день позволяет метод электроэнцефалографической (ЭЭГ) биологической обратной связи [30, 31].

Система искусственного интеллекта – интерфейс «мозг – компьютер» (BCI) может распознавать определенный набор паттернов биологических потенциалов головного мозга и обеспечивать коммуникацию человека с окружающей средой посредством передачи ЭЭГ-сигналов на внешние исполнительные устройства, такие как компьютеры, синтезаторы речи, протезы, без вовлечения периферического нервно-мышечного аппарата [31]. Долгое время направление считалось бесперспективным ввиду сложности обработки ЭЭГ-сигналов из-за высокой вариабельности активности мозга и высоких требований к технологическому обеспечению.

В настоящее время активно исследуются потенциальные положительные эффекты транскраниальной магнитной стимуляции, применяемой одновременно с роботизированной терапией, ассоциированные с увеличением амплитуды дви-

гательных вызванных потенциалов и снижением интракорткального ингибирования. Сочетание методик в долгосрочном наблюдении при курсовом воздействии показало сохранение модулирующего эффекта [32].

В процессе нормального двигательного обучения нервная система не сталкивается с проявлениями нейромышечных нарушений – изменением тонуса мышц, мышечной слабостью и поврежденными или разбалансированными сенсорными системами. Головной мозг не контролирует мышцы напрямую, а координирует соответствие кинематическим спецификациям, корректируя мышечную активность для обеспечения оптимального движения. Это демонстрирует необходимость фокусировки реабилитационных воздействий не на отдельных мышцах и увеличении их силы, а на движениях и двигательном обучении [14]. Эти цели стоят перед современными роботизированными технологиями с ВСИ и адаптивными алгоритмами, позволяющими сочетать антигравитационную поддержку паретичной конечности, встроенный механизм корректировки движения и функции дополненной реальности для приближения тренировок к условиям повседневной жизни.

## МИРОВОЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РОБОТИЗИРОВАННЫХ КОМПЛЕКСОВ

Первый робот MIT Manus (Interactive Motion Technologies, США) для тренировки мышц проксимальных отделов верхней конечности был создан в Массачусетском технологическом институте в середине 1990-х гг. Клиническое исследование с участием 96 пациентов после 2 нед от начала инсульта доказало эффективность 5-недельной терапии в режиме одночасовых тренировочных сессий (1 500 повторений целенаправленных движений за период тренировки) 5 дней в неделю [33].

В 2000 г. ученые Стэнфордского университета представили первую модель бимануального робота MIME (Mirror Image Motion Enabler, США), имеющего четыре режима тренировки и обеспечивающего шесть степеней свободы движений предплечья с ориентацией в трехмерном пространстве. При этом паретичная рука имитировала действие здоровой руки. В рандомизируемых контролируемых исследованиях показано улучшение моторных возможностей верхней конечности по шкале функциональной независимости (Functional Independence Measurement, FIM) у пациентов с гемипарезами после ишемического инсульта давностью более 6 мес, проходив-

ших тренировки в режиме 1 ч в день в течение 2 мес [34].

В 2006–2008 гг. в Медицинском центре по делам ветеранов (штат Нью-Мексико, США) 127 пациентов с парезами верхних конечностей (7–38 баллов по шкале Fugl – Meyer (Fugl – Meyer Assessment, FMA) через 6 мес после ишемического инсульта приняли участие в многоцентровом рандомизированном контролируемом исследовании эффективности применения робота MIT Manus в сравнении с общепринятыми методами реабилитации. Роботизированная система состояла из четырех модулей для изолированных проксимальных, дистальных и интегрированных движений верхней конечности. Интенсивные одночасовые сеансы терапии с MIT Manus (1 024 движения за сеанс) за 12 нед (всего 36 сеансов) не значительно улучшили моторную функцию верхней конечности по сравнению с традиционными реабилитационными подходами (разница по шкале FMA 0,14 пункта). Однако результаты оказались заметны в течение 36-недельного курса тренировок, что говорит о потенциальных долгосрочных преимуществах роботизированной реабилитации [35].

Вместе с тем не получено убедительных данных, что включение роботов в реабилитацию больных, перенесших инсульт, в конечном счете улучшает их ежедневную двигательную активность. Оценка функциональных способностей верхней конечности с помощью индекса ADL (Activities of daily living) в проведенных исследованиях не отражала степени восстановления руки.

В 2009 г. в Италии рандомизированное контролируемое исследование эффективности роботизированного комплекса MIT-MANUS/InMotion 2, имеющего две поступательные степени свободы (абдукция / аддукция в плечевом суставе и сгибание / разгибание в локте), оценивало эффективность 30 сессий роботизированной терапии в сравнении с 30 занятиями стандартной физиотерапией у 53 пациентов в подостром периоде инсульта (до 30 сут от начала). Оценка результатов общего пассивного объема движений плеча и локтя показала клинические улучшения по шкале FMA и модифицированной шкале Ashworth (Modified Ashworth Scale, MAS) в обеих группах в конце лечения, продемонстрировав статистически значимое преимущество роботизированной реабилитации на ранней стадии восстановительного лечения. Это доказывает способность роботов эффективно улучшать моторную функцию верхней конечности в более короткие сроки по сравнению с обычной интенсивной физиотерапией [36].



Рандомизированное контролируемое исследование, проводимое на базе нескольких реабилитационных центров в Италии в 2014–2015 гг. с участием 54 пациентов после ишемического инсульта с выраженным двигательным дефицитом верхней конечности, продемонстрировало хорошие результаты лечения с использованием роботизированного интерфейса ARMEOSpring (Носота, Швейцария). Курс пассивной мобилизации верхней конечности с помощью робота оказался столь же эффективным, как и традиционная нейрореабилитация при оценке сразу после проведенного лечения, и значительно эффективнее по оцениваемым параметрам через 6 мес после окончания терапии [37].

В 2016 г. в госпитале Университета Фукуока (Япония) изучали эффективность нейрореабилитации у 19 пациентов в остром периоде инсультов с использованием нескольких видов гибридных роботов HAL (Hybrid assistive limb) (Cyberdyne, Япония). Оценка функциональных исходов тренировок по шкале FIM показала, что использование нескольких типов роботов HAL для механотерапии верхней конечности более эффективно по сравнению с аналогичным количеством занятий в тех же самых режимах (в течение 14 дней) с одним видом гибридного робота для верхней конечности [38].

В 2017 г. были опубликованы результаты когортного исследования роботизированного тренинга, направленного на отработку функционально значимых движений руки (поднесение руки ко рту, попадание в цель против гравитации) у пациентов с легкими и умеренными парезами верхних конечностей в хронической фазе инсульта, проведенным при поддержке Института промышленных технологий и автоматизации (г. Милан, Италия). Двенадцать тренировочных сессий отработки указанных движений по 20 мин с ассистированием роботизированного интерфейса при активном участии пациента было доказательно эффективно при оценке по шкале FMA (прирост в среднем на  $7,2 \pm 3,9$  баллов,  $p < 0,008$ ) [39].

С 2014 по 2016 г. в РНИМУ им. Н.И. Пирогова (г. Москва) проведено плацебо-контролируемое многоцентровое клиническое исследование эффективности использования экзоскелета верхней конечности и BCI у 74 пациентов после ОНМК (по шкале MAS – 4 балла). Добавление контроля BCI, обеспечивающего сенсорную обратную связь активности головного мозга, к физиотерапии с помощью экзоскелета (в режиме 10 тренировок по 40 мин каждая) привело к восстановлению двигательной функций верхних ко-

нечностей в группах пациентов как с подострой, так и с хронической фазой инсульта [40].

В 2017 г. группа ученых Исследовательского центра нейромоторной и когнитивной реабилитации Университета Вероны (Италия) провела изучение эффективности пассивной двусторонней роботизированной реабилитации верхних конечностей (R-BAT) с регистрацией биологической обратной связи с помощью ЭЭГ и электромиографии у семи амбулаторных пациентов в хроническом периоде ишемического инсульта (по шкале MAS > 4 баллов). BAT (Bilateral arm training) – это форма обучения, при которой обе верхние конечности выполняют одни и те же движения одновременно в различных модальностях (активное / пассивное) и независимо друг от друга. R-BAT разработана для выполнения движений в дистальных отделах верхней конечности, которые необходимы пациенту в повседневной жизни. Тренировки в режиме по 50 мин (800 двигательных повторений) 3 раза в неделю (всего 21 тренировка) оказались эффективными при оценке спастичности верхней конечности по шкалам FMA и MAS через 1 мес после окончания курса. Положительный эффект терапии был ассоциирован с изменением кортикальной осцилляторной активности на ЭЭГ. Других реабилитационных процедур во время исследования пациенты не получали [30].

Стереотипные движения верхней конечности за счет компенсаторных двигательных актов в проксимальных суставах обычно наблюдаются у большинства людей после ОНМК. Восстановить двигательную функцию в дистальных отделах руки гораздо сложнее. Одной из проблем роботизированных комплексов для реабилитации верхней конечности является сосредоточенность на крупных суставах (плечевом, локтевом), при этом недостаточно исследований эффективности роботизированного тренинга для восстановления функции пальцев кисти.

Группой исследователей в Университете Гонконга (Китай) в 2013 г. был разработан экзоскелет верхней конечности с пятью линейными приводами, позволяющий совершать сгибательные и разгибательные движения в межфаланговых суставах, с датчиками для регистрации сигналов биологической обратной связи с периферического нервно-мышечного аппарата на каждый палец. В 2014–2015 гг. 19 пациентам с длительностью инсульта 6–24 мес ( $50 >$  по шкале FMA > 20 баллов) были проведены 20 одночасовых тренировочных занятий с частотой 3–5 раз в неделю. После курса роботизированной реабилитации

участники исследования продемонстрировали лучшие результаты восстановления двигательной функции кисти со значимыми различиями по клиническим и функциональным шкалам по сравнению с контрольной группой, получавшей терапию CIMT (Constraint-induced movement therapy). CIMT – метод физической реабилитации с доказанной эффективностью, основанный на ограничении движений в здоровой руке и заставляющий больного использовать паретичную конечность для выполнения действий. Кроме того, за время роботизированных тренировок количество повторений у пациентов возросло в среднем с  $80,56 \pm 23,23$  движений во время первой сессии до  $109,11 \pm 9,41$  повторений на последней сессии ( $p = 0,004$ ). Однако по результатам наблюдения, через 6 мес после реабилитации межгрупповые различия оказались незначительными и, вероятнее всего, реабилитация с помощью роботов должна применяться в сочетании с CIMT [41].

В 2017 г. в Китае была разработана гибридная система NMES-роботов (Neuromuscular electrical stimulation) для многоцелевой (движения в локтевом и лучезапястном суставе, захват кисти) координированной физической реабилитации верхней конечности. Клинические исследования проводились на 11 пациентах после ОНМК и включали 20 занятий с интенсивностью тренировки 3–5 сеансов в неделю длительностью по 1,5 ч. NMES – это метод, позволяющий генерировать движения в паретичной конечности, увеличить мышечную силу и предотвратить атрофию мышц путем их стимуляции электрическим током. Сама по себе стимуляция мышц реализует биологическую обратную связь с головным мозгом во время мышечного сокращения и облегчает следующее движение. Но для динамических и координированных движений необходимы кинематическая точность, заданная траектория и определенная скорость. Да и мышечная сила может оказаться недостаточной для выполнения полноценного двигательного акта, а интенсивная стимуляция вызывает мышечную усталость. ЭМГ-управляемая NMES-роботизированная система позволяет контролировать движения и доказанно улучшает моторную функцию верхней конечности за счет снижения спастического мышечного тонуса и увеличения объема движений в лучезапястном суставе и пальцах кисти, координирования работы мышц проксимальных и дистальных отделов руки [42].

Существует мнение, что роботизированная помощь снижает собственные усилия пациента, чем затрудняет двигательное научение. Опреде-

лить терапевтический эффект роботизированной тренировки пальцев кисти с различным уровнем ассистирования при выполнении тренировочных движений являлось ключевой задачей исследователей из Калифорнии (США). В 2017 г. 30 пациентов с хронической стадией инсульта и умеренным гемипарезом (по шкале FMA ( $46 \pm 12$ ) баллов) выполняли целенаправленные движения указательным и средним пальцами по направлению к цели в режиме 3 ч в неделю в течение 3 нед. В течение девяти тренировок каждый участник выполнил 8 000 движений. Первая группа получала интенсивную роботизированную поддержку, что обеспечивало 82% вероятности попадания в цель и, в отличие от второй группы с низким уровнем механического ассистирования, сопровождалось повышенной мотивацией для пациентов и улучшением исходов по шкале FMA. Доказательно опровергая вышеизложенное мнение, исследование демонстрирует важность не только физических, но и психологических аспектов нейрореабилитации в моделировании двигательного научения и сохранении достигнутого результата [8].

Мета-анализ 34 клинических исследований, проводимых по всему миру с 1990 по 2015 г., показал, что устройства для роботизированной тренировки верхних конечностей улучшают функциональные возможности руки по индексу ADL. Однако уровень доказательности в сравнении с другими реабилитационными мероприятиями оказался низким. Авторы пришли к выводу, что преимущества изолированной роботизированной терапии не могут быть клинически значимыми [43].

Пациенты в большинстве случаев получают роботизированную терапию в стационаре по регламентированному графику. Использование роботизированных комплексов в домашней среде обеспечит эффективное участие паретичной конечности в повседневных действиях пациентов. Это послужило толчком к созданию легких и износостойчивых переносных экзоскелетов верхней конечности. Устройство HandSOME (Hand Spring Operated Movement Enhancer, США), обеспечивающее захват кистью как мелких, так и крупных предметов, доказало свою эффективность в качестве реабилитационного метода после инсульта, а также ортопедического комплекса у пациентов с полной утратой функций верхней конечности (рис. 1) [43].

Клинические испытания экзоскелета Spring Wear (США), обеспечивающего пронацию и супинацию предплечья, приведение, отведение и ротацию плеча, показали увеличение объема функционального пространства руки во время

движения (пациенты самостоятельно отводили и удерживали плечо под углом  $90^\circ$ ), но не выявили улучшения способности в выполнении моторных задач у пациентов с хронической стадией инсульта (рис. 2). Очевидно, что сочетание экзоскелетов SpringWear и HandSOME позволит обеспечить быструю и эффективную роботизированную реабилитацию в домашних условиях для широкой категории пациентов с парезами верхних конечностей после инсульта [44].

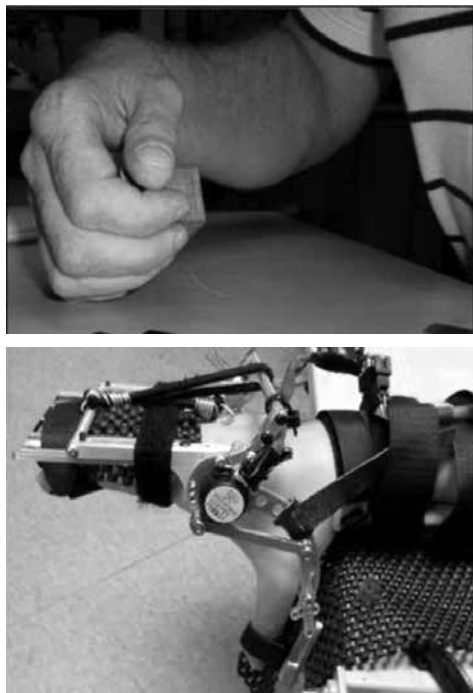


Рис. 1. Компенсаторная стратегия: *a* – пациент не может обхватить большим пальцем блок; *b* – применение аппарата Hand SOME у пациента с повышенным мышечным тонусом после инсульта

Fig. 1. Compensatory strategy: *a* – the patient can not clasp the block with his thumb; *b* – use of the Hand SOME machine in a patient with increased muscle tone after a stroke



Рис. 2. Применение аппарата SpringWear у пациента после инсульта для выполнения функциональных заданий в процессе терапии

Fig. 2. Application of SpringWear device in a stroke patient for performing functional tasks during therapy

Электромеханический тренажер ходьбы Gait Trainer 1 (GT 1) с функциональной электростимуляцией мышц был одним из первых роботов, доказавших свою эффективность у 56 больных с грубыми гемипарезами в подострую стадию инсульта. Тренировки проводились по 20 мин в день (пациенты совершали от 800 до 1 000 шагов на тренажере) в течение 4 нед [45].

Система для тренировки ходьбы Lokomat, состоящая из роботизированных ортезов ходьбы и системы поддержки массы тела, комбинированных с беговой дорожкой, была разработана в 2000 г. для пациентов с травмой спинного мозга [46]. Три рандомизированных контролируемых исследования, проведенные в Научном центре неврологии РАМН, Национальной нейрореабилитационной больнице Вашингтона (США) и Госпитале Hochzirl (Австрия), доказали эффективность применения роботизированного комплекса у пациентов с гемипарезами в раннем восстановительном периоде инсульта по сравнению с традиционной кинезотерапией. В то же время не получено достоверных данных об улучшении повседневной двигательной активности пациентов. Поэтому тренировка на системе Lokomat ни в коем случае не заменяет традиционную кинезотерапию, а прежде всего облегчает обучение ходьбе больных с выраженными и грубыми парезами [47–49].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ проблемы на мировом уровне показал, что последние десятилетия роботизированная нейрореабилитация занимает определенное место в комплексной реабилитации больных с двигательными нарушениями после ОНМК. Особенно важными в использовании роботизированных комплексов, передовых технологий цифровой обработки сигналов и интеллектуальных адаптивных систем являются междисциплинарный пациент-ориентированный подход и преемственность на всех этапах восстановительного лечения пациентов после инсульта.

Проведенное исследование позволило выявить целый ряд нерешенных вопросов клинического применения методик, основанных на роботизированной нейромиеореабилитации. Остаются нераскрытыми механизмы восполнения двигательных функций при использовании роботизированных реабилитационных комплексов. Как следствие, практикующие врачи сталкиваются со сложностью выбора и обоснования режимов и параметров внешнего воздействия. Кроме того, не до конца понятна роль биологической обратной связи в различных модальностях реабилитационного

воздействия. В совокупности указанные проблемы в понимании тонких механизмов роботизированной нейромиеореабилитации приводят к заметному снижению эффективности подобных методик, что отражено во многих изученных научных исследованиях.

Несмотря на неоднозначные результаты клинических исследований, роботизированная нейромиеореабилитация является одним из перспективных направлений и требует дальнейшего проведения нейрофизиологических и лабораторных исследований для создания научно обоснованных методических подходов, что позволит добиться ощутимого экономического эффекта от повышения качества реабилитации, уменьшения времени на ее проведение и будет иметь огромную социальную значимость.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Béjot Y., Daubail B., Giroud M. Epidemiology of stroke and transient ischemic attacks: Current knowledge and perspectives. *Rev. Neurol. (Paris)*. 2016; 172 (1): 59–68. DOI: 10.1016/j.neurol.2015.07.013.
2. Feigin V.L., Krishnamurthi R.V., Parmar P., Norrving B., Mensah G.A., Bennett D.A. et al. Update on the global burden of ischemic and hemorrhagic stroke in 1990–2013: The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology*. 2015; 45 (3): 161–176. DOI: 10.1159/000441085.
3. Prabhakaran S. Big data trends in stroke epidemiology in the United States. *Neurology*. 2017; 89 (19): 1940. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004636.
4. Olesen J., Gustavsson A., Svensson M., Wittchen H.-U., Jönsson B. et al. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur. J. Neurol.* 2012; 19 (1): 155–162. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2011.03590.x.
5. Turner-Stokes L., Sykes N., Silber E. Long-term neurological conditions: management at the interface between neurology, rehabilitation and palliative care. *Clin. Med.* 2008; 8 (2): 186–191. DOI: 10.7861/clinmedicine.8-2-186.
6. Wolbrecht E.T., Chan V., Reinkensmeyer D.J., Bobrow J.E. Optimizing compliant, model-based robotic assistance to promote neurorehabilitation. *IEEE Trans. Neural. Syst. Rehabil. Eng.* 2008; 16 (3): 286–297. DOI: 10.1109/TNSRE.2008.918389.
7. Blank A.A., French J.A., Pehlivan A.U., O'Malley M.K. Current trends in robot-assisted upper-limb stroke rehabilitation: promoting patient engagement in therapy. *Curr. Phys. Med. Rehabil. Rep.* 2014; 2: 184–195. DOI: 10.1007/s40141-014-0056-z.
8. Rowe J.B., Chan V., Ingemanson M.L., Cramer S.C., Wolbrecht E.T., Reinkensmeyer D.J. Robotic assistance for training finger movement using a hebbian model: a randomized controlled trial. *Neurorehabil. Neural. Repair*. 2017; 31 (8): 769–780. DOI: 10.1177/1545968317721975.
9. Federici S., Meloni F., Bracalenti M., De Filippis M.L. The effectiveness of powered, active lower limb exoskeletons in neurorehabilitation: a systematic review. *Neuro. Rehabilitation*. 2015; 37 (3): 321–340. DOI: 10.3233/NRE-151265.
10. Dimyan M.A., Cohen L.G. Neuroplasticity in the context of motor rehabilitation after stroke. *Nat. Rev. Neurol.* 2011; 7 (2): 76–85. DOI: 10.1038/nrneurol.2010.200.
11. Germanotta M., Cruciani A., Pecchioli C., Loreti S., Spedicato A., Meotti M. et al. Reliability, validity and discriminant ability of the instrumental indices provided by a novel planar robotic device for upper limb rehabilitation. *J. Neuro. Engineering Rehabil.* 2018; 15 (1): 39. DOI: 10.1186/s12984-018-0385-8.
12. Langhorne P., Bernhardt J., Kwakkel G. Stroke rehabilitation. *The Lancet*. 2011; 377 (9778): 1693–1702. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60325-5.
13. Mazzoleni S., Duret C., Grosmaire A.G., Battini E. Combining upper limb robotic rehabilitation with other therapeutic approaches after stroke: current status, rationale, and challenges. *BioMed Res. Int.* 2017; 2017. DOI: 10.1155/2017/8905637.
14. Colombo R., Sterpi L., Mazzone A., Delconte C., Pisano F. Robot-aided neurorehabilitation in sub-acute and chronic stroke: does spontaneous recovery have a limited impact on outcome? *Neuro. Rehabilitation*. 2013; 33 (4): 621–629. DOI: 10.3233/NRE-131002.
15. Di Pino G., Pellegrino G., Assenza G., Capone F., Ferreri F., Formica D. et al. Modulation of brain plasticity in stroke: a novel model for neurorehabilitation. *Nat. Rev. Neurol.* 2014; 10 (10): 597–608. DOI: 10.1038/nrneurol.2014.162.
16. Nahmani M., Turrigiano G.G. Adult cortical plasticity following injury: recapitulation of critical period mechanisms? *Compens. Inj. Adult Brain Always Good*. 2014; 283: 4–16. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.029.
17. Diaz Heijtz R., Forssberg H. Translational studies exploring neuroplasticity associated with motor skill learning and the regulatory role of the dopamine system. *Dev. Med. Child Neurol.* 2015; 57: 10–14. DOI: 10.1111/dmcn.12692.
18. Guadagnoli M.A., Lee T.D. Challenge point: a framework for conceptualizing the effects of various practice conditions in motor learning. *J. Mot. Behav.* 2004; 36 (2): 212–224. DOI: 10.3200/JMBR.36.2.212-224.
19. Murdoch K., Buckley J.D., McDonnell M.N. The effect of aerobic exercise on neuroplasticity within the motor cortex following stroke. *PLoS One*. 2016; 11 (3): e0152377. DOI: 10.1371/journal.pone.0152377.
20. McDonnell M.N., Koblar S., Ward N.S., Rothwell J.C., Hordacre B., Ridding M.C. An investigation of cortical neuroplasticity following stroke in adults: is there evidence for a critical window for rehabilitation? *BMC Neurol.* 2015; 15: 109. DOI: 10.1186/s12883-015-0356-7.
21. Tran D.A., Pajaro-Blazquez M., Daneault J.-F., Gallejos J.G., Pons J., Fregni F. et al. Combining dopami-

- nergic facilitation with robot-assisted upper limb therapy in stroke survivors: a focused review. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 2016; 95 (6): 459–474. DOI: 10.1097/PHM.0000000000000438.
22. Pinto C.B., Saleh Velez F.G., Lopes F., de Toledo Piza P.V., Dipietro L., Wang Q.M. et al. SSRI and motor recovery in stroke: reestablishment of inhibitory neural network tonus. *Front. Neurosci.* 2017; 11: 637. DOI: 10.3389/fnins.2017.00637.
  23. Luft A.R., Buitrago M.M., Ringer T., Dichgans J., Schulz J.B. Motor skill learning depends on protein synthesis in motor cortex after training. *J. Neurosci.* 2004; 24 (29): 6515–6520. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1034-04.2004.
  24. Hosp J.A., Mann S., Wegenast-Braun B.M., Calhoun M.E., Luft A.R. Region and task-specific activation of arc in primary motor cortex of rats following motor skill learning. *Neuroscience.* 2013; 250: 557–564. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.060.
  25. Hirano T. Regulation and interaction of multiple types of synaptic plasticity in a purkinje neuron and their contribution to motor learning. *The Cerebellum.* 2018. DOI: 10.1007/s12311-018-0963-0.
  26. Rioult-Pedotti M.-S., Donoghue J.P., Dunaevsky A. Plasticity of the synaptic modification range. *J. Neurophysiol.* 2007; 98 (6): 3688–3695. DOI: 10.1152/jn.00164.2007.
  27. Xu T., Yu X., Perlik A.J., Tobin W.F., Zweig J.A., Tennant K. et al. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature.* 2009; 462: 915–919. DOI: 10.1038/nature08389.
  28. Arya K.N., Pandian S., Verma R., Garg R.K. Movement therapy induced neural reorganization and motor recovery in stroke: A review. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 2011; 15 (4): 528–537. DOI: 10.1016/j.jbmt.2011.01.023.
  29. Schaechter J.D. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. *Prog. Neurobiol.* 2004; 73 (1): 61–72. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2004.04.001.
  30. Gandolfi M., Formaggio E., Geroi C., Storti S.F., Boscolo Galazzo I., Bortolami M. et al. Quantification of upper limb motor recovery and EEG power changes after robot-assisted bilateral arm training in chronic stroke patients: a prospective pilot study. *Neural. Plast.* 2018; 2018. DOI: 10.1155/2018/8105480.
  31. Nicolas-Alonso L.F., Gomez-Gil J. Brain computer interfaces, a review. *Sensors.* 2012; 12 (2): 1211–1279. DOI: 10.3390/s120201211.
  32. Laffont I., Bakhti K., Coroian F., van Dokkum J.L., Mottet D., Schweighofer N. et al. Innovative technologies applied to sensorimotor rehabilitation after stroke. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 2014; 57: 543–551. DOI: 10.1016/j.rehab.2014.08.007.
  33. Doeringer J.A., Hogan N. Performance of above elbow body-powered prostheses in visually guided unconstrained motion tasks. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1995; 42 (6): 621–631. DOI: 10.1109/10.387202.
  34. Bugar C.G., Lum P.S., Shor P.C., Van der Loos H.M. Development of robots for rehabilitation therapy: The palo alto VA/Stanford experience. *J. Rehabil. Res. Dev.* 2000; 37 (6): 663–674.
  35. Lo A.C., Guarino P.D., Richards L.G., Haselkorn J.K., Wittenberg G.F., Federman D.G., et al. Robot-assisted therapy for long-term upper-limb impairment after stroke. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362 (19): 1772–1783. DOI: 10.1056/NEJMoa0911341.
  36. Sale P., Franceschini M., Mazzoleni S., Palma E., Agosti M., Posteraro F. Effects of upper limb robot-assisted therapy on motor recovery in subacute stroke patients. *J. NeuroEngineering Rehabil.* 2014; 11: 104. DOI: 10.1186/1743-0003-11-104.
  37. Taveggia G., Borboni A., Salvi L., Mulé C., Fogliarini S., Villaface J.H. et al. Efficacy of robot-assisted rehabilitation for the functional recovery of the upper limb in post-stroke patients: a randomized controlled study. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* 2016; 52 (6): 767–773.
  38. Fukuda H., Morishita T., Ogata T., Saita K., Hyakutake K., Watanabe J. et al. Tailor-made rehabilitation approach using multiple types of hybrid assistive limb robots for acute stroke patients: A pilot study. *Assist. Technol.* 2016; 28 (1): 53–56. DOI: 10.1080/10400435.2015.1080768.
  39. Caimmi M., Chiavenna A., Scano A., Gasperini G., Giovanzana C., Molinari Tosatti L. et al. Using robot fully assisted functional movements in upper-limb rehabilitation of chronic stroke patients: preliminary results. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* 2017; 53 (3): 390–399. DOI: 10.23736/s1973-9087.16.04407-5.
  40. Frolov A.A., Mokienko O., Lyukmanov R., Biryukova E., Kotov S., Turbina L. et al. Post-stroke rehabilitation training with a motor-imagery-based brain-computer interface (BCI)-controlled hand exoskeleton: a randomized controlled multicenter. *Trial. Front Neurosci.* 2017; 11: 400. DOI: 10.3389/fnins.2017.00400.
  41. Susanto E.A., Tong R.K., Ockenfeld C., Ho N.S. Efficacy of robot-assisted fingers training in chronic stroke survivors: a pilot randomized-controlled trial. *J. NeuroEngineering Rehabil.* 2015; 12: 42. DOI: 10.1186/s12984-015-0033-5.
  42. Rong W., Li W., Pang M., Hu J., Wei X., Yang B. et al. A neuromuscular electrical stimulation (NMES) and robot hybrid system for multi-joint coordinated upper limb rehabilitation after stroke. *J. NeuroEngineering Rehabil.* 2017; 14 (1): 34. DOI: 10.1186/s12984-017-0245-y.
  43. Mehrholz J., Pohl M., Platz T., Kugler J., Elsner B. Electromechanical and robot-assisted arm training for improving activities of daily living, arm function, and arm muscle strength after stroke. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015; CD006876. DOI: 10.1002/14651858.cd006876.pub4.
  44. Chen J., Lum P.S. Pilot testing of the spring operated wearable enhancer for arm rehabilitation (Spring wear). *J. NeuroEngineering Rehabil.* 2018; 15 (1): 13. DOI: 10.1186/s12984-018-0352-4.
  45. Uhlenbrock D., Hesse S., Sarkodie-Gyan T. Development of an advanced mechanized gait-trainer, controlling movement of the center of mass, for restoration of gait in non-ambulatory subjects. *J. Biomed. Tech.* 1999; 44 (7): 194–201.

46. Sašo J., Gery C., Thierry K., Hansrudi F., Manfred M. Robotic orthosis lokomat: a rehabilitation and research tool. *Neuromodulation Technol. Neural. Interface*. 2008; 6 (2): 108–115. DOI: 10.1046/j.1525-1403.2003.03017.x.
47. Hidler J., Nichols D., Pelliccio M., Brady K., Campbell D.D., Kahn J.H. et al. Multicenter randomized clinical trial evaluating the effectiveness of the lokomat in subacute stroke. *Neurorehabil. Neural. Repair*. 2008; 23: 5–13. DOI: 10.1177/1545968308326632.
48. Husemann B., Möller F., Krewer C., Heller S., Koenig E. Effects of locomotion training with assistance of a robot-driven gait orthosis in hemiparetic patients after stroke. *Stroke*. 2007; 38 (2): 349–354. DOI: 10.1161/01.STR.0000254607.48765.cb.
49. Mayr A., Kofler M., Quirbach E., Matzak H., Fröhlich K., Saltuari L. Prospective, blinded, randomized crossover study of gait rehabilitation in stroke patients using the lokomat gait orthosis. *Neurorehabil. Neural. Repair*. 2007; 21: 307–314. DOI: 10.1177/1545968307300697.

## Сведения об авторах

**Королева Екатерина Сергеевна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра неврологии и нейрохирургии СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1911-166X.

**Алифорова Валентина Михайловна**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4140-3223.

**Латыпова Алина Викторовна**, аспирант, кафедра неврологии и нейрохирургии СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0676-3968.

**Чебан София Владимировна**, студентка 5-го курса, лечебный факультет СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-4554-7969.

**Отт Валерия Алексеевна**, студентка 5-го курса, лечебный факультет СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-0033-9544.

**Бразовский Константин Станиславович**, д-р техн. наук, доцент, зав. кафедрой медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4779-9820.

**Толмачев Иван Владиславович**, канд. мед. наук, доцент, кафедра медицинской и биологической кибернетики СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-2888-5539.

**Бразовская Наталия Георгиевна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра медицинской и биологической кибернетики СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-0706-9735.

**Сёмкина Анастасия Александровна**, аспирант, кафедра неврологии и нейрохирургии СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-5117-2337.

**Катаева Надежда Григорьевна**, д-р мед. наук, профессор, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Алифорова Валентина Михайловна**, e-mail: v\_alifirova@mail.ru.

## Authors information

**Koroleva Ekaterina S.**, PhD, Associate Professor, Department of Neurology and Neurosurgery, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1911-166X.

**Alifirova Valentina M.**, DM, Professor, Head of the Department of Neurology and Neurosurgery, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4140-3223.

**Latypova Alina V.**, PhD Student, Department of Neurology and Neurosurgery, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0676-3968.

**Cheban Sofia V.**, 5th-year student, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4554-7969.

**Ott Valeriya A.**, 5th-year student, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0033-9544.

**Brazovskiy Konstantin S.**, PhD, Head of the Department of Medical and Biological Cybernetics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4779-9820.

**Tolmachev Ivan V.**, PhD, Associate Professor, Department of Medical and Biological Cybernetics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2888-5539.

**Brazovskaya Natalia G.**, PhD, Associate Professor, Department of Medical and Biological Cybernetics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0706-9735.

**Semkina Anastasiia A.**, PhD Student, Department of Neurology and Neurosurgery, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5117-2337.

**Kataeva N.G.**, DM, Professor, Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Alifirova Valentina M.**, e-mail: v\_alifirova@mail.ru.

Received 06.12.2018

Accepted 15.04.2019

Поступила в редакцию 06.12.2018

Подписана в печать 15.04.2019

## Мембранная теория патогенеза артериальной гипертензии: что мы знаем об этом полвека спустя?

Орлов С.Н.<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет (МГУ) им. М.В. Ломоносова  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Ленинские Горы, 1

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТПУ)  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

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

### РЕЗЮМЕ

В обзоре кратко изложена история открытия в середине 1970-х гг. нарушений ионного транспорта через плазматические мембраны клеток при первичной артериальной гипертензии. Анализируется полувековая история исследований молекулярной природы ионных транспортеров, лежащих в основе этих нарушений, и опосредованных ими механизмов, приводящих к развитию гипертонической болезни и осложнений, обусловленных долгосрочным повышением артериального давления.

**Ключевые слова:** ионные транспортеры, плазматические мембраны клеток.

**Конфликт интересов.** Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Работа была поддержана грантами Канадского института исследований в области здравоохранения (МОР-81392), Обществ по изучению сердца и почек Канады, Федеральной целевой программой 2009–2013 гг. «Научно-исследовательские кадры инновационной России», Российским фондом фундаментальных исследований (09-0073/04; 15-04-08832; 18-04-00063) и Российским научным фондом (14-15-00006 и 16-15-10026).

**Для цитирования:** Орлов С.Н. Мембранная теория патогенеза артериальной гипертензии: что мы знаем об этом полвека спустя?. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 234–247. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2019-2-234–247](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-234-247).

## Membrane theory of the pathogenesis of arterial hypertension: What do we know about this, half a century later?

Orlov S.N.<sup>1, 2, 3</sup>

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

---

✉ Орлов Сергей Николаевич, [sergeiorlov@yandex.ru](mailto:sergeiorlov@yandex.ru).



<sup>2</sup> *National Research Tomsk State University  
36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation*

<sup>3</sup> *Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation*

## ABSTRACT

The review summarizes the history of the discovery in the mid-70s of the impaired ion transport across the plasma membrane of cells during primary arterial hypertension. A half-century's history of studies on the molecular nature of the ionic transporters underlying these disorders and the mechanisms mediated by them leading to the development of hypertension and complications caused by a long-term increase in blood pressure is analyzed.

**Key words:** ion transporters, plasma membrane of cells.

**Conflict of interest.** The author declares the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (MOP-81392), Canadian scientific societies of the heart and kidneys, and the 2009–2013 Federal Targeted Program “Scientific and Scientific-Pedagogical Human Resources of Innovation-Driven Russia”, the Russian Foundation for Basic Research (09-0073 / 04; 15-04-08832; 18-04-00063) and the Russian Science Foundation (14-15-00006 and 16-15-10026).

**For citation:** Orlov S.N. Membrane theory of the pathogenesis of arterial hypertension: What do we know about this, half a century later?. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 234–247. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-234-247>.

*Посвящается  
светлой памяти моего учителя,  
профессора Ювеналия Васильевича  
Постнова*

## ВВЕДЕНИЕ

В 1974 г. я заканчивал аспирантуру при кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Моя кандидатская диссертация была посвящена изучению механизма свободнорадикального окисления природных липидов в модельных экспериментах. Теоретические основы этой работы были заложены Борисом Николаевичем Тарусовым и Николаем Марковичем Эммануэлем как частный случай цепных реакции горения, описанных за 50 лет до этого Николаем Николаевичем Семеновым, за что ему в 1956 г. была присуждена Нобелевская премия. Годы моей аспирантуры пришлись на время ключевых открытий в области молекулярной биологии. Проводимые мной исследования, несмотря на открытие явления флуоресценции окисленных липидов биологических мембран и ряд других интересных результатов, представлялись мне малопер-

спективными, и я решил резко сменить тематику дальнейшей работы [1]. В связи с этим я пришел в научно-исследовательскую лабораторию, организованную двумя годами ранее при Четвертом главном управлении (в нынешней терминологии – при Президенте РФ) Министерства здравоохранения СССР Евгением Ивановичем Чазовым, и был зачислен на должность младшего научного сотрудника в отдел, возглавляемый профессором Ювеналием Васильевичем Постновым (рис. 1). Мне было предложено приступить к изучению особенностей структурно-функционального состояния плазматических мембран клеток гладкой мускулатуры (ГМК) крыс со спонтанной генетической гипертензией (*spontaneously hypertensive rats*, SHR), привезенных Ю.В. Постновым из Института клинических исследований (Монреаль, Канада) и до сих пор рассматриваемых как наиболее адекватная экспериментальная модель гипертонической болезни человека, которая в англоязычной литературе классифицируется как первичная, или эссенциальная, гипертензия. Предпосылкой для данного проекта послужили данные об увеличении скорости обмена изотопов одновалентных ионов в изолированных полосках сосудов крыс SHR, полученные американским исследователем

А. Jones [2]. Следует, однако, отметить, что эти эксперименты были проведены на 12–16-недельных животных, а потому зафиксированные в них нарушения могли быть не причиной, но следствием долгосрочного воздействия на сосуды повышенного давления, приводящего к морфологическим изменениям, обнаруженным за долго до этого шведским физиологом В. Folkow [3]. Учи-

тая это обстоятельство, мы решили использовать SHR в возрасте от 4 до 6 нед, т.е. на стадии, предшествующей развитию хронической гипертензии. Я также обратил внимание на сложную морфологию сосудистой стенки, которая наряду с ГМК включает эндотелий и клетки соединительной ткани, что существенно затрудняет изучение процессов трансмембранного переноса ионов.

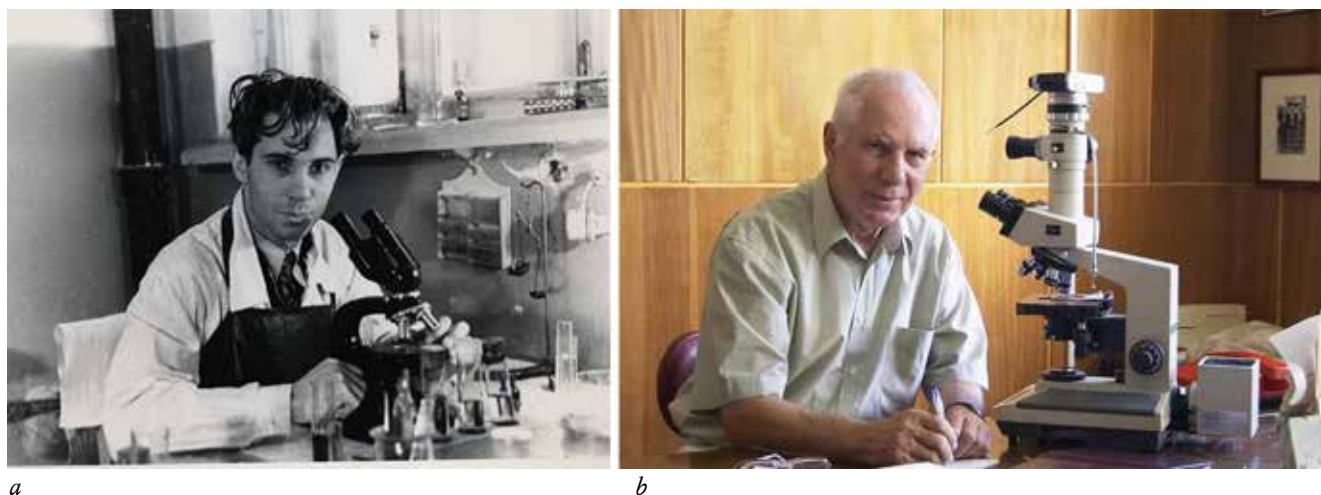


Рис. 1. Ю.В. Постнов – аспирант Рязанского медицинского института, 1953–1956 (а); – заведующий отделом патологии Кардиологического научного центра, г. Москва, 2005 (b)

Fig. 1. Yu.V. Postnov – graduate student at the Ryazan Medical Institute, 1953–1956 (a); Head of the Pathology Department of the Cardiology Research Center, Moscow, 2005 (b)

В этой связи мы решили провести первые эксперименты на эритроцитах, лишенных не только ядра, но и других внутриклеточных мембранных органелл. Мы полагали, что в этих экспериментах отработаем адекватные методы, которые можем впоследствии перенести на изучение проницаемости ГМК. Однако, к нашему удивлению, уже в первых экспериментах было обнаружено, что в эритроцитах SHR существенно выше скорости обменов  $^{22}\text{Na}^+ / ^{23}\text{Na}^+$  и  $^{42}\text{K}^+ / ^{40}\text{K}^+$ , что свидетельствовало об увеличении проницаемости плазматической мембраны гипертензивных животных для одновалентных катионов [4, 5]. Независимо от нас к аналогичному выводу пришли другие исследователи [6–8]. Позднее увеличение проницаемости эритроцитов для натрия и калия было зарегистрировано у части больных гипертонической болезнью [9]. Основываясь на результатах этих работ и данных, полученных на полосках сосудов SHR [2], нами была сформулирована мембранная концепция гипертонической болезни, изложенная

в ряде обзоров и монографии [10–15]. Хочется отметить особую роль в реализации этого проекта кандидата биологических наук Павла Васильевича Гулака, который не только научил нас работать с изотопами в отнюдь не идеальных условиях<sup>1</sup>, но и разработал оригинальную методологию расчета скорости трансмембранного изотопного обмена [16].

Ниже мы суммируем результаты последующих исследований, посвященных идентификации молекулярных транспортеров, вовлеченных в увеличение проницаемости плазматической мембраны для одновалентных катионов. Мы сосредоточим внимание на ион-транспортирующих системах, идентифицированных в эритроцитах (рис. 2). Данные о других ионных каналах и переносчиках, отсутствующих в эритроцитах, но вовлеченных в патогенез гипертензии через их функционирование в клетках эпителия почечных канальцев, нейронах и астроцитах головного мозга, заинтересованный читатель может найти в обзорах [17–19].

<sup>1</sup> В этой связи вспоминается случай: в поисках оптимального места для утилизации разбавленных отходов  $^{22}\text{Na}$  я обратил внимание на слив для отработанных химикатов под лабораторной тягой. Через несколько минут после начала процедуры я заметил, что стою в луже, заполненной ртутью. Оказалось, что в последний раз тягой пользовались более 5 лет назад, когда в нее сливали отходы с отработанной ртутью.

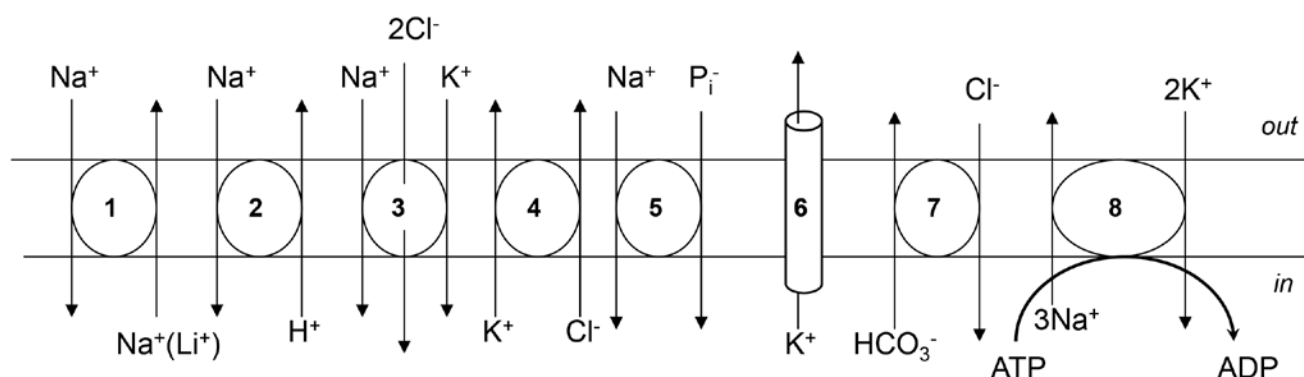


Рис. 2. Основные системы, принимающие участие в транспорте одновалентных ионов через мембрану эритроцитов: 1 –  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ ) обмен; 2 –  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмен; 3 –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  котранспорт; 4 –  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  котранспорт; 5 – котранспорт  $\text{Na}^+$  и анионов фосфата; 6 –  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые  $\text{K}^+$  каналы; 7 – анионный обменник; 8 –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза

Fig. 2. The main systems involved in the transport of monovalent ions through the erythrocyte membrane: 1 –  $\text{Na}^+ / \text{Na}^+ / \text{Li}^+$  exchange; 2 –  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  exchange; 3 –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  cotransport; 4 –  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  cotransport; 5 – cotransport of  $\text{Na}^+$  and phosphate anions; 6 –  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels; 7 – anion exchanger; 8 –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ СИСТЕМ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

### $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФаза

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза в ответ на гидролиз одной молекулы АТФ осуществляет транспорт трех ионов  $\text{Na}^+$  и двух ионов  $\text{K}^+$  против градиента их концентраций (см. рис. 2), который полностью ингибируется в присутствии убаина и других кардиотонических стероидов. В эритроцитах этот фермент представлен единственной изоформой ( $\alpha 1$ ), которая у крыс и мышей обладает крайне низким сродством к убаину ( $K_{0,5}$  ~50–100  $\mu\text{M}$  и 0,2–0,5  $\mu\text{M}$  в эритроцитах крысы и человека соответственно). В рассмотренных выше экспериментах мы обнаружили увеличенную скорость  $^{22}\text{Na}/^{23}\text{Na}$  обмена в эритроцитах крыс SHR в присутствии 50  $\mu\text{M}$  убаина, на основании чего нами был сделан вывод о том, что увеличение проницаемости мембраны для одновалентных ионов не связано с активностью  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -насоса [5]. В дополнительных экспериментах активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза оценивалась по скорости гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ). Эти эксперименты, равно как и оценка числа мест связывания [3H]-убаина, не выявили отличий в эритроцитах SHR [12]. Небольшое (15–20%) увеличение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -насоса в эритроцитах SHR по отношению к нормотензивным крысам линии Vistar-Kyoto, обнаруженное при добавлении на-

сыщающих концентраций убаина, можно, по-видимому, рассматривать как следствие увеличения в эритроцитах концентрации внутриклеточного  $\text{Na}^+$ , отмеченное целым рядом исследователей [5, 20–23].

Нормотензивные крысы линии Brown-Norway (BN.lx) были выбраны в Институте физиологии Чешской академии наук для получения гибридов второго поколения (SHRxBN.lx  $F_2$  hybrids) [24]. Используя эритроциты, пермеабилizированные сапонином, было показано, что у BN.lx крыс активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы снижена по отношению к SHR на 20–30% [25]. В лаборатории профессора G. Bianchi были получены гипертензивные крысы линии MHS (Milan hypertensive strain), у которых изменения функции почек были близки к таковым, обнаруженным у больных гипертонической болезнью [26]. В эритроцитах крыс MHS убаин-чувствительная компонента скорости входа  $^{86}\text{Rb}$  была на 15–25% ниже, чем у крыс нормотензивного контроля (Milan normotensive strain, MNS) [27]. В нашей лаборатории эти наблюдения были подтверждены при исследовании убаин-чувствительной компоненты скорости выхода  $^{22}\text{Na}$  efflux [22].

Для выяснения молекулярных механизмов формирования феномена соль-чувствительной гипертонии, были использованы инбредные линии, полученные при скрещивания соль-чувствительных (Dahl salt-sensitive, SS) и соль-резистентных (Dahl salt-resistant, SR) крыс [28]. При исследовании влияния убаина на скорость входа  $\text{K}^+$  и выхода  $\text{Na}^+$ , отличий между эритроцитами SS и

SR обнаружено не было, несмотря на достоверное увеличение концентрации внутриклеточного  $\text{Na}^+_i$  в эритроцитах SS [29, 30]. В нашем исследовании также не удалось обнаружить различий стехиометрии функционирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насоса (выход трех ионов  $\text{Na}^+$  сопровождается захватом двух ионов  $\text{K}^+$ ) как между крысами SS и JR, так и конгенной линии крыс, у которых локус, содержащий ген *al*  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, был заменен на локус нормотензивных крыс MNS [31]. В этой связи интересно отметить, что в отличие от SR животных, активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насоса увеличивалась в эритроцитах SS крыс при их переходе на высокосолевою диету [32].

Несколько лабораторий представили данные о том, что как и в эксперименте, так и в клинике, развитие гипертензии сопровождается увеличением содержания в плазме крови цереброваскулярной жидкости и некоторых исследованных на этот предмет тканях эндогенных кардиотонических стероидов, что ведет к снижению активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Результаты этих исследований суммированы в ряде обзоров [33–36].

#### *$\text{Na}^+/\text{Li}^+$ обмен*

В 1980 г. группой ученых Гарвардского университета было обнаружено, что у больных гипертонической болезнью увеличена скорость  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$  обмена, регистрируемая по  $\text{Na}^+_o$ -зависимой компоненты скорости выхода  $\text{Li}^+$  из эритроцитов, предварительно нагруженных этим катионом [37]. В англоязычной литературе этот вид транспорта получил название  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  exchange или  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  counter transport. Впоследствии увеличение скорости  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -обмена у части больных первичной гипертензией было подтверждено в более чем 300 публикациях других исследовательских групп [13, 14].

Сравнительно недавно мы предприняли попытку выяснения молекулярной природы  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  обмена. Так как неорганический фосфат ( $\text{Pi}$ ) ингибирует  $\text{Na}^+$ -зависимый выход  $\text{Li}^+$  [38], можно предположить, что  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  обмен опосредован изоформой  $\text{Na}^+, \text{P}_i$  котранспорта. В этой связи мы сопоставили активности данных ионных переносчиков в эритроцитах человека, крысы и кролика.  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  обмен был ниже уровня достоверной детекции у крысы, но примерно в 50 раз выше у кролика по сравнению с человеком. В отличие от  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  обмена, активность  $\text{Na}^+, \text{P}_i$  котранспорта у крысы, человека и кролика соотносилась как 1:2:6 и не зависела от нагрузки эритроцитов  $\text{Li}^+$  [39]. В дополнительных экспериментах мы не обнаружили существенных различий эритроци-

тов трех исследованных видов при сравнении скоростей анионного обмена,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта [40]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  обмена в эритроцитах больных гипертонической болезнью не связано с активностью клонированных ион-транспортирующих систем, приведенных на рис. 2. Таким образом, вопрос о молекулярной природе этого переносчика остается открытым.

#### *$\text{Na}^+/\text{H}^+$ обмен*

В нашей лаборатории было показано, что подобно клеткам, содержащим ядро, скорость  $^2\text{Na}$  входа увеличивается при закислении цитоплазмы, а также при изо- или гиперосмотическом сжатии эритроцитов крысы, что указывало на наличие  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена [41, 42]. Позднее было показано, что это явление опосредовано универсальной изоформой данного переносчика NHE1 (SLC9A1) [43]. Для регистрации активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена в ответ на закисление цитоплазмы ( $\text{Dm}_{\text{H}^+}$ -induced  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange) были использованы два методических подхода. Мы использовали амилорид, ингибирующий все клонированные изоформы  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена [44], и обнаружили, что амилорид-ингибируемая компонента выхода  $\text{H}^+$  увеличена на 40–50% в эритроцитах SHR, но не изменена в эритроцитах MHS [45]. М. Canessa с соавт. измеряли активность этого переносчика как разницу начальных скоростей входа  $\text{Na}^+$  при  $\text{pH}_o = 8,0$  и  $6,0$ . Они не обнаружили отличий в эритроцитах SHR и MHS, но выявили увеличение активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена у крыс SS при их переводе на высокосолевою диету [46]. Следует отметить, что описанные выше подходы измерения имеют ряд ограничений. Во-первых, оценка скорости выхода  $\text{H}^+$  затруднена, так как для регистрации этого процесса используются среды, буферная емкость которых на 2–3 порядка ниже буферной емкости цитоплазмы эритроцитов. Это обстоятельство становится особо важным при использовании амилорида, существенно увеличивающего буферную емкость среды инкубации эритроцитов [47]. Во-вторых, эритроциты млекопитающих обогащены анионным обменником (белок полосы 3), который способствует быстрой диссипации трансмембранного градиента протонов ( $\text{Dm}_{\text{H}^+}$ ). Это обстоятельство существенным образом затрудняет измерение потоков  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}^+$ , опосредованных  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменом. В-третьих, при концентрации 1 mM амилорид обладает целым спектром побочных эффектов, включая частичный гемолиз эритроцитов [46].

Учитывая эти ограничения, мы определили прирост скорости  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена в ответ на сжатие эритроцитов в гиперосмотической среде. Эти опыты не выявили отличий у крыс SHR по отношению к нормотензивным крысам WKY [48]. Для исследования скорости  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена в культуре гладкомышечных клеток мы использовали этилизопропиламилорид (EIPA), ингибирующий NHE1 в концентрациях на два порядка меньших по сравнению с амилоридом. Мы обнаружили 50–60%-е увеличение скорости  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена как у SHR, так и у крыс, где повышенное давление сопровождается мозговыми кровоизлияниями (stroke-prone spontaneously hypertensive rats, SHRSP) [49]. В этом исследовании мы также проанализировали структуры кодирующий участка гена *SLC9A1* и не обнаружили каких-либо мутаций у обеих линий гипертензивных животных. Таким образом, активация NHE1 в гладкомышечных клетках сосудов гипертензивных крыс опосредована, по-видимому, орган-специфическими системами, вовлеченными в регуляцию активности этого переносчика.

#### *$\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт*

Котранспортеры катионов и хлора (cation-chloride cotransporters, CCC) относятся к группе ионных переносчиков (solute carriers, SLC), осуществляющих перенос ионов через биологические мембраны как по их электрохимическому градиенту, так и против него. В последнем случае энергией служат градиенты котранспортируемых соединений, созданные за счет работы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и других ионных насосов. Эта группа ионных транспортеров включает более 300 генов, организованных в 52 семейства [50]. CCC относятся к SLC12 семейству, представители которого осуществляют симпорт анионов  $\text{Cl}^-$  совместно с катионами  $\text{Na}^+$  и (или)  $\text{K}^+$ . SLC12 включает  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$  котранспорт (NCC), кодируемый единичным геном (*SLC12A3*),  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорт (NKCC), кодируемый двумя генами: *SLC12A2* (NKCC1) и *SLC12A1* (NKCC2), и  $\text{K}^+, \text{Cl}^-$  котранспорт (KCC), кодируемый *SLC12A4* (KCC1), *SLC12A5* (KCC2), *SLC12A6* (KCC3) и *SLC12A7* (KCC). NKCC ингибируется буметанидом, фуросемидом и родственными им соединениями, получившими название петлевых диуретиков по месту их основного действия в почках – восходящий отдел петли Генле. NCC полностью блокируется производными тиазида. В отличие от NKCC и NCC, специфических ингибиторов KCC до сих пор не обнаружено

и активность этого переносчика лишь частично уменьшается в присутствии высоких концентраций фуросемида. CCC генерируют как входящие, так и выходящие потоки ионов, и направленность их нетто-потоков зависит как от стехиометрии переноса, так и от трансмембранного градиента котранспортируемых ионов, создаваемых  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой. При стехиометрии переноса 1:1 величина ионных потоков находится в линейной зависимости от концентрации котранспортируемых ионов. Так как  $[\text{K}^+]_i > [\text{K}^+]_o$ , а  $[\text{Cl}^-]_o > [\text{Cl}^-]_i$ , нетто-поток, генерируемый KCC, направлен из клетки (см. рис. 2). Более сложная зависимость установлена для NKCC, работающего со стехиометрией  $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ ,  $[\text{Cl}^-]_o^2 > [\text{Cl}^-]_i^2$  и потому в большинстве типов клеток нетто-поток, опосредованный этим переносчиком, направлен в цитоплазму. Сведения о структуре генов, мембранной архитектуре и фармакологии CCC в полной мере рассмотрены в ряде обзоров [17, 51, 52].

В нашей лаборатории и рядом других исследовательских групп было установлено, что активность NKCC увеличена в эритроцитах крыс SHR и MHS [12, 13, 53–55]. На вовлечение этого переносчика в патогенез первичной гипертензии указывали также следующие данные:

1. В эритроцитах гибридов первого поколения, полученных скрещиванием гипертензивных (MHS) и нормотензивных (MNS) крыс ( $\text{F}_1$  MHSxMNS), у которых стволовые клетки костного мозга были инактивированы при облучении жесткой гамма-радиацией, активность NKCC была увеличена после пересадки костного мозга от MHS, но не MNS [27]. Эти данные указывали на то, что увеличенная активность NKCC является наследуемым фактором, нежели результатом долгосрочного воздействия повышенного артериального давления (АД).

2. В эритроцитах гибридов второго поколения, полученных при скрещивании гипертензивных и нормотензивных крыс ( $\text{F}_2$  SHRxWKY;  $\text{F}_2$  MHSxMNS), активность NKCC коррелировала с величиной АД [27, 56].

3. Рядом исследователей было установлено, что артериальное давление снижено у *NKCC1*<sup>-/-</sup> мышей [57–59]. Следует отметить, что S.M. Kim и соавт. не удалось обнаружить этих различий [60]. Причины этого противоречия остаются неизвестными.

4. Введение селективного ингибитора  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта буметанида приводило к быстрому снижению АД у контрольных, но не у *NKCC1*<sup>-/-</sup> мышей [61].

## МЕХАНИЗМ ВОВЛЕЧЕНИЯ НКСС1 В РЕГУЛЯЦИЮ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ

Если нарушения ионного транспорта, рассмотренные выше, ограничены эритроцитами, то они могут быть вовлечены в патогенез гипертонической болезни через изменение реологических свойств крови, приводящих к увеличению периферического сопротивления системы кровообращения. С этим наблюдением согласуются данные об ухудшении реологических параметров крови крыс SHR [62–64], что, по-видимому, обусловлено изменениями микровязкости мембраны эритроцитов, продемонстрированной при сравнении теней эритроцитов SHR и крыс нормотензивного контроля [65, 66]. Согласно мембранной концепции, предложенной Ю.В. Постновым, структурно-функциональные нарушения, обнаруженные в эритроцитах, вовлечены в патогенез гипертонической болезни через их проявления в органах, вовлеченных в долгосрочное поддержание повышенного АД. Ниже мы рассмотрим это положение на примере роли НКСС1 в регуляции тонуса сосудов. Сведения о роли ионных транспортеров в активации сервомеханизмов поддержания повышенного давления через изменение функционирования почек и симпатической нервной системы рассмотрены ранее [17, 67].

НКСС1 является единственной изоформой  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта, идентифицированной в эритроцитах и ГМК. В отличие от доминирующей роли проводимости плазматической мембраны для  $\text{K}^+$  ( $P_K$ ) в формировании электрического сопротивления и потенциала ( $E_m$ ) покоящихся клеток скелетной и сердечной мускулатуры, значения  $P_K$  и  $P_{\text{Cl}}$  в ГМК различаются незначительно [68]. Эта особенность предполагает участие соотношения  $[\text{Cl}^-]_i/[\text{Cl}^-]_o$ , а следовательно, и НКСС1 в регуляции  $E_m$  и сопряжения возбуждения и сокращения ГМК. В самом деле, фуросемид и буметанид уменьшали  $[\text{Cl}^-]_i$  [69, 70] и вызывали гиперполяризацию ГМК сосудов крысы [69]. Эти данные позволили предположить, что в основе снижение базального тонуса ГМК, обнаруженного при действии петлевых диуретиков [71–73], а также подавления этими соединениями сокращения полосок гладкой мускулатуры в ответ на умеренное увеличение  $[\text{K}^+]_o$  [70], электрическую стимуляцию [74], добавление гистамина [75], ангиотензина II [76], тромбоксана A2 [77, 78], окситоцина [79, 80], агонистов  $\alpha$ -адренергических [61, 70, 81, 82] и пуринергических рецепторов [83], лежат  $\text{Cl}^-$ -зависимая гиперполяризация и

снижение активности потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  каналов L-типа.

При анализе имеющихся данных мы обратили внимание на то, что сосудорасслабляющее действие петлевых диуретиков увеличивается при замене бикарбонатного буфера на трис-буфер. Так, например, в отсутствие  $\text{HCO}_3^-$  буметанид вызывал 10-кратное уменьшение сокращения аорты крысы, вызванное фенилэфрином [70], в то время как при использовании бикарбонатного буфера буметанид уменьшал этот параметр на 5–10% [81]. В дополнительных экспериментах мы показали, что добавление к трис-буферу 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  снижает ингибирующее действие буметанида на сокращения брыжеечных артерий крысы, вызванные 30 mM KCl и фенилэфрина в 5 и 3 раза fold соответственно [84]. Для объяснения этого явления можно предложить, что присутствие  $\text{HCO}_3^-$  нивелирует роль  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта за счет активации анионных обменников. В самом деле, как видно из рис. 2, при наличии анионов бикарбоната следует ожидать активацию  $\text{Na}^+, \text{HCO}_3^-$  котранспорта, увеличение  $[\text{HCO}_3^-]_i$  и последующее увеличение  $[\text{Cl}^-]_i$  за счет активации  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  обмена. Кроме того, нами обнаружено, что в культуре ГМК аорты крысы добавление 5 mM  $\text{NaHCO}_3$  приводит к 2-кратному уменьшению активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта, регистрируемого по величине буметанид-чувствительной компоненты скорости входа радиоактивного аналога калия  $^{86}\text{Rb}$  [84]. Возможно, что в основе ингибирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта лежит вытеснение анионами бикарбоната хлора из мест его связывания на молекуле НКСС1. Не исключено также, что расхождение экспериментальных данных обусловлено и другими факторами. Так, например, было показано, что буметанид ингибировал сокращение аорты, вызванное добавлением насыщающих концентраций фенилэфрина, у самок, но не самцов крыс, что связано, по-видимому, с половыми особенностями регуляции активности НКСС1 [82].

Данные, рассмотренные в обзоре [85], указывают на то, что наряду с ГМК сосудов, активация НКСС1 может участвовать в патогенезе системной гипертензии через повышение  $[\text{Cl}^-]_i$  в нейронах головного мозга, приводящего к активации симпатической нервной системы. Следует, однако, отметить, что фуросемид (но не буметанид) напрямую ингибирует активность рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (GABA-A) [86], т.е. при условии его проникновения через гематоэнцефалический барьер он способен модулировать нейрональную активность независимо от

ингибирования NKCC1. Это обстоятельство существенно затрудняет проверку данной гипотезы.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ NKCC1 ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Было обнаружено, что ингибирующее действие буметанида на сокращение брыжеечных артерий в ответ на активацию фенилэфрином  $\alpha$ -адренергических рецепторов увеличено у гипертензивных крыс SHR по отношению к нормотензивному контролю [87, 88]. Механизмы, приводящие к активации NKCC1 при первичной гипертензии, остаются малоизученными, что, по-видимому, отражает как полигенно-мозаичную природу этой болезни, так и множественные механизмы регуляции активности этого переносчика. Так, например, прирост  $[Ca^{2+}]_i$  активирует, а cAMP ингибирует активность этого переносчика в ГМК [8, 89, 90]. Многочисленные исследования документировали при первичной гипертензии нарушения в обеих сигнальных системах [91, 92]. Ключевая роль WNK, SPAK и OSR1 киназ в регуляции активности CCC, включая NKCC1, NKCC2 и NCC, рассмотрена нами ранее [85], а их участие в регуляции артериального давления продемонстрировано на примере моногенных гипертензий [93, 94] и генетически модифицированных животных [95]. Так, S. Bergaya и соавт. сообщили, что у *Wnk<sup>+</sup>*-мышей снижено фосфорилирование NKCC1 и наблюдается рост артериального давления в ответ на активацию  $\alpha$ -адренергических рецепторов [96]. Буметанид-чувствительная компонента сокращения сосудов была также снижена у мышей, накаутированных по SPAK [97]. Следует, однако, отметить, что в отличие от моногенных гипертензий, мутаций генов CCC и регуляторного каскада WNK/SPAK/OSR1 при первичной гипертензии не обнаружено.

Недавно проведенные исследования показали, что содержания как NKCC1mPHK, так и NKCC1 белка увеличено в аорте, сердце и нейронах ПВЯ крыс со спонтанной гипертензией [87, 98]. По крайней мере, в случае аорты и сердца SHR повышенная экспрессия этого переносчика сопровождается снижением метилирования промотора NKCC1 гена [87]. Следует также отметить, что метилирование NKCC1 промотора увеличивалось с возрастом у нормотензивных и не изменялось у гипертензивных животных [88]. Было также установлено, что активность ДНК метилтрансферазы 3B (DNTB3B) в 3 раза выше у 18-недельных нормотензивных крыс по сравнению с SHR того же возраста. Эти исследования предполагают, что

при экспериментальной модели первичной гипертензии гипометилирование NKCC1 промотора является следствием снижения активности DNTB3B, что в свою очередь приводит к повышению экспрессии NKCC1, увеличению  $[Cl^-]_i$ , сосудистого тонуса и системного АД, а также деполяризации ГМК. Роль эпигенетических факторов в повышении экспрессии NKCC1 в нейронной ПВЯ SHR, определяющих увеличение активности СНС, остается неисследованной. Было обнаружено, однако, что в этих клетках повышено гликозилирование NKCC1 [98], что, по-видимому, способствует увеличению содержания мембранно-связанного белка, т.е. той его фракции, которая принимает участие в транспорте одновалентных ионов.

## ИНГИБИРОВАНИЕ NKCC1 СОПРОВОЖДАЕТСЯ ПОДАВЛЕНИЕМ МИОГЕННОГО ОТВЕТА

Основной причиной преждевременной смерти больных гипертонической болезнью является долгосрочное воздействие повышенного АД на такие органы-мишени, как сосуды головного мозга и почек [99]. В первом случае увеличивается вероятность необратимого нарушения кровотока и возникновения инсульта, а во втором – структурные изменения нефрона приводят к нарушениям водно-солевого гомеостаза и протеинурии [100].

Под миогенным тонусом (ответом) понимается уникальное свойство сосудов с диаметром  $<100\text{--}200$  мкм: вслед за незначительным увеличением диаметра в ответ на прирост давления заполняющей их жидкости радиус таких сосудов существенно уменьшается. Было установлено, что буметанид уменьшает миогенный тонус брыжеечных артерий [101] и полностью устраняет миогенный ответ афферентных артериол почек [78]. В нашей лаборатории было обнаружено, что ингибирующее действие буметанида, но не ингибитора потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  каналов L-типа никардипина на миогенный тонус, а также сокращение в ответ на  $\alpha$ -адренергическую стимуляцию отсутствует в брыжеечных артериях, изолированных NKCC1<sup>-/-</sup> мышей [101]. Так как NKCC2 в ГМК отсутствует, полученные данные можно рассматривать как доказательство того, что буметанид и другие петлевые диуретики подавляют сокращение и миогенный ответ ГМК сосудов через взаимодействие с универсальной изоформой  $Na^+, K^+, 2Cl^-$  котранспорта NKCC1.

Так как  $R_{bf} \sim 1/d^4$ , где  $R_{bf}$  – сопротивление потоку крови и  $d$  – диаметр просвета сосуда [102], роль миогенного тонуса сосудов как созданного природой инструмента защиты органов-мишеней от повышения системного АД изучалось



многими исследователями [103]. Было установлено, что длительное подавление миогенного ответа как следствие гипертрофии сосудистой стенки, отмеченное у больных гипертонической болезнью, понижает чувствительность миогенного ответа к изменениям внутрисосудистого давления, в результате чего скачки системного АД передаются в микроциркуляторное русло, инкорпорированное в головной мозг, сердце, сетчатку глаза, почки и другие органы, что приводит к необратимым изменениям в их структурно-функциональной организации [104, 105]. В этой связи действие антигипертензивных препаратов на миогенный тонус сосудов требует обстоятельного изучения.

Для изучения роли миогенного ответа в функционировании почек была разработана модель изолированной перфузируемой почки, которая позволяет исследовать особенности микроциркуляторной системы этого органа в отсутствие воздействия на нее юктагломерулярного аппарата. С помощью этой модели было установлено, что буметанид полностью подавляет миогенный ответ афферентной артериолы почек крысы [78]. Результаты этих исследований, рассмотренные в совокупности с данными об отсутствии миогенного ответа у  $Nkcc1^{-/-}$  мышей [101], позволили нам предположить, что увеличенная активность НКСС1, документированная при первичной гипертензии на примере эритроцитов, защищает почки от разрушающего воздействия повышенного артериального давления, в то время как хроническое использование фуросемида и других ингибиторов НКСС ускоряет развитие почечной недостаточности, в том числе протеинурии [54, 55, 106]. Иными словами, высокая активность НКСС1 в ГМК афферентной артериолы обеспечивает постоянство почечного кровотока в условиях повышения системного АД, обусловленного увеличенной активностью этого переносчика в брыжеечных артериях и других сосудах, принимающих участие в формировании периферического сопротивления большого круга кровообращения. Эта гипотеза согласуется с 4-кратным увеличением частоты почечных осложнений у больных гипертензией негроидной расы [107, 108], в эритроцитах которых активность НКСС1 в 3 раза ниже по сравнению с больными кавказской расы [106, 109].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы кратко изложили историю открытия нарушений ионного транспорта при первичной гипертензии и сведения о молекулярной природе ионных транспортеров, лежащих в основе этих

нарушений. Данные, рассмотренные выше, показывают, что фуросемид и другие петлевые диуретики снижают системное артериальное давление не только за счет ингибирования НКСС2 в восходящем отделе петли Генле, но и подавления активности НКСС1 в ГМК резистентных сосудов. Однако эти же соединения подавляют миогенный ответ ГМК микроциркуляторного русла почек, увеличивая тем самым риск возникновения почечных осложнений. В этой связи мы полагаем, что последующие исследования в данном направлении надо сфокусировать на решении следующих вопросов.

В культуре ГМК и в изолированных сосудах НКСС1 активируется такими вазоконстрикторами, как фенилэфрин и ангиотензин II, и ингибируется вазодилаторами, чье действие опосредовано активацией системы цАМФ [81, 89]. Вовлечена ли эта реципрокная регуляция НКСС1 в изменения сосудистого тонуса указанными выше соединениями?

Ключевая роль НКСС1 в регуляции миогенного ответа ГМК афферентной артериолы почек твердо установлена. Каково относительное участие НКСС1 в регуляции миогенного ответа ГМК микроциркуляторного русла головного мозга и других органов-мишеней? Эти исследования должны привести к разработке новых средств нормализации артериального давления, которые будут лишены побочных эффектов, связанных с ингибированием транспорта ионов в клетках эпителия и миогенного ответа ГМК. Используемые в настоящее время лекарства обладают одинаковым сродством к НКСС1 и НКСС2. Так как кажущееся сродство этих переносчиков как к фуросемиду, так и к буметаниду возрастает по мере увеличения их активности [110], ингибирование высокоактивного НКСС2, а следовательно, и диуретическое действие этих соединений должны доминировать по отношению к их сосудорасширяющему эффекту. Длительное использование этих соединений также нежелательно в связи с ингибированием НКСС1 в эпителии внутреннего уха, что сопровождается потерей слуха [111, 112]. Таким образом, разработка новых тканеспецифических ингибиторов НКСС представляется более рациональным подходом антигипертензивной терапии.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Орлов С.Н., Данилов В.С., Малков А.Ю., Ребров В.Г. Свободнорадикальное окисление липидов биологических мембран. V. Флуоресценция жирных кислот и фосфолипидов. *Биофизика*. 1975; 20 (2): 228–232.

- [Orlov S.N., Danilov V.S., Malkov A.Yu., Rebrov V.G. Free radical lipid oxidation of biological membranes. V(?). Fluorescence of fatty acids and phospholipids. *Biophysics*. 1975; 20 (2): 228–232].
2. Jones A.W. Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Influence of Aldosterone, Norepinephrine and Angiotensin*. 1973; 33: 563–572.
3. Folkow B., Grimby G., Thulesius O. Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. *Acta Physiol. Scand.* 1958; 44 (3–4): 255–272.
4. Постнов Ю.В., Орлов С.Н., Шевченко А.С. Изменение проницаемости мембраны эритроцитов у крыс со спонтанной гипертензией. *Кардиология*. 1975; 15 (1): 88–92. [Postnov Yu.V., Orlov S.N., Shevchenko A.S. Change in erythrocyte membrane permeability in rats with spontaneous hypertension. *Cardiology*. 1975; 15 (1): 88–92 (in Russ.)].
5. Postnov Yu.V., Orlov S.N., Gulak P.V., Shevchenko A.S. Altered permeability of the erythrocyte membrane for sodium and potassium in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Archiv*. 1976; 365 (2–3): 257–263.
6. Ben-Ishay D., Aviram A., Viskoper R. Increased erythrocytes sodium efflux in genetic hypertensive rat of the Hebrew University strain. *Experientia*. 1975; 31 (6): 660–662.
7. Friedman S.M., Nakashima M., McIndoe R.A., Friedman C.L. Increased erythrocyte permeability to Li and Na in the spontaneously hypertensive rats. *Experientia*. 1976; 32(4): 476–478.
8. Friedman S.M., Nakashima M., McIndoe R.A. Glass electrode measurement of net Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes in erythrocytes of the spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1977; 55 (6): 1302–1310.
9. Postnov Yu.V., Orlov S.N., Shevchenko A.S., Adler A.M. Altered sodium permeability, calcium binding and Na-K-ATPase activity in the red blood cell membrane in essential hypertension. *Pflugers Archiv*. 1977; 371 (3): 263–269.
10. Orlov S.N., Riazhski G.G., Kravtsov G.M., Postnov Yu.V. Relation between abnormalities of erythrocyte membrane permeability for monovalent ions and intracellular distribution of calcium in primary hypertension. *Kardiologiya*. 1984; 24 (3): 87–95.
11. Postnov Yu.V., Orlov S.N. Cell membrane alteration as source of primary hypertension. *J. Hypertens.* 1984; 2 (1): 1–6.
12. Postnov Yu.V., Orlov S.N. Ion transport across plasma membrane in primary hypertension. *Physiol. Rev.* 1985; 65 (4): 904–945.
13. Orlov S.N., Adragna N., Adarichev V.A., Hamet P. Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension. *Am. J. Physiol.* 1999; 276 (3): C511–C536. DOI: 10.1152/ajp-cell.1999.276.3.C511.
14. Orlov S.N. Hypertension. In: Bernhardt I., Ellory J.C. (Eds). *Red cell membrane transport in health and disease*. Berlin, Springer, 2003; 587–602.
15. Постнов Ю.В., Орлов С.Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. М.: Медицина, 1987: 192. [Postnov Yu.V., Orlov S.N. Primary hypertension as the pathology of cell membranes. Moscow: Medicine Publ., 1987: 192 (in Russ.)].
16. Postnov Yu.V., Orlov S.N. Alteration of cell membrane in primary hypertension. In: Jenest J., Kuchel O., Hamet P., Cantin M. (Eds). *Hypertension. Physiolopathology and treatment*. New York: McGraw-Hill, 1983; 95–108.
17. Orlov S.N., Mongin A.A. Salt sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (4): H2039–H2053.
18. Schermann J., Briggs J.P. Tubuloglomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice. *Kidney Int.* 2008; 74 (4): 418–426. DOI: 10.1038/ki.2008.145.
19. Noda M., Hiyama T.Y. Sodium sensing in the brain. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2015; 467 (3): 465–474. DOI: 10.1007/s00424-014-1662-4.
20. Zicha J. Red cell ion transport abnormalities in experimental hypertension. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1993; 7(3–4): 129–141.
21. Zidek V., Vetter H., Zunkley H. Intracellular cation activities and concentrations in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clin. Sci.* 1981; 61 (Suppl. 1): 41–43.
22. Orlov S.N., Pokudin N.I., Kotelevtsev Yu.V., Postnov Yu.V. Characteristics of the structural-functional organization of erythrocyte membrane in three strains of spontaneously hypertensive rats. *Kardiologiya*. 1988; 28 (1): 57–63.
23. Yokomatsu M., Fujito K., Numahata H., Koide H. Erythrocyte sodium ion transport system in DOC-salt, goldblatt and spontaneously hypertensive rats. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1992; 52 (6): 497–506.
24. Pravenec M., Klir P., Kren V., Zicha J., Kunes J. An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J. Hypertens.* 1989; 7(7): 217–221.
25. Orlov S.N., Petrunyaka V.V., Kotelevtsev Yu.V., Postnov Yu.V., Kunes J., Zicha J. Cation transport and adenosine triphosphatase activity in rat erythrocytes: a comparison of spontaneously hypertensive rats with normotensive Brown Norway strain. *J. Hypertens.* 1991; 9 (10): 977–982.
26. Salvati P., Ferrario R.G., Parenti P., Bianchi G. Renal function of isolated perfused kidneys from hypertensive (MHS) and normotensive (MNS) rats of the Milan strain: role of calcium. *J. Hypertens.* 1987; 5 (1): 31–38.
27. Bianchi G., Ferrari P., Trizio P. et al. Red blood cell abnormalities and spontaneous hypertension in rats. A genetically determined link. *Hypertension*. 1985; 7 (3 Pt. 1): 319–325.
28. Rapp J.P., Dene H. Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension*. 1985; 7 (3 Pt. 1): 340–349.

29. Zicha J., Duhm J. Kinetics of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  transport in red blood cells of Dahl rats. Effect of age and salt. *Hypertension*. 1990; 15 (6 Pt 1): 612–627.
30. McCormick C.P., Hennessy J.F., Rauch A.L., Buckalew V.M. Erythrocyte sodium concentration and  $^{86}\text{Rb}$  in weanling Dahl rats. *Am. J. Hypertens.* 1989; 2 (8): 604–609.
31. Akera T., Ng Y.-C., Shien I.-S., Bero E., Brody T.M., Braselton W.E. Effects of  $\text{K}^+$  on the interaction between cardiac glycosides and  $\text{Na,K-ATPase}$ . *Eur. J. Pharmacol.* 1985; 111 (2): 147–157.
32. Zicha J., Dobesova Z., Vokurkova M., Kunes J. Abnormal  $\text{Na,K-pump}$  activity cosegregates with blood pressure in Dahl SS/Jr x SR/Jr F2 hybrids fed a high-salt diet since weaning (Abstract). *Hypertension*. 1999; 34: 708.
33. Orlov S.N., Akimova O.A., Hamet P. Cardiotonic steroids: novel mechanisms of  $\text{Na}^+$ -mediated and -independent signaling involved in the regulation of gene expression, proliferation and cell death. *Curr. Hypertens. Rev.* 2005; 1: 243–257.
34. Leenen F.H.H. The central role of the brain aldosterone-«ouabain» pathway in salt-sensitive hypertension. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010; 1802 (12): 1132–1139. DOI: 10.1016/j.bbdis.2010.03.004.
35. Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 2009; 61 (1): 9–38. DOI: 10.1124/pr.108.000711.
36. Blaustein M.P., Zhang J., Chen L., Hamilton B.P. How does salt retention raise blood pressure? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006; 290 (3): R514–R523.
37. Canessa M.L., Adragna N., Solomon H.S., Connolly T.M., Tosteson D.C. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *New Engl. J. Med.* 1980; 302 (14): 772–776.
38. Elmariah S., Gunn R.B. Kinetic evidence that the  $\text{Na-PO}_4$  cotransporter is the molecular mechanism for  $\text{Na/Li}$  exchange in human red blood cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003; 285 (2): C446–C456.
39. Кольцова С.В., Акимова О.А., Котелевцев С.В., Хамет П., Орлов С.Н. Увеличенный  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  противотранспорт в эритроцитах больных гипертонической болезнью не опосредован активацией  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  котранспорта. *Артериальная гипертензия*. 2010; 16 (4): 385–389. [Koltsova S.V., Akimova O.A., Kotelevtsev S.V., Khamet P., Orlov S.N. An increased  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  countertransport in the erythrocytes of patients with hypertensive disease is not mediated by the activation of  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  co-transport. *Arterial hypertension*. 2010; 16 (4): 385–389] (in Russ.).
40. Koltsova S.V., Trushina Yu.A., Akimova O.A., Hamet P., Orlov S.N. Molecular origin of  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  exchanger: evidence against the involvement of major cloned erythrocyte transporters. *Pathophysiology*. 2011; 18 (3): 207–213. DOI: 10.1016/j.pathophys.2010.12.001.
41. Orlov S.N., Pokudin N.I., Ryazhskii G.G., Kotelevtsev Yu.V. Valinomycin induces  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in rat erythrocytes: peculiarities of the effect of protein kinase A and C. *Biol. Membr.* 1987; 4: 1036–1046.
42. Orlov S.N., Pokudin N.I., Kotelevtsev Yu.V., Gulak P.V. Volume-dependent regulation of ion transport and membrane phosphorylation in human and rat erythrocytes. *J. Membrane Biol.* 1989; 107: 105–117.
43. Wooden J.M., Finney G.L., Rynes E. et al. Comparative proteomics reveals deficiency of *SLC9A1* (sodium/hydrogen exchanger NHE1) in b-adducin null red cells. *Br. J. Haematol.* 2011; 154: 492–501. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08612.x.
44. Geering K.  $\text{Na,K-ATPase}$ . *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.* 1997; 6 (5): 434–439.
45. Orlov S.N., Postnov I.Yu., Pokudin N.I., Kukharengo V.Yu., Postnov Yu.V.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and other ion transport systems in erythrocytes of essential hypertensives and spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 1989; 7 (10): 781–788.
46. Pontremoli R., Spalvins A., Menachery A., Torielli L., Canessa M. Red cell sodium-proton exchange is increased in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Kidney Int.* 1992; 42 (6): 1335–1362.
47. Orlov S.N., Kuznetsov S.R., Pokudin N.I., Tremblay J., Hamet P. Can we use erythrocytes for the study of the activity of ubiquitous  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE-1) in essential hypertension? *Am. J. Hypertens.* 1998; 11 (7): 774–783.
48. Niu J., Vaikunaite R., Suzuki N. et al. Interaction of heterotrimeric G13 protein with an A-kinase-anchoring protein 110 (AKAP110) mediates cAMP-independent PKA activation. *Curr. Biol.* 2001; 11 (21): 1688–1690.
49. Orlov S.N., Adarichev V.A., Devlin A.M. et al. Increased  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform 1 activity in spontaneously hypertensive rats: lack of mutations within coding region of NHE1. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000; 1500 (2): 169–180.
50. Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.-B., Rolfs A., Takanaga H., Bruford E.A. The ABCs of solute carriers: physiological, pathophysiological and therapeutic implications of human membrane transport protein. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2004; 447 (5): 465–468.
51. Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol. Rev.* 2005; 85 (2): 423–493.
52. Markadieu N., Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2014; 466 (1): 91–105. DOI: 10.1007/s00424-013-1370-5.
53. Garay R.P., Alda O. What can we learn from erythrocyte  $\text{Na-K-Cl}$  cotransporter NKCC1 in human hypertension. *Pathophysiology*. 2007; 14 (3–4): 167–170.
54. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. NKCC1 and hypertension: a novel therapeutic target involved in regulation of vascular tone and renal function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.* 2010; 19 (2): 163–168. DOI: 10.1097/MNH.0b013e3283360a46.

55. Orlov S.N., Koltsova S.V., Tremblay J., Baskakov M.B., Hamet P. NKCC1 and hypertension: role in the regulation of vascular smooth muscle contractions and myogenic tone. *Ann. Med.* 2012; 44: S111–S118. DOI: 10.3109/07853890.2011.653395.
56. Kotelevtsev Yu.V., Orlov S.N., Pokudin N.I., Agnaev V.M., Postnov Yu.V. Genetic analysis of inheritance of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  cotransport, calcium level in erythrocytes and blood pressure in F2 hybrids of spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1987; 103: 456–458.
57. Flagella M., Clarke L.L., Miller M.L. et al. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (38): 26946–26955.
58. Meyer J.W., Flagella M., Sutliff R.L. et al. Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransporter. *Am. J. Physiol.* 2002; 283 (5): H1846–H1855.
59. Wall S.M., Knepper M.A., Hassel K.A. et al. Hypotension in NKCC1 null mice: role of the kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2006; 290 (2): F409–F416.
60. Kim S.M., Eisner C., Faulhaber-Walter R. et al. Salt sensitivity of blood pressure in NKCC1-deficient mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2008; 295 (4): F1230–F1238. DOI: 10.1152/ajprenal.90392.2008.
61. Garg P., Martin C., Elms S.C. et al. Effect of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 on systematic blood pressure and smooth muscle tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292 (5): H2100–H2105.
62. Lominadze D., Joshua I.G., Schuschke D.A. Blood flow shear rates in arterioles of spontaneously hypertensive rats at early and established stages of hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 2011; 23: 317–328.
63. Hussein G., Goto H., Oda S. et al. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: II Vascular reactivity and hemotheology in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2015; 28: 967–971.
64. Plotnikov M.B., Aliev O.I., Shamanaev A.Y. et al. Effects of pentoxifylline on hemodynamic, hemorheological, and microcirculatory parameters in young SHR during arterial hypertension development. *Clin. Exp. Hypertens.* 2017; 39: 570–578.
65. Orlov S.N., Gulak P.V., Litvinov I.S., Postnov Yu.V. Evidence of altered structure of the erythrocyte membrane in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* 1982; 63: 43–45.
66. Gulak P.V., Orlov S.N., Pokudin N.I. et al. Microcalorimetry and electrophoresis of the erythrocyte membrane of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 1984; 2 (1): 81–84.
67. Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Dulin N.O. NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension. *Genes & Diseases.* 2015; 2 (2): 186–196.
68. Chipperfield A.R., Harper A.A. Chloride in smooth muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2001; 74 (3–5): 175–221.
69. Davis J.P.L., Chipperfield A.R., Harper A.A. Accumulation of intracellular chloride by (Na-K-Cl) cotransport in rat arterial smooth muscle is enhanced in deoxycorticosterone acetate (DOCA) / salt hypertension. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1993; 25 (3): 233–237.
70. Anfinogenova Y.J., Baskakov M.B., Kovalev I.V., Kilin A.A., Dulin N.O., Orlov S.N. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransport, intracellular  $\text{Cl}^-$  and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Pflugers. Arch. – Eur. J. Physiol.* 2004; 449 (1): 42–55.
71. Barthelmebs M., Stephan D., Fontaine C., Grima M., Imbs J.L. Vascular effects of loop diuretics: an *in vivo* and *in vitro* study in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 1994; 349 (2): 209–216.
72. Lavalley S.L., Iwamoto L.M., Claybaugh J.R., Dressel M.V., Sato A.K., Nakamura K.T. Furosemide-induced airway relaxation in guinea pigs: relation to Na-K-2Cl cotransporter function. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: L211–L216.
73. Tian R., Aalkjaer C., Andreassen F. Mechanisms behind the relaxing effect of furosemide on the isolated rabbit ear artery. *Pharmacol. Toxicol.* 1990; 67 (5): 406–410.
74. Kovalev I.V., Baskakov M.B., Anfinogenova Y.J. et al. Effect of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransport inhibitor bumetanide on electrical and contractile activity of smooth muscle cells in guinea pig ureter. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003; 136 (8): 145–149.
75. Kovalev I.V., Baskakov M.B., Medvedev M.A. et al.  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransport and chloride permeability of the cell membrane in mezaton and histamine regulation of electrical and contractile activity in smooth muscle cells from the guinea pig ureter. *Russian Physiol. J.* 2008; 93 (3): 306–317.
76. Stanke F., Devillier P., Breant D. et al. Furosemide inhibits angiotensin II-induced contraction on human vascular smooth muscle. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998; 46 (6): 571–575.
77. Stanke-Labesque F., Craciowski J.L., Bedouch P. et al. Furosemide inhibits thromboxane A2-induced contraction in isolated human internal artery and saphenous vein. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35: 531–537.
78. Wang X., Breaks J., Loutzenhiser K., Loutzenhiser R. Effects of inhibition of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransporter on myogenic and angiotensin II responses of the rat afferent arteriole. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2007; 292: F999–F1006.
79. Mozhayeva M.G., Bagrov Y.Y. The inhibitory effects of furosemide on  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathways associated with oxytocin-induced contractions of rat myometrium. *Gen. Physiol. Biophys.* 1995; 14 (5): 427–436.
80. Mozhayeva M.G., Bagrov Y.Y., Ostretsova I.B., Gillespie J.I. The effect of furosemide on oxytocin-induced contractions of the rat myometrium. *Exp. Physiol.* 1994; 79 (5): 661–667.
81. Akar F., Skinner E., Klein J.D., Jena M., Paul R.J., O'Neill W.C. Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransporter in rat aor-

- ta. *Am. J. Physiol.* 1999; 276 (6): C1383–C1390. DOI: 10.1152/ajpcell.1999.276.6.C1383.
82. Palacios J., Espinoza F., Munita C., Cifuentes F., Michea L.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter is implicated in gender differences in the response of the rat aorta to phenylephrine. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 148 (7): 964–972.
  83. Koltsova S.V., Maximov G.V., Kotelevtsev S.V. et al. Myogenic tone in mouse mesenteric arteries: evidence for P2Y receptor-mediated,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransport-dependent signaling. *Purinergic Signaling.* 2009; 5 (3): 343–349. DOI: 10.1007/s11302-009-9160-4.
  84. Koltsova S.V., Luneva O.G., Lavoie J.L. et al.  $\text{HCO}_3^-$ -dependent impact of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransport in vascular smooth muscle excitation-contraction coupling. *Cell Physiol. Biochem.* 2009; 23 (4–6): 407–414. DOI: 10.1159/000218187.
  85. Орлов С.Н., Кольцова С.В., Капилевич Л.В., Дулин Н.О., Гусакова С.В. Котранспортеры катионов и хлора: регуляция, физиологическое значение и роль в патогенезе артериальной гипертензии. *Успехи биологической химии.* 2014; 54: 267–298. [Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Dulin N.O., Gusakova S.V. Cotransporters of cations and chlorine: regulation, physiological significance and role in the pathogenesis of arterial hypertension. *Advances in Biological Chemistry.* 2014; 54: 267–298 (in Russ.)].
  86. Korpi E.R., Luddens H. Furosemide interactions with brain GABAA receptors. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 741–748.
  87. Lee H.-A., Baek I., Seok Y.M. et al. Promoter hypomethylation upregulates  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter 1 in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 396 (2): 252–257. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.074.
  88. Cho H.-M., Lee H.-A., Kim H.Y., Han H.S., Kim I.K. Expression of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter is epigenetically regulated during postnatal development of hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2011; 24 (12): 1286–1293. DOI: 10.1038/ajh.2011.136.
  89. Orlov S.N., Resink T.J., Bernhardt J., Buhler F.R.  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pump and  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  co-transport in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: baseline activity and regulation. *J. Hypertens.* 1992; 10 (8): 733–740.
  90. Jiang G., Cobbs S., Klein J.D., O'Neill W.C. Aldosterone regulates the Na-K-Cl cotransporter in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 2003; 41 (5): 1131–1135.
  91. Orlov S.N., Li J.-M., Tremblay J., Hamet P. Genes of intracellular calcium metabolism and blood pressure control in primary hypertension. *Seminars in Nephrology.* 1995; 15 (6): 569–592.
  92. Hamet P., Orlov S.N., Tremblay J. Intracellular signalling mechanisms in hypertension. In: Laragh J.H., Brenner B.M. (Eds). Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and treatment. New York, Raven Press, 1995: 575–608.
  93. Kahle K.T., Rinehart J., Giebisch G., Gamba G., Hebert S.C., Lifton R.P. A novel protein kinase signaling pathway essential for blood pressure regulation in humans. *Trends Endocrin. Metab.* 2008; 19 (3): 91–95. DOI: 10.1016/j.tem.2008.01.001.
  94. Susa K., Kita S., Iwamoto T. et al. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin. Exp. Nephrol.* 2012; 16 (4): 530–538.
  95. Rafiqi F.H., Zuber A.M., Glover M. et al. Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO Mol. Med.* 2010; 2 (2): 63–75. DOI: 10.1002/emmm.200900058.
  96. Bergaya S., Faure S., Baudrie V. et al. WNK1 regulates vasoconstriction and blood pressure response to  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation in mice. *Hypertension.* 2011; 58 (3): 439–445. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONA-HA.111.172429.
  97. Yang S.-S., Lo Y.-F., Wu C.-C. et al. SPAK-knockout mice manifest Gitelman syndrome and impaired vasoconstriction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21 (11): 1868–1877. DOI: 10.1681/ASN.2009121295.
  98. Ye Z.-Y., Li D.-P., Byun H.S., Li L., Pan H.-L. NKCC1 upregulation disrupts chloride homeostasis in the hypothalamus and increases neuronal-sympathetic drive in hypertension. *J. Neurosci.* 2012; 32 (25): 8560–8568. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1346-12.2012.
  99. Janardhan V., Qureshi A.I. Mechanisms of ischemic brain injury. *Curr. Cardiol. Rep.* 2004; 6 (2): 117–123.
  100. O'Shaughnessy K.M., Karet F.E. Salt handling in hypertension. *Annu. Rev. Nutr.* 2006; 26: 343–365.
  101. Koltsova S.V., Kotelevtsev S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. Excitation-contraction coupling in resistant mesenteric arteries: evidence for NKCC1-mediated pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 379 (4): 1080–1083. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.018.
  102. Folkow B. Cardiovascular «remodeling» in rat and human: time axis, extent, and in vivo relevance. *Physiology.* 2010; 25 (5): 264–265. DOI: 10.1152/physiol.00015.2010.
  103. Loutzenhiser R., Griffin K., Williamson G., Bidani A. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006; 290 (5): R1153–R1167.
  104. Liu Y., Gutterman D.D. Vascular control in humans: focus on the coronary microcirculation. *Basic Res. Cardiol.* 2009; 104 (3): 211–227. DOI: 10.1007/s00395-009-0775-y.
  105. Bidani A., Griffin K.A., Williamson G., Wang X., Loutzenhiser R. Protective importance of the myogenic response in the renal circulation. *Hypertension.* 2009; 54 (2): 393–398. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONA-HA.109.133777.
  106. Orlov S.N. Decreased  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  cotransport and salt retention in blacks: a provocative hypothesis. *J. Hypertens.* 2005; 23 (10): 1929–1930.
  107. Boone C.A. End-stage renal disease in African-Americans. *Nephrol. Nurs. J.* 2000; 27 (6): 597–600.

108. Kotchen T.A., Piering A.W., Cowley A.W. et al. Glomerular hyperfiltration in hypertensive African Americans. *Hypertension*. 2000; 35 (3): 822–826.
109. Orlov S.N., Gossard F., Pausova Z. et al. Decreased NKCC1 activity in erythrocytes from African-Americans with hypertension and dyslipidemia. *Am. J. Hypertens* 2010; 23 (3): 321–326. DOI: 10.1038/ajh.2009.249.
110. Hannaert P., Alvarez-Guerra M., Pirot D., Nazaret C., Garay R.P. Rat NKCC2/NKCC1 cotransport selectivity for loop diuretic drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2002; 365 (3): 193–199.
111. Delpire E., Lu J., England R., Dull C., Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nature Genetics*. 1999; 22 (2): 192–195.
112. Lang F., Vallon V., Knipper M., Wangemann P. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 293 (4): C1187–C1208.

## Сведения об авторе

Орлов Сергей Николаевич, д-р биол наук, профессор, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; НИ ТГУ, г. Томск; СибГМУ, г. Томск.

(✉) Орлов Сергей Николаевич, sergeiorlov@yandex.ru.

Поступила в редакцию 21.12.2018  
Подписана в печать 15.04.2019

## Author information

Orlov Sergey N., DBSc, Professor, Lomonosov Moscow State University, Moscow; National Research Tomsk State University, Tomsk; Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Orlov Sergey N., sergeiorlov@yandex.ru.

Received 21.12.2018  
Accepted 15.04.2019

## Возможности применения протеомного анализа в инфектологии

Страшникова Н.С., Мартынова Г.П., Салмина А.Б.,  
Оловянникова Р.Я., Кутяков В.А., Тохидпур А.

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

*Красноярская межрайонная детская больница № 1  
Россия, 660111, г. Красноярск, ул. Тельмана, 49*

### РЕЗЮМЕ

Современные методы диагностики и лечения инфекционных заболеваний должны базироваться на достоверных данных, полученных с помощью различных методов лабораторных исследований. Основными характеристиками, предъявляемыми к используемым методам, являются высокая чувствительность (возможность анализа малого количества образца,  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  г/мл), избирательность (селективность), воспроизводимость и др. Протеомные методы исследований удовлетворяют всем принципам доказательной медицины. Преимущества использования указанных методов для выявления маркеров (выявление белков с измененным уровнем экспрессии), своевременной диагностики и лечения инфекционных заболеваний, описанные в статье, очевидны, их внедрение в практическую деятельность врачей – элемент персонализированной медицины.

**Цель:** изучить возможности применения протеомного анализа в инфектологии, основные методы исследований, их характеристики, преимущества и недостатки.

**Ключевые слова:** протеомика, белки-маркеры, инфектология, диагностика.

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

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

**Для цитирования:** Страшникова Н.С., Мартынова Г.П., Салмина А.Б., Оловянникова Р.Я., Кутяков В.А., Тохидпур А. Возможности применения протеомного анализа в инфектологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 248–261. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-248-261>.

## Possibilities of using proteomic analysis in infectiology

Strashnikova N.S., Martynova G.P., Salmina A.B.,  
Olovyannikova R.Ya., Kutyakov V.A., Tohidpur A.

*Krasnoyarsk State Medical University (KSMU) named after Professor V.F. Vojno-Yasenetsky  
1, Partizana Zheleznyaka Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation*



Krasnoyarsk Interdistrict Children's Hospital No. 1.  
49, Telmana Str., 660111, Krasnoyarsk, Russian Federation

#### ABSTRACT

Modern methods of diagnosis and treatment of infectious diseases should be based on reliable data obtained through various methods of laboratory research. The main characteristics of the methods used are high sensitivity (the ability to analyze a small amount of sample,  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  g/ml), selectivity, reproducibility and others. Proteomic methods of research satisfy all the principles of evidence-based medicine. The advantages of using these methods to identify biomarkers (identifying proteins with altered expression levels), timely diagnosis and treatment of infectious diseases, described in the article, are obvious. Their introduction into practice is an element of personalized medicine.

**Objective:** to study the possibilities of using proteomic analysis in infectiology, the main research methods, their characteristics, advantages and disadvantages.

**Key words:** proteomics, protein-markers, diagnostics.

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

**Source of financing.** The authors state that there is no funding for the study.

**For citation:** Strashnikova N.S., Martynova G.P., Salmina A.B., Olovyannikova R.Ya., Kutyaev V.A., Tohidpur A. Possibilities of using proteomic analysis in infectiology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 248–261. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-248-261>.

## ВВЕДЕНИЕ

В постгеномную эру актуальными становятся широкомасштабные исследования фундаментальных процессов в живых системах, а именно изучение различных уровней структурно-функциональной организации геномов, ее малых молекул (метаболизма), исследование белков (протеомика) [1]. Протеомика – это наука, изучающая белковый состав биологических объектов, а также модификации и структурно-функциональные свойства белковых молекул. Протеомный анализ направлен на одновременное изучение многих индивидуальных белков, совокупность которых составляет определенную систему, что характеризует исследуемый объект в целом [2]. Благодаря успехам протеомики теперь в патологически измененных тканях можно видеть диспропорцию между белками [3]. Также протеомика занимается системным исследованием структуры, функции и активности белков, белок-белковых взаимодействий, определяет уровни экспрессии генов [4].

Термин «протеомика» был введен в 1995 г. и происходит от терминов *proteins* и *genome* (в пер. с англ. – белки и геном) [1]. После расшифровки генома человека и геномов многих других организмов появилось большое разнообразие баз данных о структуре всех белков человека и многих других организмов. Развитие протеомики обусловлено использованием высокотехнологичных методов, позволяющих идентифицировать белки

и пептиды, измерить их концентрацию в образцах, распознать первичную структуру и посттрансляционные модификации. В настоящее время большая часть работ в протеомике выполняется с использованием двумерного гель-электрофореза в полиакриламиде (2-D PAGE) метода, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрией [2].

В течение последнего десятилетия протеомные технологии стали эффективными инструментами в трансляционных и клинических исследованиях в инфектологии. Интеграция протеомики с другими методами биохимической и молекулярной биологии (с достижениями геномики и биоинформатики) расширила набор инструментов для изучения молекулярного патогенеза инфекционных болезней [5].

## ВИДЫ ПРОТЕОМИКИ И ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ: ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

Существует множество направлений в протеомных исследованиях. Одним из них является субклеточная протеомика, которая изучает локализацию и местонахождение белков в живой клетке. Функциональная протеомика определяет функции белков и межбелковых взаимодействий. Разницу в экспрессии белков устанавливают с помощью количественного определения белков. Одним из направлений является выявление

скрининговых и диагностических маркеров, белков, измененный уровень экспрессии которых может послужить средством ранней доклинической диагностики заболеваний. Определение «белков-мишеней» (определение патологически измененных белков, целевое воздействие на которые фармацевтическими средствами может скорректировать течение болезней) стало возможным благодаря успехам протеомики [6].

Современные методы исследования белков базируются на хроматографических методах, в частности ВЭЖХ [7, 8]. Метод 2-D PAGE, разработанный О. Фареллом в 1975 г., представляет собой метод разделения белков, в основу которого положены их физические свойства: заряд и масса. В одном эксперименте можно разделить более 2 000 белков и их модифицированных изоформ, а теоретическая разрешающая способность может достигать 10 000 белков. Основное преимущество метода – возможность разделения и визуализации белков, поэтому его можно применять и для оценки количества идентифицированных белковых молекул. Одним из недостатков метода является его сложная воспроизводимость [2, 9].

Изотопные методы исследования основаны на использовании изотопной метки (стабильных изотопов), вводимой в молекулу. Выделяют следующие этапы: изотопное мечение белковых смесей, ферментативное расщепление дифференциально меченных смесей, разделение пептидов многомерной жидкостной хроматографией, масс-спектрометрический анализ разделенных пептидов. Однако велика вероятность ошибок измерений, некоторые методики имеют существенные огра-

ничения исследований из-за отсутствия аминокислотных последовательностей для обработки реагентами [4, 10]. Современные технологии включают следующие методы. ICAT (Isotop-Coded Affinity Tag, изотопные аффинные метки) – химический метод изотопного исследования, основанный на ковалентном мечении цистеинового аминокислотного остатка в полипептидной цепи химически идентичными, но изотопно разными реагентами; используется при определении относительного количественного содержания белков. ICROS (Isotope Coded Reduction Off of Chromatographic Support) – мечение пептидов происходит после их протеолитического расщепления. SIT (Solid-phase Isotope Tagging) позволяет включение любых аминокислот для синтеза множества изотоп-содержащих меток, пришитых к носителю. iTRAQ (Isobaric Tagging Reagents Amino-Reactive Quantification) – метод, который дает возможность довольно точно проводить количественный анализ сразу нескольких образцов (до четырех) на уровне MS/MS анализа. IGOT (Isotope coded Glycosylation-site-specific Tagging) – включение  $O^{18}$  изотопа в каждый N-гликозилированный участок пептида; FAC (Frontal Affinity Chromatography) – количественный вид аффинной хроматографии, позволяющий точно определить величину биомолекул. AQUA (Absolute Quantification) – абсолютный количественный анализ белков методом тандемной масс-спектрометрии и др. [4]. Таким образом, существует большое разнообразие методик для идентификации и количественного определения белков и пептидов, их достоинства и недостатки представлены в таблице.

Таблица  
Table

Количественные методы протеомного анализа, используемые при изучении инфекционных заболеваний и соматической патологии Quantitative methods of proteomic analysis used in the study of infectious diseases and somatic pathology		
Методика Methods	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
ICAT	Аффинное выделение цистеинсодержащих пептидов для дальнейшего масс-спектрометрического анализа Affinity isolation of cysteine containing peptides for further mass spectrometric analysis	Низкая встречаемость цистеиновых остатков Low occurrence of cysteine residues
cICAT	Высокая разрешающая способность, возможность исследовать несколько белков одновременно, а также относительная простота изотопного мечения It has high resolution capability, the ability to explore several proteins at the same time, as well as the relative simplicity of isotopic labeling	Охватывает в исследованиях большую часть белков протеома при наличии в них цистеинов Covers the majority of proteome proteins in the presence of cysteines
ICROS	Высокоэффективный, недорогой метод в протеомном анализе, характеризующийся относительной несложностью в работе Highly effective, inexpensive method in proteomic analysis, characterized by relative simplicity	Возможно появление артефактов, ошибок, погрешностей Artifacts, errors, inaccuracies may occur

Методика Methods	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
SIT	Простой, чувствительный, эффективный и воспроизводимый метод Simple, sensitive, effective and reproducible method	–
SILAC	Обогащение питательных сред незаменимыми аминокислотами Enrichment of the culture media with essential amino acids	Высокая стоимость и возможное искажение биологических процессов клеток за счет свойств питательных сред High cost and possible distortion of biological processes of cells due to the properties of the culture media
iTRAQ	Точно проводится количественный анализ сразу нескольких образцов (до четырех) на уровне MS/MS. Отсутствие дополнительных пиков в спектре, точность анализа Quantitative analysis of several samples (up to four) is carried out accurately at the level of MS/MS. There are no additional peaks in the spectrum, the analysis is accurate	Высокая стоимость High price
IGOT	Определение природы гликана и сайта гликозилирования Determining the nature of the glycan and the glycosylation site	Узкая направленность метода – только на N-гликозилированный участок пептида Narrow focus of the method – only the N-glycosylated peptide site
FAC	Позволяет точно определить величину коэффициента диссоциации биомолекул Allows accurate determination of the value of the coefficient of dissociation of biomolecules	Занимает значительное время для исследования Takes considerable time
AQUA	Оценивается абсолютный количественный анализ белков в протеоме, абсолютный количественный анализ белков методом тандемной масс-спектрометрии Absolute quantitative analysis of proteins in the proteome and absolute quantitative analysis of proteins by tandem mass spectrometry are evaluated	Есть риск искажения получаемых данных из-за возникновения перекрывания изотопных кластеров There is a risk of distortion of the resulting data due to the occurrence of overlapping isotopic clusters
2-D PAGE	Метод решает задачу не только разделения, но и визуализации, а также может быть использован для количественной оценки белков The method solves the problem of not only separation, but also visualization, and can also be used to quantify proteins	Сложная воспроизводимость экспериментов из-за различной чувствительности окрашивающих агентов, условий полимеризации акриламидных гелей и разделении белков, а также многостадийности подготовки гелей первого и второго направления The complex reproducibility of the experiments due to the different sensitivity of the coloring agents, the conditions of polymerization of acrylamide gels and the separation of proteins, as well as the multistage preparation of gels of the first and second directions
MALDI	Полезен для применения в клинической микробиологии за счет сочетания мощных аналитических возможностей и информативной базы данных Useful for use in clinical microbiology by combining powerful analytical capabilities and an informative database	Нижний диапазон масс заселен сигналами, связанными с наличием матрицы, таким образом, информативные сигналы пептидов могут быть потеряны The lower mass range is populated by signals associated with the presence of a matrix, so that informative peptide signals may be lost
ВЭЖХ HPLC	Возможность исследования термолабильных и малолетучих веществ. Идеально отвечает всем требованиям, предъявляемым к аналитическим методам по селективности и чувствительности The possibility of studying thermolabile and low volatile substances. Ideally meets all the requirements for analytical methods for selectivity and sensitivity	В настоящее время применяется чаще всего при терапевтическом лекарственном мониторинге. Не всегда удобен из-за его низкой пропускной способности и большой продолжительности исследований Currently used most often in therapeutic drug monitoring. Not always convenient due to its low bandwidth and long research time

Примечание. MALDI – источник с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией и (или) ионизацией; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Note. ICAT – Isotope-Coded Affinity Tag; cICAT – Cleavable Isotope Coding Affinity Tag; ICROS – Isotope Coded Reduction Off of Chromatographic Support; SIT – Solid-Phase Isotope Tagging; SILAC – Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture; iTRAQ – Isobaric Tagging Reagents Amino-Reactive Quantification; IGOT – Isotope coded Glycosylation-site-specific Tagging; FAC – Frontal Affinity Chromatography; FAC – Frontal Affinity Chromatography; AQUA – Absolute Quantification; MALDI – matrix-assisted laser desorption / ionization; HPLC – high-performance liquid chromatography.

Ключевым этапом протеомного анализа является идентификация белковых последовательностей при помощи комбинации высокопроизводительных методов разделения белков и их масс-спектрометрического анализа. Несмотря на разнообразие методов, используемых в современных протеомных исследованиях, все они основаны на трех технологических платформах:

1. Использование двумерного электрофореза в комбинации с идентификацией белков методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

2. Использование одномерного электрофореза в полиакриламидном геле в комбинации с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (Revers Phase Liquid Chromatography, RP-LC), совмещенной с тандемной масс-спектрометрической детекцией (RP-LC-MS/MS).

3. Использование безгелевой технологии MudPiT (Multidimensional Protein Identification Technology) при помощи многомерного хроматографического разделения белков с последующим масс-спектрометрическим анализом (2DLC-MS/MS и 3DLC-MS/MS) [7, 9].

Метод, который показал самую широкую реализацию в исследованиях взаимодействия «хозяин – патоген», – это иммуноаффинная очистка, связанная с масс-спектрометрией (Immunoaffinity Purification Coupled to Mass Spectrometry, IP-MS). В IP-MS белок, представляющий интерес, выделяется с использованием либо антитела против эндогенного белка, либо путем мечения белка. Затем белок идентифицируют с помощью МС. Преимущества IP-MS метода заключаются в том, что эксперименты могут проводиться и в контексте вирусной инфекции, чтобы обеспечить объективное обнаружение белок-белковых взаимодействий. Эти исследования могут быть выполнены с точки зрения патогена, например для выделения вирусного белка. Также исследования IP-MS могут определять изменения функционального состояния белков в организме хозяина. Хотя IP-MS успешно используется для изучения микроорганизмов, есть ряд нерешенных проблем. Возможность маркировать белок для очистки, сохраняя при этом репликацию вируса, может быть проблематичной, особенно для вирусов с малыми размерами генома. Из-за этого в нескольких исследованиях использовалась эктопическая экспрессия меченых вирусных белков вне заражения, чтобы получить информацию о потенциальных белок-белковых взаимодействиях. Подобный подход показал ценность при изучении функции белка матрицы вируса Эбола, VP40. При количе-

ственном определении идентифицированных взаимодействий «хозяин – патоген», большинство исследований IP-MS опирались на бесклеточную количественную оценку (например, спектральный подсчет), которая является простой, универсальной и может применяться к любой биологической системе. Одним из ограничений для наборов данных IP-MS является присутствие неспецифически взаимодействующих белков, которые совместно очищают с интересующим белком. IP-MS в меньшей степени используется при исследованиях возбудителей бактериальных инфекций. Ожидается, что в будущем будет расширено использование количественной протеомики при изучении инфекционных заболеваний [5].

## МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Биологические маркеры – это количественно определяемые биологические параметры, которые обуславливают норму, патологию, а также результат лекарственной терапии заболеваний. Условно биомаркеры можно классифицировать следующим образом:

1. Маркеры, указывающие на наличие заболевания.

2. Маркеры, связанные с терапевтическим эффектом и механизмом действия лекарственных препаратов.

3. Прединдикторы клинического исхода. Маркеры, позволяющие предсказать благоприятный или неблагоприятный исход заболевания, эффективность лечения.

Биомаркеры позволяют оценить состояние пациента во время лечения, определить исходы заболевания, предполагаемые результаты терапии. К общим свойствам биомаркеров относится их специфическая связь с патологией, чувствительность, доступность, высокая разрешающая способность метода определения, совместимость с имеющимся лабораторным оборудованием, а также возможность определения биомаркера как в острой фазе заболевания, так и при ремиссии [3].

Перспективным для разработки новых диагностических и прогностических критериев при острых инфекционных заболеваниях является исследование концентрации белков острой фазы (БОФ). Основными БОФ являются: С-реактивный белок, альбумин, преальбумин, альфа1-антитрипсин, альфа2-макроглобулин, гаптоглобин, D-даймер белок,  $\alpha_1$ -антихимотрипсин [3, 11]. БОФ выполняют разнообразные биологические функции, направленные на ограничение воспалительной реакции, удаление повреждающего фактора, ло-



кализацию очага повреждения и восстановление нарушенной структуры в месте повреждения или на уровне всего организма [11].

При инфекционных поражениях увеличивается концентрация С-реактивного белка, относящегося к бета-глобулинам. С-реактивный белок, как и другие белки острой фазы воспаления, появляются в сыворотке вскоре после начала воспаления. Повышение уровня С-реактивного белка наблюдается при острых бактериальных и вирусных инфекциях, инфаркте миокарда, злокачественных новообразованиях и аутоиммунных заболеваниях. Поскольку уровень С-реактивного белка в течение суток может резко меняться, его определяют в динамике [3].

Цитокины – группа белков, участвующих в активации, контроле роста и репарации клеток, а также регуляции иммунного ответа. Последовательная экспрессия каскада цитокинов происходит при многих заболеваниях. Т-лимфоциты секретируют различные про- и противовоспалительные цитокины во время заболевания [3]. Также, например, определение лактата в спинномозговой жидкости и крови при нейроинфекциях позволяет оценить степень воспаления в оболочках головного мозга, уже в первые часы поступления больного в стационар предположить бактериальную этиологию менингита и начать комплексное лечение [12].

Современные методы хроматографии позволяют определять биомаркеры на уровне  $1 \times 10^{-9}$ – $10^{-15}$  г (от нано- до фемтограммов), благодаря разработке сверхчувствительных и селективных систем, методов концентрирования, созданию высокоэффективных и стабильных колонок и повышению надежности аппаратуры в целом [13]. Метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ–МС) позволяет одновременно измерять концентрации более сотни микроорганизмов непосредственно в анализируемом материале: крови, моче, биоптатах и других биологических жидкостях и тканях, минуя стадии предварительного посева на питательные среды или использование тестовых биохимических материалов [14].

## ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Протеомный анализ – сложный, многоступенчатый метод, необходимый и востребованный в настоящее время для решения многих задач и вопросов в медицине и науке. В инфектологии имеются данные о применении протеомного исследования для идентификации белков-возбуди-

телей, а также исследовании белков – маркеров инфекционного процесса [15]. Проанализируем их более детально.

Получены результаты по экспериментальному моделированию возникновения вирулентных геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. С экспериментальной целью были проведены межродовые (*E. coli* с *V. cholerae*) и внутривидовые (*V. cholerae* и *V. cholerae*) скрещивания. При протеомном анализе обнаружено изменение экспрессии белков, таким образом, установлено влияние изменения генотипа на уровень жизнеспособности. Одним из механизмов формирования геновариантов в естественных популяциях возбудителя является горизонтальный перенос генов. Таким образом, полученные данные о механизме образования геновариантов, о структуре и функции их генома важны для понимания изменений, происходящих в естественной популяции, приводящие к образованию новых генотипов. Используя эти данные, возможно разработать методы экстренной диагностики, а также эффективные способы профилактики [16].

Е.Г. Струкова и соавт. показали возможность использования метода хромато-масс-спектрометрии для оценки микробиологического статуса организма человека по масс-спектрометрии микробных маркеров, в качестве которых выступают жирные кислоты, стериды, альдегиды. При помощи масс-спектрометрии мазка из ротовой полости группы здоровых людей был изучен видовой состав микроорганизмов. Проведенная оценка микрофлоры зева здоровых лиц юношеского возраста показала широкий диапазон аэробных и анаэробных микроорганизмов, общее количество которых превышает норму, принятую для здоровых людей средней полосы России. Следовательно, метод ГХ–МС позволяет изучить видовой состав микроорганизмов, населяющих микробиоценозы человека различных биосубстратов. Полученные результаты исследования состава микробных маркеров в мазке зева практически здоровых лиц юношеского возраста дадут возможность использовать эти данные в качестве контрольных значений в дальнейших исследованиях, а также решать вопросы профилактики, выявляя носительство патогенной микрофлоры и формируя группы риска по развитию определенных заболеваний [17].

Имеются данные по изучению энцефалита, вызванного паразитом *Toxoplasma gondii*. Первичная инфекция *T. gondii* у иммунокомпетентных лиц остается в значительной степени бессимптомной. Напротив, у лиц с осла-

бленным иммунитетом реактивация паразита приводит к тяжелым осложнениям и смертности. Молекулярные изменения на уровне белка в центральной нервной системе и белки, связанные с патогенезом энцефалита, в настоящее время изучены не до конца. Протеомными исследованиями измененных и пораженных белков в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) человека при инфицировании *T. gondii* и коинфекции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) было идентифицировано 3 496 белков. Используя количественные протеомные исследования, получен сравнительный профиль протеомов тканей мозга у пациентов с токсоплазменным энцефалитом с ВИЧ-инфекцией. Молекулярный профиль, связанный с патологическим прогрессированием токсоплазменного энцефалита, ранее не исследовался методами протеомного анализа. Используя метод iTRAQ, было идентифицировано подмножество белков, которые экспрессируются в тканях головного мозга при энцефалите, вызванном *T. gondii* совместно с ВИЧ-инфекцией. Была обнаружена дифференциальная регуляция ключевых белков, участвующих в иммуноферментном ответе при инфицировании и приводящая в последующем к судорожной готовности и когнитивным нарушениям, также идентифицирована избыточная экспрессия белков, которые могут играть определенную роль в развитии шизофрении у пациентов с токсоплазменным энцефалитом [18].

*Cryptococcus* spp. вызывают грибковый менингит, опасную для жизни инфекцию, которая встречается преимущественно у лиц с ослабленным иммунитетом. Для того, чтобы *Cryptococcus neoformans* вторгся в центральную нервную систему (ЦНС), он должен сначала проникнуть через гематоэнцефалический барьер. Для решения вопроса о путях и патогенезе преодоления гематоэнцефалического барьера был изучен протеомный профиль эндотелиальных клеток мозга человека при менингите, вызванном *Cryptococcus neoformans*, с использованием метода масс-спектрометрии. Чтобы полностью понять механизмы проникновения через эндотелий головного мозга, необходимо изучить роль эндотелиальных факторов мозга, которые способствуют этому. Изучались изменения на уровнях экспрессии белка в эндотелии головного мозга. Протеомные исследования в этой области в дальнейшем могут улучшить данные о патогенезе проникновения микроорганизмов в головной мозг и способах возникновения поражений ЦНС у людей [19].

Вирус гриппа А вызывает ежегодные эпидемии, глобальные пандемии. Однако разработка эффективных вакцин и вариантов лечения оказалась сложной, так как вирус быстро развивается и изменяется. Следовательно, идентификация белков, связанных с вирусной инфекцией и репликацией, способствовала бы созданию потенциальных новых противовирусных препаратов. А.Л. Kroeger и соавт. изучили изменения в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей при инфицировании вирусом гриппа, определили белковый профиль измененных цитоплазматических клеток, что в дальнейшем позволит определить новые направления развития противогриппозной терапии [20].

MALDI-TOF-технология применялась для идентификации возбудителей в крови у детей с подозрением на септическое состояние, значительно сокращая время на диагностику. Несмотря на высокую информативность результатов исследований, тем не менее, использование масс-спектрометрии не может рассматриваться как абсолютная альтернатива и замена общепринятым способам идентификации возбудителя (бактериологические и молекулярно-биологические). Оно может быть оправдано в качестве дополнительного исследования, позволяющего сократить время идентификации на 24–48 ч и, следовательно, ускорить применение адекватных антимикробных препаратов [21].

Количественные протеомные исследования белков тканей мозга мышей, зараженных вирусом японского энцефалита, на основе 2-DE-MS (двумерный гель-электрофорез, совмещенный с масс-спектрометрией) методики представляют потенциальный интерес для будущих антивирусных исследований в этой области. Было доказано, что репликация вируса не ограничивается цитоплазмой, но также и происходит в ядре клеток головного мозга. Работы в этой области являются основополагающими и имеют важное значение для дальнейших исследований, направленных на поиски противовирусной терапии. Была сделана попытка расшифровать нейропатогенез вируса японского энцефалита, изучив изменения в протеоме хозяина. Доказано, что репликация флавивируса не ограничивается цитоплазмой, но также встречается в ядре клетки хозяина. Имеются доказательства того, что основные белки репликации NS3 и NS5 JEV локализуются внутри ядра во время инфекции [22].

Исследование протеомного состава конденсата выдыхаемого воздуха представляется перспективным неинвазивным методом диагности-

ки болезней респираторного тракта человека. В рамках данного исследования проанализирован протеомный состав у 53 пациентов, включая пациентов с различными заболеваниями дыхательной системы: 17 больных хронической обструктивной болезнью легких в стадии обострения (1-я группа), 13 больных с внебольничной пневмонией (2-я группа), а также 23 здоровых некурящих донора (3-я группа). С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС/МС), можно идентифицировать потенциальные белки-маркеры (иммуноглобулин альфа, кинниноген, сывороточный альбумин, цинк-альфа2-гликопротеин, лизоцим), характерные для воспаления легких инфекционного (пневмония) и неинфекционного генеза (хроническая обструктивная болезнь легких). Анализ конденсата выдыхаемого воздуха как простой неинвазивный метод все чаще используется для исследования и диагностики патологий дыхательной системы. Он может служить альтернативой традиционного эндоскопического обследования нижних отделов дыхательных путей. Будучи неинвазивной, процедура может быть осуществлена даже для пациентов с тяжелым течением болезни. Развитие и применение протеомных технологий для изучения белков в конденсатах выдыхаемого воздуха человека представляются перспективным направлением диагностики инфекционных заболеваний дыхательных путей [23].

При исследовании вариантов вируса клещевого энцефалита из базы данных NCBI было обнаружено, что он содержит большое количество аминокислотных последовательностей белка E (около 350, из которых 180 являются полноразмерными вариантами расшифрованных последовательностей поверхностного антигенного белка E), которые запускают выработку антител [24]. Были изучены физико-химические свойства данных последовательностей и обнаружено, что некоторый ряд штаммов вируса меняет антигенные свойства белка, способствуя снижению иммунного ответа, вызванного применяемой вакциной. Результаты исследования могут в последующем помочь разработать наиболее эффективную вакцину [24].

Недавние вспышки, вызванные вирусом Западного Нила в развитых странах, включая Европу и Соединенные Штаты, привели к высокому уровню заболеваемости и смертности. Появление более вирулентных штаммов и отсутствие эффективной противовирусной терапии или вакцины отдают приоритет пониманию патогенеза заболе-

вания. Чтобы получить представление о патофизиологических процессах, был изучен профиль белка в головном мозге мышей, инфицированных вирусом Западного Нила. Исследования были проведены с использованием 2D-DIGE и iTRAQ методов с последующей идентификацией белков масс-спектрометрией [25]. С использованием протеомных методов было идентифицировано 148 экспрессированных белков в головном мозге мышей после инфицирования вирусом Западного Нила. Эти исследования внесли огромный вклад в изучение патогенеза заболевания и разработки противовирусной терапии, что является основой для дальнейшего изучения биомаркеров заболевания, диагностики и профилактики заболеваний, вызванных вирусом Западного Нила [25].

Протеомные исследования изменили представление исследователей в отношении возбудителей многих заболеваний. После изучения белков и их регуляции стали понятны аспекты антибиотикорезистентности к препаратам у бактерий, улучшены знания о механизмах бактериальной вирулентности и способах взаимодействия бактерий с клетками человека. С применением метода MALDI-TOF для исследования белков появилась возможность изучения устойчивости бактерий в клинических лабораториях. Так, например, уже имеются результаты исследования чувствительности микроорганизмов к некоторым наиболее распространенным антибиотикам. Протеомные исследования открывают новые пути к разработке методов эффективной профилактики и созданию лекарств для лечения инфекционных заболеваний, вызванных микроорганизмами [26–28].

При проведении протеомного анализа плазмы крови у пациентов с инфекционным эндокардитом нативных клапанов сердца были обнаружены специфические белки – маркеры возбудителей инфекционного эндокардита (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphi*, *Streptococcus viridans*, микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, грибы рода *Candida* и др.), которые являются пусковым звеном в развитии иммунного ответа в организме пациента. Таким образом, протеомный анализ дает возможность диагностировать на раннем этапе развитие эндокардита, а также подобрать эффективную антимикробную и иммуотропную терапию [29].

Вирус гепатита С является основной причиной заболеваний печени во всем мире. Острая инфекция часто прогрессирует и переходит в хроническую форму, возникают фиброз, цирроз



и в редких случаях – гепатоцеллюлярная карцинома. Несмотря на то, что вирус гепатита С является сложным объектом исследований, в течение последних двух десятилетий было разработано несколько экспериментальных моделей для улучшения понимания жизненного цикла вируса, патогенеза и взаимодействий вируса и человека [30]. Протеомные исследования внесли огромный вклад в изучении патогенеза поражений при вирусном гепатите С: изучены состав вириона, репликация и сборка вируса. Учитывая изложенное, протеомные исследования следует считать ценными инструментами для расшифровки взаимодействия вируса с его хозяином и улучшения тактики ведения и лечения пациентов с вирусным гепатитом С [30].

Диагностика бешенства является проблематичной в связи с отсутствием прижизненной лабораторной диагностики, и, как правило, диагноз может быть подтвержден посмертным исследованием тканей мозга. При количественном протеомном анализе тканей головного мозга у умерших людей с энцефалитом и паралитической формой бешенства методом ITRAQ, совмещенным с масс-спектрометрией, было идентифицировано 402 белка [26]. Метод ITRAQ был использован и для идентификации биомаркеров. Выявлен набор дифференциально экспрессированных 402 белков в образцах мозговой ткани человека, которые могут служить ценным диагностическим признаком – потенциальными биомаркерами для дифференциации энцефалита от паралитических форм бешенства [31].

Применение масс-спектрометрии микробных маркеров для изучения микроэкологии человека дает качественно новый вариант микробиологического исследования благодаря возможности одновременного количественного определения более сотни микробных маркеров (индивидуальные маркеры, специфичные для таксонов разного уровня (семейства, рода или вида), по которым их можно определять количественно в объектах окружающей среды и клинических пробах) непосредственно в биологических пробах без предварительного культивирования микроорганизмов. Получение в реальном времени расширенной информации из одной пробы об анаэробах и трудно культивируемых аэробах, а также актинобактериях, вирусах, дрожжах и микроскопических грибах обеспечивает полное понимание микробной этиологии заболевания. Количественные измерения методом масс-спектрометрии позволяют изучать динамику изменения микробиоты при лечебных мероприятиях, в том числе влияние

антибиотиков и пробиотиков на пристеночную микробиоту кишечника. Микроэкологический статус человека, точнее, поддержание его гомеостаза, является необходимым условием стабильного функционирования всех органов и систем. Соответственно, одним из первых мероприятий по обеспечению качества и продолжительности жизни должен быть контроль и восстановление микробиоценоза, если он оказался нарушенным. Контролировать состав пристеночной микробиоты кишечника и других органов оказалось возможным с помощью метода ГХ–МС. Обнаруженный в результате систематических исследований гомеостаз микробных маркеров в крови и адекватность его профиля составу кишечной микробиоты здорового человека обеспечили уникальную возможность отслеживать состояние микробиоты кишечника малоинвазивным методом – по анализу крови [32].

## НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

На сегодняшний день имеются запатентованные методики обследований, использующие протеомные методы для диагностики инфекционных болезней. Так, например, «Способ диагностики аксонально-демиелинизирующих полиневропатий» (патент РФ № 2441240 от 27.01.2012 г.) основан на прямом протеомном профилировании сыворотки крови больного путем идентификации биомаркеров заболевания. В частности, данный метод повышает точность диагностики полинейропатий. Учитывая аутоиммунный характер развития аксонально-демиелинизирующих полиневропатий, важное место в их диагностике занимают иммунологические методы исследования.

Однако наиболее перспективным представляется использование протеомных технологий, поскольку последние не требуют ориентации на специфичность взаимодействия «антиген – антитело», которая при аутоиммунных процессах дает сбой из-за наличия множественных «перекрестных» неспецифичных реакций. Системный подход, основанный на обнаружении в организме биомаркеров тех или иных патологических состояний методами протеомики, как правило, требует серьезной обработки результатов с использованием новейших достижений биоинформационных технологий, что еще больше повышает диагностическую значимость протеомных исследований [33].

Несколько ранее разрешен к применению «Способ диагностики сифилиса с использованием метода прямого протеомного профилирования сыворотки крови» (патент № 2381505 от 10.02.2010 г.). Сущность метода заключается в изучении наличия биомаркеров в сыворотке крови у больных сифилисом. Благодаря применению протеомных методов анализа и выявлению биомаркеров, возможно усовершенствовать раннюю диагностику и предупредить развитие осложнений. Основной идеей такой целевой «маркерной» диагностики является идентификация определенных молекул или их комплексов, которые присутствуют только в пораженных тканях или клетках (но отсутствуют в нормальных) и (или) выделяются во внешнюю среду или внутренние среды организма. Любой биологический процесс сопровождается каскадами ферментативных реакций, и специфичный набор их продуктов-фрагментов белков можно обнаружить в крови [34].

Связанное с ВИЧ-1 нейрокогнитивное расстройство встречается примерно у одной трети инфицированных людей. При исследовании ЦСЖ масс-спектрометрическим методом у модели примата с ВИЧ-1-ассоциированным нейрокогнитивным расстройством были выявлены неизвестные ранее изменения в ЦНС. При заболевании повышается экспрессия таких белков, как альфа-1-антитрипсин, комплемент С3, гемопексин, IgM и плазминоген. ВИЧ-ассоциированные неврологические расстройства сохраняются при проведении высокоактивной антиретровирусной терапии. Биомаркеры для прогнозирования ВИЧ-ассоциированных неврологических расстройств, прогрессирования течения ВИЧ-инфекции и мониторинга ответа на терапию отсутствуют. Обнаружение специфических биомаркеров болезни является важной проблемой в медицине. Белки из базы данных NCBI были исследованы с использованием поисковой системы Spectrum Mill. В исследовании были изучены белки ЦСЖ протеомным методом. Была создана и изучена модель неврологических расстройств при ВИЧ-инфекции, а идентифицированные биомаркеры выявили важный аспект заболевания: их присутствие не просто отражает распад нормальных барьеров ЦНС, но и экспрессия генов, кодирующих эти белки, заметно увеличивается в самой паренхиме головного мозга во время болезни [35].

*Escherichia coli*, одна из наиболее хорошо зарекомендовавших себя прокариот, служит модельным организмом для биохимических, биологических и биотехнологических исследований.

В последние годы протеом *E. coli* был использован в качестве стандарта для оценки и проверки новых технологий и методик, таких как фракционирование образца, обогащение белка, двумерный гель-электрофорез в сочетании с масс-спектрометрией, жидкостная и газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией, обработка данных с применением принципов биоинформатики. После завершения проекта секвенирования генома *E. coli* этот организм был охарактеризован в масштабе генома в терминах его транскриптома, протеома, взаимодействия и метаболизма. По сравнению с протеомами других организмов, протеом *E. coli* представляет собой превосходную модель для исследований, обладая рядом преимуществ: наличие баз данных (SWISS-PROT, NCBI), которые содержат информацию о белках и соответствующих генах; менее сложный, чем у других организмов, протеом *E. coli* [36].

Таким образом, данные проведенных исследований показывают возможность применения протеомного как метода диагностики. Благодаря его использованию возможны ранняя малоинвазивная диагностика, разработка и внедрение в практику новых медицинских технологий, специфических методов профилактики в инфектологии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время активно развиваются новые подходы к диагностике болезней, использующие достижения и методы протеомного анализа. С внедрением в практику данных методов появилась возможность на ранних этапах диагностировать заболевания инфекционной природы, уточнять патогенез развития уже известных, а также изучать механизм развития малоизученных заболеваний. Перспективной представляется разработка методов профилактики «неуправляемых» заболеваний, в частности инфекционной патологии, а также экспресс-диагностики во многих областях медицины. Необходимо отметить, что, имея данные об этиологии и патогенезе заболевания, а также о патологических процессах, происходящих в организме, можно использовать результаты протеомных исследований для разработки новых лекарственных средств и их медицинского применения с учетом принципов персонализированной медицины. Однако большая часть сведений о белках, имеющаяся в базах данных, была получена с помощью искусственных геномных и протеомных подходов и фактически может рассматриваться только в качестве гипотез. Биоинформационный анализ этих данных

приводит к появлению новых гипотез, которые без экспериментальной проверки представляют собой гипотезы второго порядка. Наиболее перспективными направлениями в последние годы стали новые экспериментальные подходы, интегрирующие различные методы аффинной очистки целевых комплексов белков с их последующей идентификацией с помощью масс-спектрометрии [9]. Необходимо заметить, что при исследовании белковых взаимодействий в некоторых случаях есть вероятность зафиксировать ложные сигналы, предполагающие наличие связи между молекулами. До сих пор затруднено проведение количественного анализа в масштабе целого протеома [4].

Протеомика – новая наука, основные открытия и практические результаты в этой области еще впереди. Открытия могут быть получены только на основе комплексного подхода на стыке биологии, математики, информатики, физики и химии. Проведенные исследования и полученные результаты показывают, что только в рамках такого подхода эти задачи могут быть успешно решены.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Иванисенко В.А., Афонников Д.А., Николаев С.В., Пинтус С.С., Крестьянова М.А., Пальянов, А.Ю., Титов И.И. Актуальные проблемы компьютерной протеомики. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2005; 9 (2): 162–178. [Ivanisenko V.A., Afonnikov D.A., Nikolaev S.V., Pintus S.S., Krestyanova M.A., Pal'yanov A.Yu., Titov I.I. Actual problems of computer proteomics. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2005; 9 (2) 162–178 (in Russ.)].
2. Демидов Е.А., Пельтек С.Е. Протеомика. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. 18 (1): 166–174. [Demidov E.A., Peltek S.E. Proteomics. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2014; 18 (1): 166–174 (in Russ.)].
3. Мирошниченко И.И., Птицина С.Н. Биомаркеры в современной медико-биологической практике. *Биомедицинская химия*. 2009; 55 (4): 425–440. [Miroshnichenko I.I., Ptitsina S.N. Biomarkers in modern medical and biological practice. *Biomedical Chemistry*. 2009; 55 (4): 425–440 (in Russ.)].
4. Копылов А.Т., Згода В.Г. Количественные методы в протеомике. *Биомедицинская химия*. 2007; 53 (6): 613–643. [Kopylov A.T., Zgoda V.G. Quantitative methods in proteomics. *Biomedical Chemistry*. 2007; 53 (6): 613–643 (in Russ.)].
5. Beltran P.M J. et al. Proteomics and integrative omics approaches for understanding host-pathogen interactions and infectious diseases. *Molecular Systems Biology*. 2017; 13 (3): 922. DOI: 10.15252/msb.20167062.
6. Краснов Н.В., Лютовинский Я.И., Подольская Е.П. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в протеомном анализе. *Научное приборостроение*. 2010; 20 (4): 5–20. [Krasnov N.V., Lyutvinsky I.I., Podolskaya E.P. Mass spectrometry with soft ionization methods in protein analysis. *Scientific Instrumentation*. 2010. 20 (4): 5–20 (in Russ.)].
7. Писарев Д.И., Новиков О.О., Васильев Г.В., Селютин О.А. Опыт использования метода MALDI/TOF/MS в фармацевтическом анализе. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2012; 18 (10–2): 76–85. [Pisarev D.I., Novikov O.O., Vasiliev G.V., Selyutin O.A. Experience in the use of the MALDI/TOF/MS method in pharmaceutical analysis. *Scientific Bulletins of the Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2012; 18 (10–2): 76–85 (in Russ.)].
8. Медведев Ю.В., Раменская Г.В., Шохин И.Е., Ярушок Т.А. ВЖЭХ и СВЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2013; 47 (4): 45–51. [Medvedev Yu.V., Ramenskaya G.V., Shokhin I.E., Yarushok T.A. HPLC and UPLC as methods for the determination of drugs in the blood (review). *Chemical-pharmaceutical Journal*. 2013; 47 (4): 45–51 (in Russ.)].
9. Иванов А.С., Згода В.Г., Арчаков А.И. Технологии белковой интерактомики. *Биоорганическая химия*. 2011. 37 (1): 8–21. [Ivanov A.S., Zgoda V.G., Archakov A.I. Technologies of protein interactomics. *Bioorganic Chemistry*. 2011. 37 (1): 8–21 (in Russ.)].
10. Говорун В.М., Иванов В.Т. Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях. *Биоорганическая химия*. 2011; 37 (2): 199–215. [Govorun V.M., Ivanov V.T. Proteomics and peptidomics in fundamental and applied medical research. *Bioorganic Chemistry*. 2011; 37 (2): 199–215 (in Russ.)].
11. Алексеева Л.А., Скрипченко Н.В., Бессонова Т.В. Диагностическое значение белков острой фазы в цереброспинальной жидкости детей с нейроинфекционными заболеваниями. *Журнал инфектологии*. 2010. 2 (2): 28–34. [Alekseeva L.A., Skripchenko N.V., Bessonova T.V. Diagnostic value of acute phase proteins in cerebrospinal fluid of children with neuroinfectious diseases. *Journal of Infectology*. 2010; 2 (2): 28–34 (in Russ.)].
12. Молотилова Т.Н. Сравнительная оценка биохимических характеристик спинномозговой жидкости и крови у больных менингитами различной этиологии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2012: 121 [Molotilova T.N. Comparative evaluation of biochemical characteristics of cerebrospinal fluid and blood in patients with meningitis of various etiologies. Extended abstract of Cand. Med. Sci. dissertation, Moscow, 2012: 121 (in Russ.)].
13. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Определение биомаркеров заболеваний хроматографическими методами. *Меди-*

- цинский алфавит. 2008; 4 (17): 32–34. [Yashin Ya.I., Yashin A.Ya. Determination of biomarkers of diseases by chromatographic methods. *Medical Alphabet*. 2008; 4 (17): 32–34 (in Russ.)].
14. Осипов Г.А., Зыбина Н.Н., Родионов Г. Г. Опыт применения масс-спектрометрии микробных маркеров в лабораторной диагностике. *Медицинский алфавит*. 2013; 1 (3): 64–67. [Osipov G.A., Zybina N.N., Rodionov G.G. Experience of using mass spectrometry of microbial markers in laboratory diagnostics. *Medical Alphabet*. 2013; 1 (3): 64–67 (in Russ.)].
  15. Kovalyov L.I., Kovalyova M.A., Burakova M.V. et al. Studies of the pathogenesis of slow neuroinfections using proteomic techniques. *Neurochemical Journal*. 2007; 1 (4): 318–325.
  16. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Щелканова Е.Ю., Заднова С.П., Черкасов А.В., Кутырев В.В. Геноварианты возбудителя холеры Эль Тор: получение, молекулярно-генетический и протеомный анализ. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; 1: 21–31. [Smirnova N.I., Agafonov D.A., Shchelkanova E.Yu., Zadnova S.P., Cherkasov A.V., Kutyrer V.V. Genovariants of the causative agent of cholera El Tor: acquisition, molecular genetic and proteomic analysis. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2014; 1: 21–31 (in Russ.)].
  17. Струкова Е.Г., Ефремов А.А., Гонтова А.А., Осипов Г.А., Сарматова Н.И. Определение микробиологического статуса и диагностика инфекций организма человека с использованием метода хромато-масс-спектрометрии. *Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Химия*. 2009; 2 (4): 351–358. [Strukova E.G., Efremov A.A., Gontova A.A., Osipov G.A., Sarmatova N.I. Determination of the microecological status and diagnosis of human infections using the chromatography-mass spectrometry method. *Journal of the Siberian Federal University. Series: Chemistry*. 2009; 2 (4): 351–358 (in Russ.)].
  18. Sahu A., Kumar S., Sreenivasamurthy S.K. et al. Host response profile of human brain proteome in toxoplasma encephalitis co-infected with HIV. *Clinical Proteomics*. 2014; 11 (1): 39. DOI: 10.1186/1559-0275-11-39.
  19. Vu K., Eigenheer R.A., Phinney B.S., Gelli A. Cryptococcus neoformans promotes its transmigration into the central nervous system by inducing molecular and cellular changes in brain endothelial cells. *Infection and Immunity*. 2013; 81 (9): 3139–3147. DOI: 10.1128/IAI.00554-13.
  20. Kroeker A.L., Ezzati P., Halayko A.J., Coombs K.M. Response of primary human airway epithelial cells to influenza infection: a quantitative proteomic study. *Journal of Proteome Research*. 2012; 11 (8): 4132–4146. DOI: 10.1021/pr300239r.
  21. Чеботарь И.В., Пономаренко О.А., Лазарева А.В., Карасева О.В., Горелик А.А., Бочарова Ю.А., Тепаев Р.Ф. Использование MALDI-TOF-технологии для идентификации возбудителей септических состояний в педиатрической практике. *Современные технологии в медицине*. 2015. 7 (2): 68–74. [Chebotar I.V., Ponomarenko O.A., Lazareva A.V., Karaseva O.V., Gorelik A.L., Tepaev R.F. Use of MALDI-TOF-technology for the identification of causative agents of septic states in pediatric practice. *Modern Technologies in Medicine*. 2015; 7 (2): 68–74 (in Russ.)].
  22. Sengupta N., Ghosh S., Vasaikar S.V., Gomes J., Basu A. Modulation of neuronal proteome profile in response to Japanese Encephalitis virus infection. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e90211. DOI: 10.1371/journal.pone.0090211.
  23. Кононихин А.С., Федорченко К.Ю., Рябконов А.М., Стародубцева Н.А., Попов И.А., Завьялова М.Г., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г., Варфоломеев С.Д., Николаев Е.Н. Протеомный анализ конденсата выдыхаемого воздуха в целях диагностики патологий дыхательной системы. *Биомедицинская химия*. 2015. 61 (6): 777–780. [Kononikhin A.S., Fedorchenko K.Yu., Riabokon A.M., Starodubtseva N.L., Popov I.A., Zavyalova M.G., Anayev E.Kh., Chuchalin A.G., Varfolomeev S.D., Nikolaev E.N. Proteomic analysis of the condensate of the exhaled air for the purpose of diagnostics of pathologies of the respiratory system. *Biomedical Chemistry*. 2015. 61 (6): 777–780 (in Russ.)].
  24. Букин Ю.С., Джигоев Ю.П., Козлова И.В., Ружек Д., Злобин В.И. Сравнительный анализ физико-химических свойств аминокислотных остатков, входящих в различные варианты оболочечного белка Е вируса клещевого энцефалита. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2014; 6 (100): 84–88. [Bukin Y.C., Dzhiyoev Y.P., Kozlov I.V., Ruzhek D., Zlobin V.I. Comparative analysis of physico-chemical properties of the amino acid residues included in various embodiments of the envelope protein E TBE virus. *Bulletin ESSC SB RAMS*. 2014; 6 (100): 84–88 (in Russ.)].
  25. Fraiser C., Camoin L., Lim S. et al. Altered protein networks and cellular pathways in severe west nile disease in mice. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e68318. DOI: 10.1371/journal.pone.0068318.
  26. Pérez-Llarena F.J., Bou G. Proteomics as a tool for studying bacterial virulence and antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 410. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00410.
  27. Vranakis I., Goniou I., Psaroulaki A., Sandalakis V., Tselentis Y., Gevaert K., Tsiotis G. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. *Journal of Proteomics*. 2014; (97): 88–99. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.10.027.
  28. Chen B., Zhang D., Wang X. et al. Proteomics progresses in microbial physiology and clinical antimicrobial therapy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016; 36 (3): 403–413. DOI: 10.1007/s10096-016-2816-4.
  29. Румбешт В.В., Мационис А.Э., Дюжигов А.А., Сарвина И.В. Иммунопротеомика инфекционного эндо-

- кардита нативных клапанов сердца. *Медицинская иммунология*. 2008; 10 (1): 27–34. [Rumbesht V.V., Matsionis A.E., Dyuzhikov A.A., Sarvilina I.V. Immuno-proteomics of the infective endocarditis of native heart valves. *Medical Immunology*. 2008; 10 (1): 27–34 (in Russ.)].
30. Douam F., Ploss A. Proteomic approaches to analyzing hepatitis C virus biology. *Proteomics*. 2015; 15 (12): 2051–2065. DOI: 10.1002/pmic.201500009.
31. Venugopal A.K., Ghantasala S.S.K., Selvan L.D.N. et al. Quantitative proteomics for identifying biomarkers for rabies. *Clinical Proteomics*. 2013; 10 (1): 3. DOI: 10.1186/1559-0275-10-3.
32. Осипов Г.А., Родионов Г.Г. Применение метода масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической практике. *Поликлиника*. 2013; (1–3): 68–73. [Osipov G.A., Rodionov G.G. Application of the mass spectrometry method for microbial markers in clinical practice. *Polyclinic*. 2013; (1–3): 68–73 (in Russ.)].
33. Способ диагностики аксонально-демиелинизирующих полиневропатий: пат. 2441240 Рос. Федерация: МПК G 01 N 33/49, G 01 N 27/62 / Ющук Н.Д. и др.; заявитель и патентообладатель Москва, Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации – № 2010140643/15; заявл. 05.10.2010; опубл. 27.01.2012. Бюл. № 3. [A method for diagnosing axonal-demyelinating polyneuropathies: Pat. 2441240 Rus. Federation: IPC G 01 N 33/49, G 01 N 27/62 / Yushchuk N.D. et al.; applicant and patent holder is Moscow, State Educational Establishment of Higher Professional Education «Moscow State University of Medicine and Dentistry» of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation – No. 2010140643/15; claimed. 10/05/2010; publ. 27.01.2012 Bul. № 3 (in Russ.)].
34. Способ диагностики сифилиса с использованием метода прямого протеомного профилирования сыворотки крови: пат. 2381505 Рос. Федерация: МПК G 01 N 33/48 / Кубанова А.А. и др.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение «Государственный научный центр дерматовенерологии Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи» – № 2008138741/15; заявл. 30.09.2008; опубл. 10.02.2010. Бюл. № 4. [A method for diagnosing syphilis using the method of direct proteomic profiling of blood serum: pat. 2381505 Rus. Federation: IPC G 01 N 33/48 / Kubanova A.A. et al.; applicant and patent holder is Federal State Institution «State Scientific Center of Dermatovenereology of the Federal Agency for High-Tech Medical Care» – No. 2008138741/15; claimed. 30.09.2008; publ. 10.02.2010 Bul. № 4 (in Russ.)].
35. Pendyala G., Trauger S.A., Kalisiak E., Ellis R.J., Siuzdak G., Fox H.S. Cerebrospinal fluid proteomics reveals potential pathogenic changes in the brains of SIV-infected monkeys. *Journal of Proteome Research*. 2009; 8 (5): 2253–2260. DOI: 10.1021/pr800854t.
36. Han M.-J., Lee S.Y. The Escherichia coli proteome: past, present, and future prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006; 70 (2): 362–439. DOI: 10.1128/MMBR.00036-05.

## Сведения об авторах

**Страшникова Наталья Сергеевна**, врач-инфекционист, Красноярская межрайонная детская больница № 1, г. Красноярск.

**Мартынова Галина Петровна**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней с курсом ПО, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

**Салмина Алла Борисовна**, д-р мед. наук, профессор, проректор по инновационному развитию и международной деятельности, зав. кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

**Оловянникова Раиса Яковлевна**, канд. биол. наук, доцент, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

## Authors information

**Strashnikova Natalya S.**, Infectious Disease Doctor, Krasnoyarsk Interdistrict Children's Hospital No. 1, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Martynova Galina P.**, DM, Professor, Head of the Children Infectious Diseases Department with Postgraduate Education, KSMU named after Professor V.F. Vojno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Salmina Alla B.**, DM, Professor, Vice-Rector for Innovative Development and International Activities, Head of the Department of Biochemical Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiology, KSMU named after Professor V.F. Vojno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Olovyannikova Raisa Y.**, PhD, Assistant Professor, Department of Biological Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Professor V.F. Vojno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Кутяков Виктор Андреевич**, канд. биол. наук, ст. преподаватель, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

**Тохидпур Аболхасем**, ст. науч. сотрудник, НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) **Страшникова Наталья Сергеевна**, e-mail: Natali\_Parilova@mail.ru.

**Kutyakov Viktor A.**, PhD, Senior Lecturer, Department of Biological Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, named after Professor V.F. Vojno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Tohidpur Abolhasem**, Senior Researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, named after Professor V.F. Vojno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) **Strashnikova Natalya S.**, e-mail: Natali\_Parilova@mail.ru.

Received 25.03.2018

Accepted 14.12.2018

Поступила в редакцию 25.03.2018

Подписана в печать 14.12.2018

## Контроль аллергического ринита: современные инструменты оценки

Тюфилин Д.С., Деев И.А., Кобякова О.С., Куликов Е.С., Табакаев Н.А.,  
Винокурова Д.А., Кириллова Н.А.

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

### РЕЗЮМЕ

**Актуальность и цель.** В настоящее время аллергический ринит (АР) является распространенным заболеванием, негативно влияющим на качество жизни пациентов и приводящем к развитию бронхиальной астмы, что определяет его высокое социально-экономическое бремя. Согласно общей концепции, одобренной Всемирной организацией здравоохранения, целью терапии АР, как и других аллергических состояний, является контроль над симптомами, что отражено в отечественных клинических рекомендациях. Тем не менее реализация данной цели на практике затруднительна из-за отсутствия международного стандартизированного валидизированного инструмента оценки контроля АР. В этой связи целью данного обзора является анализ результатов исследований, посвященных созданию таких инструментов, и проведение их сравнительного анализа.

**Материалы и методы.** Для проведения обзора использовались базы данных Web of Science, Scopus и Российского индекса научного цитирования, библиотека PubMed. В качестве маркеров поиска были использованы такие ключевые слова, как allergic rhinitis control, AR control, AR questionnaire, включены публикации с 1991 г. (первая работа в данном направлении) по настоящее время (2018 г.). Всего было проанализировано 96 публикаций.

**Результаты.** По результатам поиска все исследования были расположены в хронологическом порядке и описаны их основные результаты. Отдельно рассмотрены достоинства и недостатки опросников по качеству жизни пациентов с АР, использования инструментом из официальных клинических руководств, оценки контроля аллергического ринита при помощи визуальных аналоговых шкал, а также специализированных опросников по контролю АР.

**Заключение.** Проведенный обзор позволяет сделать выводы не только о качестве предлагаемых сегодня инструментов, но и предложить наиболее репрезентативные опросники для определения уровня контроля аллергического ринита для использования в клинической практике.

**Ключевые слова:** аллергические состояния, валидация, опросники по аллергическому риниту, оценка контроля, анкеты АР.

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

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

**Для цитирования:** Тюфилин Д.С., Деев И.А., Кобякова О.С., Куликов Е.С., Табакаев Н.А., Винокурова Д.А., Кириллова Н.А. Контроль аллергического ринита: современные инструменты оценки. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 262–273. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-262-273>.



УДК 616.211-002-056.43-07

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-262-273>

## Allergic rhinitis control: contemporary approaches to evaluation

Tyufilin D.S., Deev I.A., Kobayakova O.S., Kulikov E.S., Tabakaev N.A.,  
Vinokurova D.A., Kirillova N.A.

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

### ABSTRACT

**Objectives.** Allergic rhinitis (AR) is highly prevalent all around the world. It adversely affects the quality of life of patients and leads to the development of bronchial asthma, which determines its high socio-economic burden. International and Russian authorities establish control of the disease as a primary efficacy end point of allergic rhinitis treatment. Nevertheless, there is no international, standardized, validated tool to assess control of allergic rhinitis. In this regard, this review aims to analyze research on the development of such tools and to provide their comparative analysis.

**Review methods.** Using PubMed, Web of science and Russian Citation Index database, we searched from 1991 to 2019 with logical combinations of the following key words: “allergic rhinitis control”, “AR control”, “AR questionnaire”. A total of 96 publications were included in the study.

**Results.** All studies were arranged in chronological order and their main results were described. Questionnaires on the quality of life, tools offered by the clinical guidelines, visual analogue scales, and specialized questionnaires for measuring the control of allergic rhinitis were considered separately. The advantages and disadvantages of these instruments are described.

**Conclusion.** The evidence based on the quality of the tool to support the use of specialized questionnaires was shown. Many disease control scales have been validated, but have some practical disadvantages as primary efficacy criteria in clinical practice.

**Key words:** allergic rhinitis, validation, allergic rhinitis questionnaires.

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

**Source of financing.** The authors state that there is no funding for the study.

**For citation:** Tyufilin D.S., Deev I.A., Kobayakova O.S., Kulikov E.S., Tabakaev N.A., Vinokurova D.A., Kirillova N.A. Allergic rhinitis control: contemporary approaches to evaluation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 262–273. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-262-273>.

## ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования демонстрируют рост распространенности аллергического ринита (АР) во всем мире, особенно в развитых странах: частота встречаемости данного заболевания варьирует от 10 до 30% у взрослых и достигает до 40% у детей [1, 2]. Доказанная связь АР с развитием бронхиальной астмы, существенное экономическое бремя в совокупности с тем фактом, что данное заболевание является причиной снижения качества жизни у большинства пациентов, обуславливают необходимость поиска адекватных подходов терапии указанной патологии [3, 4].

В положениях Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA, 2006 г.) была впервые изложена концепция достижения контроля в тактике терапии аллергических заболеваний, а разработка и стандартизация инструментов для его оценки позволили определять эффективность различных препаратов и режимов фармакотерапии астмы, выявляя наиболее успешные схемы [5, 6].

В настоящее время существует общая тенденция к использованию «контрольного» подхода к другим заболеваниям, включая АР, одобренная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ),

однако для данной патологии нет единого определения контроля, поскольку учитываемые параметры АР варьируются от одного инструмента оценки к другому. В клинических рекомендациях Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов 2018 г. и Союза педиатров России 2016 г. также указано, что целью лечения АР является достижение полного контроля симптомов заболевания, однако нет какого-либо указания на то, каким образом необходимо оценивать контроль [7, 8].

В настоящее время не существует унифицированного международного инструмента для определения уровня контроля данной патологии, что в свою очередь является барьером для оценки эффективности фармакотерапии и ее дальнейшего развития. В этой связи целью данного обзора является обобщение результатов исследований, посвященных поиску и созданию таких инструментов, и проведение их сравнительного анализа.

## ОПРОСНИКИ НА ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ

Одним из часто используемых методов оценки контроля того или иного заболевания являются специализированные опросники по оценке качества жизни (КЖ) пациентов с конкретной

патологией (Health related quality of life). Первый из таких инструментов, направленных на изучение симптомов риноконъюнктивита, – RQLQ (Rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire – Вопросник для оценки КЖ при риноконъюнктивите) – разработали Е.Ф. Juniper и G.H. Guyatt в 1991 г. Финальная версия опросника включает 28 вопросов, связанных с влиянием симптомов АР и аллергического риноконъюнктивита на повседневную жизнь пациента [9]. Этот опросник, не найдя широкого применения в клинической практике, в последующем стал примером для сравнения предиктивности других инструментов измерения контроля АР.

В течение следующих нескольких лет было предпринято еще несколько попыток создания опросника на основе оценки КЖ пациентов. Систематический обзор С.М. van Oene и соавт. включал 11 различных анкет по АР, при этом авторами также было проведено определение их качества (табл. 1) [10].

По результатам анализа С.М. van Oene и соавт., наилучшим качеством обладают уже упомянутый RQLQ, его сокращенная версия (miniRQLQ), RSOM-31 (Rhinosinusitis outcome measure – опросник исхода риносинусита) и RhinoQOL (опросник для оценки КЖ при риносинусите).

Таблица 1  
Table 1

Результаты систематического обзора опросников, оценивающих КЖ пациентов с ринитом и риносинуситом (адаптация систематического обзора С.М. van Oene и соавт., 2007)

The results of a systematic review of questionnaires that evaluate the quality of life of patients with rhinitis and rhinosinusitis (an adaptation of a systematic review of C.M. van Oene et al., 2007)

Опросник Questionnaire	Год Year	Авторы Authors	Кол-во вопросов Number of questions	Итоговый балл качества* Total Quality Score *
RQLQ – Rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire (опросник для оценки КЖ при риноконъюнктивите) [9]	1991	Juniper E.F. и Guyatt G.H. Juniper E.F. and Guyatt G.H.	28	11
Rhinitis QOLQ – Rhinitis quality of life questionnaire (опросник для оценки КЖ при рините) [11]	1993	Juniper E.F. и соавт. Juniper E.F. et al.	24	7
RQLQ(S) – Standardized version of RQLQ (стандартизированная версия RQLQ) [12]	1999	Juniper E.F. и соавт. Juniper E.F. et al.	28	14
MiniRQLQ – Mini version of RQLQ (мини-версия RQLQ) [13]	2000	Juniper E.F. и соавт. Juniper E.F. et al.	14	15
ROQ – Rhinitis outcomes questionnaire (опросник исхода ринита) [14]	2001	Santini J. и соавт. Santini J. et al.	26	10
NRQLQ – Nocturnal RQLQ (версия RQLQ для ночных симптомов) [15]	2003	Juniper E.F. и соавт. Juniper E.F. et al.	16	11
RSOM-31 – Rhinosinusitis outcome measure (опросник исхода риносинусита) [16]	1995	Piccirillo J.F. и соавт. Piccirillo J.F. et al.	31	15
SNOT-16 Sinonasal outcome test (тест по исходу риносинусита) [17]	1999	Anderson E.R. и соавт. Anderson E.R. et al.	16	7
SNOT-20 [18]	2003	Piccirillo J.F. и соавт. Piccirillo J.F. et al.	20	13

Окончание табл. 1  
End of table 1

Опросник Questionnaire	Год Year	Авторы Authors	Кол-во вопросов Number of questions	Итоговый балл качества* Total Quality Score *
RSDI – Rhinosinusitis disability index (индекс нетрудоспособности при риносинусите) [19]	1997	Benninger M.S. и Senior B.A. Benninger M.S. and Senior B.A.	30	7
RhinoQOL – rhinosinusitis quality of life questionnaire (опросник для оценки КЖ при риносинусите) [20–22]	2005	Atlas S.J. и соавт. Atlas S.J. et al.	17	14

\* Складывается из оценки состава опросника, удобства использования, а также оценки валидности и психометрических показателей.

\* It consists of an assessment of the composition of the questionnaire, its ease of use, as well as an assessment of validity and psychometric indicators.

Опросники по оценке КЖ пациентов с АР и сопутствующими патологиями, несомненно, позволяют получить представления о том или ином влиянии симптомов заболевания на повседневную жизнь пациента, однако их частота и тяжесть, а также прием препаратов симптоматической терапии не учитываются вовсе. При этом исключает-

ся возможность коррекции схемы терапии на основании данных, полученных при помощи таких опросников [10].

В табл. 2 указаны исследования по разработке инструментов оценки контроля аллергического ринита с точки зрения качества жизни, не вошедшие в обзор С.М. van Oene и соавт.

Таблица 2  
Table 2

Исследования по разработке инструментов оценки качества жизни пациентов с аллергическим ринитом [23] Studies on the development of tools for assessing the quality of life of patients with allergic rhinitis [23]			
Опросник Questionnaire	Год Year	Авторы Authors	Кол-во вопросов Number of questions
RAPP (ринит и астма с позиции пациента) [24] rhinitis and asthma from the perspective of the patient	2012	Braido F. и соавт. Braido F. et al.	10
AAQQ (арабский опросник по качеству жизни при аллергическом рините) [25] Arabic quality of life questionnaire for allergic rhinitis	2009	AbuRuz S.M. и соавт. AbuRuz S.M. et al.	20
PADQLQ (опросник качества жизни для пациентов с аллергическими заболеваниями в педиатрии) [26] quality of life questionnaire for patients with allergic diseases in pediatrics	2003	Roberts G. и соавт. Roberts G. et. al	26
ESPRINT (испанский опросник по качеству жизни при аллергическом рините) [27] Spanish quality of life questionnaire for allergic rhinitis	2007	ESPRINT Study group and investigators	28
Ped-AR-QOL (опросник качества жизни для пациентов с аллергическими заболеваниями в педиатрии) [28] quality of life questionnaire for patients with allergic diseases in pediatric patient	2016	Mavroudi A. и соавт. Mavroudi A. et al.	20
PRQLQ (опросник качества жизни для пациентов с аллергическими заболеваниями в педиатрии) [29] quality of life questionnaire for patients with allergic diseases in pediatric patients	1998	Juniper E.F. и соавт. Juniper E.F. et al.	23

## ПЕРВОЕ ПОКОЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ РУКОВОДСТВ

Результаты оценки влияния АР на КЖ пациентов предопределили дальнейшее развитие подходов к терапии данного заболевания. В рамках

рабочей группы ВОЗ в 1999 г. был инициирован проект ARIA (Allergic rhinitis and its impact on asthma – Аллергический ринит и его влияние на астму), направленный на консолидированное решение проблемы АР. Основным действующим документом ARIA является одобренное ВОЗ

клиническое руководство, последний пересмотр которого опубликован в 2016 г. [30–32]. Данное руководство предлагает использовать классификацию АР, учитывающую влияние его симптомов на повседневную жизнь пациента (тяжесть заболевания), а также их частоту (тип заболевания). Инструмент ARIA предлагает вопросы с двумя вариантами ответа: «да» или «нет», например, «симптомы болезни мешают моему сну» или «симптомы болезни влияют на мою работоспособность». На основании ответов степень АР определяется как легкая или среднетяжелая, а тип классифицируется как интермиттирующий или персистирующий. Сочетания типа и тяжести в соответствии с ARIA детерминируют тактику лечения [32].

Таким образом, ARIA опирается не только на влияние симптомов на жизнь пациента, но и на их периодичность. Однако такой подход имеет ряд недостатков: не оценивается гетерогенность пациентов внутри двух групп (с легкой и среднетяжелой степенью АР), используемая схема терапии и дозировка препаратов, кроме того, пациенты из группы с легкой степенью АР зачастую вовсе не получают лечение [33, 34]. Указанные недостатки стали предпосылкой для инициирования ряда исследований по разработке новых опросников, учитывающих перечисленные ограничения и оценивающих непосредственно уровень контроля АР.

## ИНСТРУМЕНТЫ ОЦЕНКИ КОНТРОЛЯ

Одним из первых таких инструментов стал CARAT (Control of allergic rhinitis and asthma test – Тест контроля аллергического ринита и астмы), разработанный L. Nogueira-Silva L. и соавт. (2009): после проведения литературного обзора авторы включили в анкету 17 вопросов о частоте симптомов, а также требующих ответа «да» или «нет». Стоит отметить, что CARAT позволяет оценить не только контроль АР, но и бронхиальной астмы за предыдущие 2–4 нед, а отдельные вопросы выявляют конкретные проблемы пациента (например, ночные симптомы) [35, 36].

В исследовании J.A. Fonseca и соавт. (2009) с участием 193 взрослых пациентов валидирована короткая версия опросника – CARAT10, включающая 10 вопросов (коэффициент Кронбаха при валидации составил 0,85; внутренняя согласованность – 0,7; AUC – 0,82) [37]. Дополнительным вариантом данного опросника является разработанный в 2014 г. CARATkids (Control of allergic rhinitis and asthma test for children – Тест контроля аллергического ринита и астмы у детей).

После проведения апробации опросника в исследовании L.M. Borrego и соавт. (2014) его финальная версия была переработана и представляла собой также 17 вопросов с дихотомическими («да» или «нет») вариантами ответов [38].

Оба опросника, CARAT10 и CARATkids, получили широкое распространение: они переведены на несколько языков и используются, в том числе, в эпидемиологических и клинических исследованиях [39–41]. Так, например, P.R. Pereira и C. Lopes (2013) проводили оценку контроля АР и астмы ( $n = 200$ ), по результатам которой была выявлена высокая (83%) распространенность неконтролируемого АР [42]. В одном из последних исследований M.M. Jalali и соавт. (2019) использовали CARAT для определения эффективности использования пробиотиков в качестве дополнительного метода лечения у пациентов с персистирующим АР [43].

Опросник RCAT (Rhinitis control assessment test – Тест оценки контроля ринита), разработанный M. Shatz и соавт. в 2010 г., в отличие от CARAT, включал вопросы с применением шкалы Ликерта (выбор градации от 1 до 5). В результате исследования M. Shatz и соавт. с участием 410 пациентов с АР, из 26 вопросов было отобрано шесть наиболее предиктивных, т.е. демонстрирующих корреляцию финального балла с оценками врача ( $p < 0,0001$ , коэффициент Кронбаха = 0,70) [44, 45]. Данный инструмент был использован в ряде исследований, например, S.M. Novakova и соавт. (2018) использовали его при оценке эффективности подъязычной иммунотерапии в течение трех лет у пациентов с интермиттирующим АР [46].

Следующим шагом в оценке контроля АР стала разработка в 2011 г. ARCT (Allergic rhinitis control test – Тест оценки контроля АР). Созданием данного опросника занималась междисциплинарная команда под руководством P. Demoly и соавт., состоявшая из врачей аллергологов-иммунологов, врачей-пульмонологов, врачей-оториноларингологов и методистов [47]. Опросник напоминает АСТ (Asthma control test – Тест оценки контроля астмы) и состоит из пяти вопросов, два из которых напрямую заимствованы из АСТ. ARCT валидирован при участии 902 пациентов, которые заполняли опросник до лечения и после двух недель терапии [47]. Оценка при включении достоверно коррелировала ( $p < 0,0001$ ) с общим клиническим статусом пациента и влиянием АР на повседневную жизнь. Значительное ( $p < 0,0001$ ) увеличение показателя наблюдалось после двух недель лечения ( $14,9 \pm 4,0$  при включении до  $21,5 \pm 2,9$  после лечения) [47].

Сравнительная характеристика трех упомянутых опросников, основанная на литературном

обзоре P. Demoly и соавт. (2013), представлена в табл. 3 [48].

Таблица 3  
Table 3

Сравнительная характеристика опросников по оценке контроля аллергического ринита (P. Demoly и соавт., 2013) Comparative characteristics of the questionnaires to assess the control of allergic rhinitis (P. Demoly et al., 2013)			
Показатель Indicator	CARAT	RCAT	ARCT
Способ заполнения Method of filling	Заполняется пациентом Is filled in by the patient	Заполняется пациентом Is filled in by the patient	Заполняется пациентом Is filled in by the patient
Исследуемое заболевание Studied disease	АР и бронхиальная астма AR and bronchial asthma	АР AR	АР AR
Период оценки Evaluation period	Предыдущие 2–4 нед Previous 2–4 weeks	Предыдущая неделя Previous week	Предыдущие 2 нед Previous 2 weeks
Количество вопросов Number of questions	17 вопросов при разработке опросника, 10 в финальной версии 17 questions in the development of the questionnaire, 10 in the final version	26 вопросов при разработке опросника, шесть в финальной версии 26 questions in the development of the questionnaire, 6 in the final version	Пять в финальной версии 5 in the final version
Тип ответов Type of questions	4-балльная шкала частоты симптомов и ответы по типу «да» / «нет» 4-point scale of symptom frequency and “yes” / “no” answers	5-балльная шкала Ликерта 5-point Likert scale	5-балльная шкала частоты симптомов 5-point symptom frequency scale
Валидация Validation	Валидация с участием 193 взрослых пациентов (CARAT10). Продолжительная валидация с участием 51 пациента. Ретестовая надежность = 0,82 Validation of 193 adult patients (CARAT10). Prolonged validation involving 51 patients. Retest reliability = 0.82	Психометрическая валидация с участием 410 пациентов. Коэффициент Кронбаха = 0.7 Psychometric validation involving 410 patients. Cronbach coefficient = 0.7	Валидация с участием 902 пациентов. Внутренняя согласованность = 0,77 Validation involving 902 patients. Internal consistency = 0.77

Обзор демонстрирует, что все три инструмента характеризуются высоким уровнем валидности и могут быть использованы в клинической практике.

## НОВЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ РУКОВОДСТВА

Многочисленные исследования по разработке и валидации опросников привели к небольшим изменениям в пересмотре клинического руководства ARIA 2016 г. В частности, впервые было предложено использовать для оценки тяжести АР не дихотомичные ответы «да» или «нет», а визуальную аналоговую шкалу (ВАШ) [32]. Было доказано, что оценка по ВАШ, равная 5 см и более, означает среднетяжелую степень АР, менее 5 см – легкую [49]. Также было установлено минимальное клинически значимое изменение по ВАШ, которое составляет 0,3 см [50]. Чувствительность ВАШ была продемонстрирована в нескольких рандомизированных, двойных слепых, плацебо-контролируемых исследованиях [51–54].

Одновременное использование ВАШ и опросника CARAT показано в исследовании O. Lourenço (2014) в Португалии: на основании результатов опроса ( $n = 333$ ) была выявлена корреляция между оценками ВАШ и CARAT ( $r = -0,481$ ) [55]. Одно из последних исследований уровня контроля АР в Италии, проведенное F. Gani и соавт. (2018), наряду с высокой распространенностью неконтролируемого АР (более 60% пациентов,  $n = 250$ ), продемонстрировало отрицательную взаимосвязь между баллами ВАШ и сумой значений опросника CARAT [41].

Указанные исследования позволили существенно продвинуться в развитии инструментов оценки контроля АР.

## СИСТЕМЫ ДИСТАНЦИОННОГО МОНИТОРИНГА И ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ РЕШЕНИЙ

Европейской комиссией в 2012 г. создано EIP on AHA (European innovation partnership on active and healthy ageing – Европейское инновационное

партнерство по активному и здоровому старению), деятельностью которого стала разработка Плана действий (Action plan), включающего мероприятия по консолидированной борьбе с хроническими респираторными заболеваниями, в том числе и с АР [56]. Одним из таких мероприятий является проект MASK (Mobile airways sentinel network), инициированный в 2015 г. и запущенный одновременно с утверждением пересмотренной версией ARIA (2016). Суть данного проекта заключается в осуществлении перехода от тяжести симптомов к контролю в качестве основы для принятия решения при терапии АР [57].

MASK основан на принципах интегративного здравоохранения и включает в себя использование визуальной аналоговой шкалы, которая заполняется пациентом ежедневно, начиная с двух недель до появления аллергена (периода цветения, например), что позволяет оценивать частоту и силу симптомов (тяжесть заболевания), а также опросника CARAT, с помощью

которого пациент может измерить контроль интермиттирующего аллергического ринита в период воздействия триггера и через 2 нед после его завершения. Оба инструмента интегрированы в мобильном приложении Allergy Diary (MACVIA ARIA), которое доступно для скачивания в 22 странах мира, в число которых Российская Федерация не входит [57, 58]. На основе данных, полученных с помощью приложения и включающих не только оценку уровня контроля и тяжести заболевания, но и частоты приема препаратов, коморбидности, индивидуальных характеристик, группа исследователей под руководством J. Bousquet планирует в ближайшее время создать эффективную систему поддержки принятия решений при терапии АР [59, 60], однако авторы отмечают, что это вопрос ни одного года и ни одного исследования.

Обобщенное на основании литературных данных описание поколений инструментов для оценки контроля АР представлено в табл. 4.

Таблица 4  
Table 4

Обобщенные результаты проведенного обзора литературы			
Вид инструментов оценки течения АР Type of assessment tools for AR	Примеры Examples	Преимущества Advantages	Недостатки Disadvantages
Опросники на основании качества жизни Questionnaires based on the quality of life	RQLQ, miniRQLQ, RSOM-31, RhinoQOL	Позволяют провести комплексную оценку состояния пациента и влияния заболевания на его повседневную жизнь Allow to conduct a comprehensive assessment of the patient's condition and the effect of the disease on their daily life	Отсутствие учета частоты симптомов и приема препаратов Lack of accounting for the frequency of symptoms and medications
Руководство ARIA (1999–2015 гг.) ARIA Guide (1999–2015 years)	Отдельные вопросы Separate questions	Позволяет классифицировать АР и выбрать схему терапии в зависимости от классификации Allows to classify AR and choose a treatment plan depending on the classification	Невозможно оценить эффективность лечения в динамике и провести обоснованную коррекцию схемы лечения It is impossible to evaluate the effectiveness of treatment in dynamics and to conduct a reasonable correction of the treatment plan
Опросники, направленные на оценку контроля Questionnaires to assess control	CARAT, RCAT, ARCT	Оценка непосредственного контроля симптомов в динамике, позволяющая корректировать терапию Evaluation of the direct control of symptoms over time allowing treatment adjustment	Мало проведенных рандомизированных клинических исследований. Нет рекомендации по коррекции терапии на основании данных о контроле Few randomized clinical trials. No recommendation for treatment correction based on control data
Комбинированные опросники Combined questionnaires	БАШ (ARIA 2016) и CARAT в проекте MASK (ARIA 2016) and CARAT in the MASK project	Оценка контроля симптомов в динамике Assessment of symptom control over time	Мало проведенных рандомизированных клинических исследований. Нет рекомендации по коррекции терапии на основании данных о контроле Few randomized clinical trials. No recommendation for treatment correction based on control data



Таким образом, на мировом уровне проблема оценки контроля аллергического ринита решена лишь частично. Барьером, который на сегодняшний день ограничивает разработку полноценных рекомендаций по ведению больных АР на основании контролируемости симптомов заболевания, является отсутствие достоверных данных, получаемых в рамках рандомизированных клинических исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие стандартизированного инструмента оценки контроля аллергического ринита – необходимое условие решение вопроса контролируемости и подбора наиболее эффективной схемы лечения. Работы по разработке такого инструмента ведутся с 1991 г., и на сегодняшний день проведено около 20 крупных исследований, результатом каждого из которых стало появление нового опросника для измерения контроля АР. Разработанные опросники имеют ряд недостатков, к которым относятся оценки тяжести заболевания или качества жизни пациентов, а не контроля симптомов, а также отсутствие привязки к получаемой терапии и другим факторам, оказывающим влияние на уровень контроля.

В последние годы в связи с развитием проекта ARIA заметен прогресс в данном направлении: существенная доказательная база, включающая исследования валидности, свидетельствует о том, что опросник CARAT может стать международным инструментом оценки контроля: он переведен на 14 языков мира, а также адаптирован для детей 6–12 лет. Данный опросник недоступен в версии на русском языке, что, к сожалению, ограничивает его использование на территории Российской Федерации.

Вместе с тем использование CARAT в проекте MASK является прецедентом перехода от тяжести симптомов к контролю при принятии решений относительно терапии АР, т.е. примером достижения цели, указанной в официально утвержденных в Российской Федерации клинических рекомендациях по АР. Кроме того, участниками проекта MASK в ближайшем будущем на основе большого массива данных, полученных при измерении уровня контроля АР в сопоставлении с получаемой терапией и воздействием ряда факторов, планируется разработка комплексной системы поддержки принятия решения, что, несомненно, станет прорывом в достижении контроля АР. Тем не менее стоит отметить, что для обоснованного внедрения ре-

зультатов проекта потребуются проведение крупных рандомизированных клинических исследований.

Распространенная на сегодняшний день классификация АР, а также используемые подходы в выборе терапии указанной патологии в Российской Федерации, бесспорно, требуют пересмотра и переориентации на контроль над симптомами. И первым этапом этого непростого процесса должны стать адаптация валидированных инструментов оценки уровня контроля на основании международных исследований и их внедрение в практику через разработку рекомендаций на основании результатов рандомизированных клинических исследований.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gupta R., Springston E.E., Warrier M.R., Smith B., Kumar R., Pongracic J., Holl J.L. The prevalence, severity and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*. 2011; 128 (1): e9–17. DOI: 10.1542/ped.2011-0204.
2. Pawankar R., Canonica G.W., Holgate S.T., Lockey R.F., Blaiss M.S. WAO white book on allergy: Update 2013. Executive summary. World Allergy Organization (WAO). 2013: 20.
3. Meltzer E.O. Quality of life in adults and children with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 108: 45–53. DOI: 10.1067/mai.2001.115566.
4. Bergeron C., Hamid Q. Relationship between asthma and rhinitis: epidemiologic, pathophysiologic, and therapeutic aspects. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2005; 1 (2): 81–87. DOI: 10.1186/1710-1492-1-2-81.
5. Global strategy for Asthma Management and Prevention (2018 update). [cited 2019 Mar 27]. URL: <https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>
6. Emad A. Koshak. Classification of asthma according to revised 2006 GINA: Evolution from severity to control. *Ann. Thorac. Med.* 2007 Apr.–June; 2 (2): 45–46. DOI: 10.4103/1817-1737.32228.
7. Аллергический ринит у детей. Клинические рекомендации Союза педиатров России и Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов. 2016 г. URL: [https://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr\\_ar.pdf](https://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_ar.pdf). (дата обращения: 27.03.2019). [Allergic rhinitis in children. Clinical recommendations of the Union of Pediatricians of Russia and the Russian Association of Allergology and Clinical Immunology. 2016. URL: [https://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr\\_ar.pdf](https://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_ar.pdf). (Reference date: 27.03.2019) (in Russ.)].
8. Аллергический ринит. Клинические рекомендации Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов. 2018 г. URL: <http://nrcii.ru/docs/2>.



- allergic\_rhinitis.pdf. (дата обращения: 27.03.2019). [Allergic rhinitis. Clinical recommendations of the Russian Association of Allergology and Clinical Immunology. 2018. URL: [http://nrcii.ru/docs/2.allergic\\_rhinitis.pdf](http://nrcii.ru/docs/2.allergic_rhinitis.pdf). (Reference date: 27.03.2019) (in Russ.)].
9. Juniper E.F., Guyatt G.H. Development and testing of a new measure of health status for clinical trials in rhinoconjunctivitis. *Clin. Exp. Allergy*. 1991 Jan.; 21 (1): 77–83.
  10. van Oene C.M., van Reij E.J.F., Sprangers M.A.G., Fokkens W.J. Quality-assessment of disease-specific quality of life questionnaires for rhinitis and rhinosinusitis: a systematic review. *Allergy*. 2007; 62 (12): 1359–1371. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01482.x.
  11. Juniper E.F., Guyatt G.H., Andersson B., Ferrie P.J. Comparison of powder and aerosolized budesonide in perennial rhinitis: validation of rhinitis quality of life questionnaire. *Ann. Allergy*. 1993; 70 (3): 225–230.
  12. Juniper E.F., Thompson A.K., Ferrie P.J., Roberts J.N. Validation of the standardized version of the rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 104: 364–369. DOI: 10.1016/S0091-6749(99)70380-5.
  13. Juniper E.F., Thompson A.K., Ferrie P.J., Roberts J.N. Development and validation of the mini rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire. *Clin. Exp. Allergy*. 2000; 30 (1): 132–140. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2000.00668.x.
  14. Santilli J., Nathan R., Glassheim J., Rockwell W., Gold K. Validation of the rhinitis outcomes questionnaire (ROQ). *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2001; 86 (2): 222–225. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)62695-6.
  15. Juniper E.F., Rohrbach T., Meltzer E.O. A questionnaire to measure quality of life in adults with nocturnal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111 (3): 484–490. DOI: 10.1067/mai.2003.137.
  16. Piccirillo J.F., Edwards D., Haiduk A., Yonan C., Thawley S.E. Psychometric and clinimetric validity of the 31-item rhinosinusitis outcome measure. *Am. J. Rhinol.* 1995; 9: 297–306. DOI: 10.2500/105065895781808711.
  17. Anderson E.R., Murphy M.P., Weymuller E.A. Jr. Clinimetric evaluation of the sinonasal outcome test-16. Student research award 1998. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1999; 121 (6): 702–707. DOI: 10.1053/hn.1999.v121.a100114.
  18. Piccirillo J.F., Merritt M.G. Jr., Richards M.L. Psychometric and clinimetric validity of the 20-item sino-nasal outcome test (SNOT-20). *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2002; 126: 41–47. DOI: 10.1067/mhn.2002.121022.
  19. Benninger M.S., Senior B.A. The development of the rhinosinusitis disability index. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1997; 123 (11): 1175–1179. DOI: 10.1001/archotol.1997.01900110025004.
  20. Atlas S.J., Metson R.B., Singer D.E., Wu Y.A., Gliklich R.E. Validity of a new health-related quality of life instrument for patients with chronic sinusitis. *Laryngoscope*. 2005; 115 (5): 846–854. DOI: 10.1097/01.MLG.0000157693.92975.02.
  21. Douglas S.A., Marshall A.H., Walshaw D., Robson A.K., Wilson J.A. The development of a general nasal patient inventory. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 2001; 26 (5): 425–429. DOI: 10.1046/j.1365-2273.2001.00497.x.
  22. Baiardini I., Pasquali M., Giardini A., Specchia C., Passalacqua G., Venturi S. Rhinasthma: a new specific QoL questionnaire for patients with rhinitis and asthma. *Allergy*. 2003; 58 (4): 289–294. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2003.00079.x.
  23. Caldern M.A., Casale T.B., Demoly P. Validation of patient-reported outcomes for clinical trials in allergic rhinitis: a systematic review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2019 (in press). DOI: 10.1016/j.jaip.2019.01.015.
  24. Braido F., Baiardini I., Stagi E., Scichilone N., Rossi O., Lombardi C., Ridolo E., Gani F., Balestracci S., Girbino G., Senna G. E., Bordo A., Church M.K., Canonica G.W. Rhine asthma patient perspective: a short daily asthma and rhinitis QoL assessment. *Allergy*. 2012; 67 (11): 1443–1450. DOI: 10.1111/all.12014.
  25. AbuRuz S.M., Bulatova N.R., Tawalbeh M.I. Development and validation of the Arabic allergic rhinitis quality of life questionnaire. *Saudi Med. J.* 2009; 30 (12): 1577–1583.
  26. Roberts G., Hurley C., Lack G. Development of a quality-of-life assessment for the allergic child or teenager with multisystem allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111 (3): 491–497. DOI: 10.1067/mai.2003.138.
  27. Valero A., Alonso J., Antepara I., Baro E., Colas C., del Cuvillo A. ESPRINT study group and investigators. Development and validation of a new Spanish instrument to measure health-related quality of life in patients with allergic rhinitis: the ESPRINT questionnaire. *Value Health*. 2007; 10 (6): 466–477. DOI: 10.1111/j.1524-4733.2007.00202.x.
  28. Mavroudi A., Chrysochoou E.A., Boyle R.J., Papastergiopoulos A., Karantaglis N., Karagiannidou A. Validation study of the pediatric allergic rhinitis quality of life questionnaire. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2016; 34 (2): 159–165. DOI: 10.12932/AP0651.34.2.2016.
  29. Juniper E.F., Howland W.C., Roberts N.B., Thompson A.K., King D.R. Measuring quality of life in children with rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998; 101: 163–170. DOI: 10.1016/S0091-6749(98)70380-X.
  30. Bousquet J., van Cauwenberge P., Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. In collaboration with the World Health Organization. Executive summary of the workshop report. 7–10 December 1999, Geneva, Switzerland. *Allergy*. 2002 Sept.; 57 (9): 841–855. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2002.23625.x.
  31. Brozek J.L., Bousquet J., Baena-Cagnani C.E., Bonini S., Canonica G.W., Casale T.B. Allergic rhinitis and its

- impact on asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126 (3): 466–476. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.06.047.
32. Brożek J.L., Bousquet J., Agache I., Agarwal A., Bachert C., Bosnic-Anticevich S., Chavannes N.H. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) guidelines – 2016 revision. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 140 (4): 950–958. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.03.050.
  33. Bousquet P.J., Bousquet-Rouanet L., Co Minh H.B., Urbinelli R., Allaert F.A., Demoly P. ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma) classification of allergic rhinitis severity in clinical practice in France. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007; 143 (3): 163–169. DOI: 10.1159/000099307.
  34. Valero A., Ferrer M., Sastre J., Navarro A.M., Monclús L., Martí-Guadaco E., Herdman M., Dávila I., Del Cuvillo A., Colás C., Bary E., Antépara I., Alonso J., Mullol J. A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the allergic rhinitis and its impact on asthma severity items. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007. 120 (2): 359–365. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.04.006.
  35. Nogueira-Silva L., Martins S.V., Cruz-Correia R., Azevedo L.F., Morais-Almeida M., Bugalho-Almeida A., Vaz M., Costa-Pereira A., Fonseca J.A. Control of allergic rhinitis and asthma test – a formal approach to the development of a measuring tool. *Respir. Res.* 2009; 10: 52. DOI: 10.1186/1465-9921-10-52.
  36. Fonseca J.A., Nogueira-Silva L., Morais-Almeida M., Sa-Sousa A., Azevedo L.F., Ferreira J., Branco-Ferreira M., Rodrigues-Alves R., Bugalho-Almeida A., Bousquet J. Control of allergic rhinitis and asthma test (CARAT) can be used to assess individual patients over time. *Clin. Transl. Allergy.* 2012; 2 (1): 16. DOI: 10.1186/2045-7022-2-16.
  37. Fonseca J.A., Nogueira-Silva L., Morais-Almeida M., Azevedo L., Sa-Sousa A., Branco-Ferreira M., Fernandes L., Bousquet J. Validation of a questionnaire (CARAT10) to assess rhinitis and asthma in patients with asthma. *Allergy.* 2010; 65 (8): 1042–1048. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.02310.x.
  38. Borrego L.M., Fonseca J.A., Pereira A.M., Pinto V.R., Linhares D., Morais-Almeida M. Development process and cognitive testing of CARATkids – control of allergic rhinitis and asthma test for children. *BMC Pediatrics.* 2014; 14 (1): 34. DOI: 10.1186/1471-2431-14-34.
  39. Linhares D.V., da Fonseca J., Borrego L.M., Matos Á., Pereira A.M., Sá-Sousa A. Validation of control of allergic rhinitis and asthma test for children (CARATKids) – a prospective multicenter study. *Pediatric Allergy and Immunology.* 2014; 25 (2): 173–179. DOI: 10.1111/pai.12218.
  40. Emons J.A.M., Flokstra B.M.J., de Jong C., van der Molen T., Brand H.K., Arends N., Gerth van Wijk R. Use of the control of allergic rhinitis and asthma test (CARATkids) in children and adolescents: Validation in Dutch. *Pediatric Allergy and Immunology.* 2016; 28 (2): 185–190. DOI: 10.1111/pai.12678.
  41. Gani F., Lombardi C., Barrocu L., Landi M., Ridolo E., Bugiani M., Passalacqua G. The control of allergic rhinitis in real life: a multicenter cross-sectional Italian study. *Clinical and Molecular Allergy.* 2018; 16 (1): 4. DOI: 10.1186/s12948-018-0082-y.
  42. Ricardo Pereira P., Lopes C. A cross sectional assessment of allergic rhinitis and asthma control at an immunology outpatient hospital setting using CARAT10 questionnaire. *Revista Portuguesa de Pneumologia* [in Portuguese]. 2013; 19 (4): 163–167. DOI: 10.1016/j.rpneu.2013.01.004.
  43. Jalali M.M., Soleimani R., Alavi Foumani A., Ganjeh Khosravi H. Add-on probiotics in patients with persistent allergic rhinitis: A randomized crossover clinical trial. *Laryngoscope.* 2019 Feb. (in press). DOI: 10.1002/lary.27858.
  44. Nathan R.A., Dalal A.A., Stanford R.H., Meltzer E.O., Schatz M., Derebery J., Mintz M., Thompson M.A., Dibenedetti D.B. Qualitative development of the rhinitis control assessment test (RCAT), an instrument for evaluating rhinitis symptom control. *Patient.* 2010; 3 (2): 91–99. DOI: 10.2165/11318410-000000000-00000.
  45. Schatz M., Meltzer E.O., Nathan R., Derebery M.J., Mintz M., Stanford R.H., Dalal A.A., Silvey M.J., Kosinski M. Psychometric validation of the rhinitis control assessment test: a brief patient-completed instrument for evaluating rhinitis symptom control. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2010; 104 (2): 118–124. DOI: 10.1016/j.anai.2009.11.063.
  46. Novakova S.M., Novakova P.I., Yakovliev P.H., Staevska M.T., Mateva N.G., Dimcheva T.D., Peichev J.L. A three-year course of house dust mite sublingual immunotherapy appears effective in controlling the symptoms of allergic rhinitis. *American Journal of Rhinology & Allergy.* 2018; 32 (3): 147–152. DOI: 10.1177/1945892418764966.
  47. Demoly P., Jankowski R., Chassany O., Bessah Y., Allaert F.A. Validation of a self-questionnaire for assessing the control of allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy.* 2011; 41: 860–868. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03734.x.
  48. Demoly P., Calderon M.A., Casale T., Scadding G., Annesi-Maesano I., Braun J.-J., Serrano E. Assessment of disease control in allergic rhinitis. *Clinical and Translational Allergy.* 2013; 3 (1): 7. DOI: 10.1186/2045-7022-3-7.
  49. Bousquet P.J., Combescure C., Neukirch F., Klossek J.M., Mйchin H., Daures J.P. Visual analog scales can assess the severity of rhinitis graded according to ARIA guidelines. *Allergy.* 2007; 62 (4): 367–372. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01276.x.

50. Bousquet P.J., Combesse C., Klossek J.M., Dauris J.P. Change in visual analog scale score in a pragmatic randomized cluster trial of allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123 (6): 1349–1354. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.02.033.
51. Bousquet J., Lund V.J., Van Cauwenberge P., Bremond-Oury C., Mounedji N., Stevens M.T. et al. Implementation of guidelines for seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial. *Allergy.* 2003; 58 (8): 733–741. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2003.00076.x.
52. Bousquet J., Bodez T., Gehano P., Klossek J.M., Liard F., Neukirch F. Implementation of guidelines for allergic rhinitis in specialist practices. A randomized pragmatic controlled trial. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2009; 150 (1): 75–82. DOI: 10.1159/000210383.
53. Demoly P., Bousquet P.J., Mesbah K., Bousquet J., Devillier P. Visual analogue scale in patients treated for allergic rhinitis: an observational prospective study in primary care: asthma and rhinitis. *Clin. Exp. Allergy.* 2013; 43 (8): 881–888. DOI: 10.1111/cea.12121.
54. Wang Y., Zhu R., Liu G., Li W., Chen H., Dauris J.P., Chiriac A.M., Demoly P. Prevalence of uncontrolled allergic rhinitis in Wuhan, China: a prospective cohort study. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 2014; 28 (5): 397–403. DOI: 10.2500/ajra.2014.28.4079.
55. Lourenço O., Calado S., Sá-Sousa A., Fonseca J. Evaluation of allergic rhinitis and asthma control in a Portuguese community pharmacy setting. *Journal of Managed Care Pharmacy.* 2014; 20 (5): 513–522. DOI: 10.18553/jmcp.2014.20.5.513.
56. Bousquet J., Michel J., Standberg T., Crooks G., Iakovidis I., Gomez M. The European innovation partnership on active and healthy ageing: the European geriatric medicine introduces the EIP on AHA column. *Eur. Geriatr. Med.* 2014; 5 (6): 361–362. DOI: 10.1016/j.eurg-er.2014.09.010.
57. Bousquet J., Schunemann H.J., Fonseca J., Samolinski B., Bachert C., Canonica G.W., Casale T., Cruz A., Demoly P., Hellings P., Valiulis A., Wickman M., Zuberbier T., Bosnic-Anticevitch S., Bedbrook A., Bergmann K.C., Caimmi D., Dahl R., Fokkens W.J., Grisle I., Lodrup Carlsen K., Mullol J., Muraro A., Palkonen S., Papadopoulos N. MACVIA-ARIA sentinel Network for allergic rhinitis (MASK-rhinitis): the new generation guideline implementation. *Allergy.* 2015; 70 (11): 1372–1392. DOI: 10.1111/all.12686.
58. Bousquet J., Schunemann H.J., Hellings P.W., Arnavielhe S., Bachert C., Bedbrook A., Bergmann K.C., Bosnic-Anticevitch S., Brozek J., Calderon M., Canonica G.W., Casale T.B., Chavannes N.H., Cox L., Chrystyn H., Cruz A.A., Dahl R., De Carlo G., Demoly P. MACVIA clinical decision algorithm in adolescents and adults with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016; 138 (2): 367–374; e2. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.03.025.
59. Bousquet J., Arnavielhe S., Bedbrook A., Bewick M., Laune D., Mathieu-Dupas E. et al. MASK 2017: ARIA digitally-enabled, integrated, person-centred care for rhinitis and asthma multimorbidity using real-world-evidence. *Clin. Transl. Allergy.* 2018; 8 (1): 1–21. DOI: 10.1186/s13601-018-0227-6.
60. Bousquet J., Bedbrook A., Czarlewski W., Onorato G.L., Arnavielhe S., Laune D., Mathieu-Dupas E., Fonseca J., Costa E., Lourenço O., Morais-Almeida M., Todo-Bom A., Illario M., Menditto E., Canonica G.W., Cecchi L. Guidance to 2018 good practice: ARIA digitally-enabled, integrated, person-centred care for rhinitis and asthma. *Clin. Transl. Allergy.* 2019; 9: 16. DOI: 10.1186/s13601-019-0252-0.

## Сведения об авторах

**Тюфилин Денис Сергеевич**, аспирант, кафедра поликлинической терапии и общей врачебной практики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9174-6419.

**Деев Иван Анатольевич**, д-р мед. наук, профессор, кафедра факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4449-4810.

**Кобякова Ольга Сергеевна**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей врачебной практики и поликлинической терапии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-0098-1403.

**Куликов Евгений Сергеевич**, д-р мед. наук, доцент, кафедра общей врачебной практики и поликлинической терапии, СибГМУ, Томск. ORCID iD 0000-0002-0088-9204.

**Табакаев Николай Александрович**, аспирант, кафедра фтизиатрии и пульмонологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4090-3664.

## Authors information

**Tyufilin Denis S.**, Postgraduate Student, Department of Polyclinic Internal and General Medicine, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9174-6419.

**Deev Ivan A.**, DM, Professor, Department of Pediatrics with a Course in Childhood Diseases of the Department of General Medicine, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4449-4810.

**Kobyakova Olga S.**, DM, Professor, Head of the Department of General Medicine and Polyclinic Internal Medicine, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0098-1403.

**Kulikov Evgeny S.**, DM, Associate Professor, Department of General Medicine and Polyclinic Internal Medicine, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0088-9204.

**Tabakaev Nikolay A.**, Postgraduate Student, Department of Phthisiology and Pulmonology, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4090-3664.

**Винокурова Дарья Александровна**, ассистент, кафедра факультетской терапии с курсом клинической фармакологии, СибГМУ, г. Томск. iD 0000-0002-8422-8349.

**Кириллова Наталья Александровна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра общей врачебной практики и поликлинической терапии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-9549-9614.

(✉) **Тюфилін Денис Сергеевич**, e-mail: dtufilin@gmail.com.

**Vinokurova Darya A.**, Assistant, Department of Internal Medicine with a course of Clinical Pharmacology, SSMU, Tomsk. ORCID iD 0000-0002-8422-8349.

**Kirillova Natalya A.**, PhD, Associate Professor, Department of General Medical and Polyclinic Internal Medicine, SSMU, Tomsk. ORCID iD 0000-0001-9549-9614.

(✉) **Tyufilin Denis S.**, e-mail: dtufilin@gmail.com.

Received 03.04.2019

Accepted 10.06.2019

Поступила в редакцию 03.04.2019

Подписана в печать 10.06.2019

## Краткий обзор биомедицинских свойств и применения магниевых сплавов для биоинженерии костной ткани

Хлусов И.А.<sup>1,2,3</sup>, Митриченко Д.В.<sup>2</sup>, Просолов А.Б.<sup>2</sup>,  
Николаева О.О.<sup>2</sup>, Слепченко Г.Б.<sup>3</sup>, Шаркеев Ю.П.<sup>3,4</sup>

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

<sup>2</sup> Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственная компания «СИНТЕЛ» (ООО «НПК «СИНТЕЛ»)  
Россия, 634061, г. Томск, ул. Герцена, 45

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

<sup>4</sup> Институт физики прочности и материаловедения СО РАН (ИФПМ СО РАН)  
Россия, 634055, г. Томск, Академический пр., 2/4

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы.** Обзор современной научной литературы по основным достижениям и проблемам биомедицинских магниевых (Mg) сплавов для травматологии и ортопедии.

**Методология.** Аналитический обзор на основе комплексного изучения открытых научно-технических источников. Результаты работы: представлены современные сведения о классификации, биодеградации *in vitro* и *in vivo*, биомеханике, местной и системной биосовместимости, клинической эффективности и риске инфекционных осложнений при остеосинтезе имплантатами на основе Mg сплавов, в том числе с защитными (антикоррозионными и антимикробными) покрытиями.

**Заключение.** Быстрая деградация и угроза перипротезной инфекции резко ограничивают клиническое применение имплантатов на основе Mg сплавов. Разработка новых и модификация известных Mg сплавов посредством введения в состав или в покрытие антимикробных элементов признается перспективным направлением контроля их биомедицинских свойств.

**Ключевые слова:** биодеградация, *in vitro*, *in vivo*, биомеханика, биосовместимость, остеосинтез, эффективность, инфекционные осложнения.

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

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор № 388 ГР/42015 от 16.07.2018).

**Для цитирования:** Хлусов И.А., Митриченко Д.В., Просолов А.Б., Николаева О.О., Слепченко Г.Б., Шаркеев Ю.П. Краткий обзор биомедицинских свойств и применения магниевых сплавов для биоинженерии костной ткани. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 274–286. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-274-286>.

УДК 611-018.4:602.6:547.743.6

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-274-286>

## Short review of the biomedical properties and application of magnesium alloys for bone tissue bioengineering

Khlosov I.A.<sup>1,2,3</sup>, Mitrichenko D.V.<sup>2</sup>, Prosolov A.B.<sup>2</sup>,  
Nikolaeva O.O.<sup>2</sup>, Slepchenko G.B.<sup>3</sup>, Sharkeev Yu.P.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Research and Production Company SINTEL LLC  
45, Gertsena Str., Tomsk, 634061, Russian Federation

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

<sup>4</sup> Institute of Strength Physics and Materials Science of SB RAS  
2/4, Akademicheskoy Av., Tomsk, 634055, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim:** to review current scientific literature concerning the main advances and problems of magnesium (Mg) alloys for traumatology and orthopedics.

**Methodology of the study.** Analytical review based the comprehensive investigation of public scientific and technological sources.

**Results of the study.** Modern knowledge about classification, in vitro and in vivo biodegradation, biomechanics, local and general biocompatibilities, clinical efficacy, and hazards of infectious complications in conditions of osteosynthesis with implants made of Mg alloys with or without protective (anticorrosion and antimicrobial) coatings is presented.

**Conclusion.** Fast degradation and a risk of periprosthetic infection strongly limit clinical application of implants made of Mg and its alloys. Development of novel Mg alloys and their modification by incorporating antimicrobial elements into their body or protective coating is a promising direction to control biomedical characteristics of Mg alloys.

**Key words:** biodegradation, *in vitro*, *in vivo*, biomechanics, biocompatibility, osteosynthesis.

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

**Source of financing.** The study was supported by the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology Sector (contract No. 388 ГП/42015 dated 16.07.2018).

**For citation:** Khlosov I.A., Mitrichenko D.V., Prosolov A.B., Nikolaeva O.O., Slepchenko G.B., Sharkeev Yu.P. Short review of the biomedical properties and application of magnesium alloys for bone tissue bioengineering. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 274–286. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-274-286>.

### ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях реальная потребность в имплантатах для остеосинтеза и эндопротезирования суставов превышает предложение в 3–5 раз. При этом рынок медицинских изделий для биоинженерии костной ткани занимают, в основ-

ном, имплантаты из длительно растворяющихся биоинертных металлов и сплавов [1], в том числе несущих биоинертное (металлоксидное) либо биоактивное покрытия (кальцийфосфатное, биостекло, стеклокерамическое и т.п.). Известны три основные группы биodeградирующих материалов,

которые позволяют применить их для остеосинтеза: полимеры, керамика и ее композиты, металлосинтетический магний [1].

Материалы на основе магния (Mg) имеют ряд преимуществ перед биоинертными сплавами металлов, полимерами и биокерамикой. Магний – жизненно важный химический макроэлемент (0,2% массы тела), который считается нетоксичным, депонируется в костной ткани [2], имеет хорошую биосовместимость, биodeградируемость, абсорбируемость, высокий предел прочности в сравнении с полимерами и более высокую эластичность в сравнении с керамикой [3], что предполагает его применение в качестве костных имплантатов.

Нормативно установлена предельно допустимая концентрация магния в воде на уровне 20–85 мг/л [4]. Превышение допустимых концентраций при быстром растворении (разрушении) Mg-содержащих медицинских изделий может сопровождаться гипермакроэлементозом, что приводит к нежелательным реакциям организма, особенно на фоне хронической почечной недостаточности (остеомаляция, гипотензия, нарушение нервно-мышечной импульсации, кома). Таким образом, скорость биodeградации магниевого сплава не должна превышать скорость регенерации тканей и вызывать преждевременное разрушение имплантата, продукты деградации, включая легирующие элементы, должны усваиваться организмом без токсических эффектов. Основанием для проведения работ является договор № 171/18 от 12.11.2018 г. с Обществом с ограниченной ответственностью «ЮМХ» (далее ООО «ЮМХ»).

Цель работы – обзор современной научной литературы по актуальности контроля биodeградации и механических свойств биомедицинских магниевых сплавов в процессе репаративной регенерации костной ткани в травматологии и ортопедии. Обзор имеет комплексный междисциплинарный характер, в котором различные аспекты решаемой научно-технической проблемы рассматриваются и раскрываются с точки зрения химиков-аналитиков, врачей, биологов и медицинских материаловедов.

## БИОМЕДИЦИНСКИЕ МАГНИЕВЫЕ СПЛАВЫ

Использование сплавов магния в качестве клинических имплантатов для сердечно-сосудистой, скелетно-мышечной и общей хирургии известно давно [5, 6]: в 1878 г. врач Е.С. Нусе применил магниевую проволоку как лигатуру при кровотечении; в 1900 г. австрийский хирург

Е. Рауг описал магниевый гвоздь как интрамедуллярный фиксатор при переломе костей, в этом же году он использовал магниевые листы и пластины при частичной гепатэтомии; в 1903 г. Е. Рауг применял малоинвазивное лечение кавернозной гемангиомы имплантацией магниевых иголок. Конец 1990-х гг. рассматривается как новая эра биodeградирующих фиксаторов на основе магниевых сплавов для остеосинтеза [1] в связи с нерешенными проблемами травматологии и ортопедии, например длительное пребывание имплантатов в организме (разрушение изделия, асептическое расшатывание, местный металлоз, интоксикация продуктами износа и (или) коррозии, перипротезная инфекция).

Биомедицинские материалы на основе магниевых сплавов включают три группы [7, 8]:

- 1) Mg сплавы, содержащие алюминий (например, AZ31, AZ91, AE21);
- 2) Mg сплавы, не содержащие алюминий (типичные – ZX10, ZX50);
- 3) Mg сплавы с редкоземельными (rare earth, RE) металлами (WZ21, ZW21, WE43).

Согласно [9], наиболее распространенными коммерческими Mg сплавами являются следующие серии: AZ (Mg–Al–Zn), AM (Mg–Al–Mn), AE (Mg–Al–RE), EZ (Mg–RE–Zn), ZK (Mg–Zn–Zr) и WE (Mg–RE–Zr). В биологических исследованиях активно применяются коммерческие Mg сплавы AZ (Mg–Al–Zn), WE (Mg–RE–Zr), и ZK (Mg–Zn–Zr) серий [10].

С другой точки зрения, на рынке представлены несколько видов коммерческих / промышленных сплавов на основе магния, обладающих схожими биокоррозионными и механическими свойствами: МЛ-5 и МЛ-10 в отечественной промышленности; AZ91A, AZ91B, AZ91C, AZ91D, AZ91E, LAE442, WE43 – на мировом рынке. Наиболее часто в экспериментах используют сплав циркония и магния (AZ91), магния и кальция (LAE442) [1, 5, 11].

## БИОДЕГРАДАЦИЯ МАГНИЕВЫХ СПЛАВОВ IN VITRO

Следует заметить, что для Mg сплавов в большей степени употребляют термин «коррозия» вместо термина «деградация», особенно *in vivo*, подчеркивая превалирующий электрохимический механизм растворения металла в биологических жидкостях [12]. Кроме того, следуя стандарту ASTM F3160-16, взамен широко употребляемого термина «биodeградация» применяют «абсорбция», подчеркивая факт достаточно легкого усвоения и метаболизации жизненно важных элементов из инородных тел клетками и тканями ор-



ганизма. Абсорбируемые металлы включают железо, магний, цинк и их сплавы [13, 14]. С одной стороны, налицо развитие нового направления с формированием специфической терминологии. С другой стороны, не совсем понятно исключение меди их списка абсорбируемых металлов. При этом не стоит забывать известную токсичность даже эссенциальных химических элементов, тем более легирующих добавок в их сплавах. Поэтому абсорбция, на наш взгляд, является частным случаем деградации в узком диапазоне нетоксичных концентраций, которые не всегда достигаются для металлических имплантатов.

Коррозионные исследования могут быть разделены на три основные группы [15]:

1) лабораторные, при которых все условия коррозии контролируются. Зачастую это ускоренные испытания в заведомо более жестких условиях, чем эксплуатационные;

2) стендовые – это испытания близкие к естественным, в контролируемых условиях;

3) эксплуатационные, которые проводятся в реальных условиях при менее строгом контроле.

В водной среде магний корродирует быстрее, чем другие металлы, тем более в присутствии хлора и других анионов [16], содержащихся в биологических жидкостях – слабых электролитах.

Лабораторные испытания Mg сплавов МЛ-5 ( $Mg_{7,5}-9,0Al_{0,2}-0,8Zn_{0,15}-0,5Mn$  мас. %) и МЛ-10 ( $Mg_{0,1}-0,7Zn_{0,4}-1,0Zr_{2,2}-2,8Nd$  мас. %), при практически одинаковых показателях механической прочности (прочность на разрыв 226 МПа, относительное удлинение 2–3%), выявили полное растворение пластин МЛ-5 с линейными размерами  $10 \times 5$  мм после 30 сут пребывания в 3%-м водном растворе хлорида натрия при температуре 38 °С. Потеря массы сплава МЛ-10 составила 4%, что считается высокой растворимостью для остеосинтеза [11].

AZ31 ( $Mg-3Al-1Zn$ ) и AZ91 ( $Mg-9Al-1Zn$ ) сплавы активно выделяют водород, увеличивают pH и концентрацию Mg в окружающей среде [17]. В растворе Хэнкса сплав AZ31 деградирует медленнее, чем AZ91, но *in vivo* эти различия не подтверждены [18, 19]. При этом следует учитывать, что длительное выделение алюминия несет риск болезни Альцгеймера [10, 20]. Кроме того, в AZ серии Mg сплавов (AZ 21-31-63-91) присутствует до 0,01 мас. % никеля [21], обладающего сенсibilизирующими, токсическими и канцерогенными свойствами.

ZK серия Mg сплавов, в первую очередь ZK40 ( $Mg-4Zn-0,5Zr$ ) и ZK60 ( $Mg-6Zn-0,5Zr$ ), имеет лучшую биологическую безопасность по легиру-

ющим элементам в сравнении с AZ и WE классами. Ежедневное усвоение 11 мг Zn и 50 мкг Zr легко переносится организмом [22], но ускоренная биодеградация имплантатов тормозит их использование в клинических приложениях [10].

WE серия Mg сплавов (Mg-RE-Zr), в частности WE54 ( $1,58Nd; 4,85Y; 0,28Zr; 0,08Ce; 0,13Gd; 0,16Er; 0,13Yb$ ), формирует в водной среде пленку из оксидов редкоземельных металлов, что тормозит коррозию магния в сравнении с чистым металлом [23] с 8 до 4,3 мм/год для WE43 композита [14]. Проблемой Mg сплавов с редкоземельными металлами является гепатотоксичность Y и Ce [20].

Для ортопедических приложений активно изучаются другие Mg сплавы, в том числе Mg-Ca, Mg-Sr, Mg-Zn и Mg-RE. Сплавы системы Mg-xCa (x = 1–3 мас. %) состоят из двух фаз: альфа-Mg и  $Mg_2Ca$ . Скорость коррозии в СТЖ при 37 °С для Mg-1Ca составляет 12,5 мм/год (у чистого Mg 8 мм/год) [14], по-видимому, в случае увеличения бинарной фазы в составе сплава [24]. Напротив, увеличение доли Zn в бинарном Mg сплаве до 6 мас. % улучшает механические свойства и коррозионную стойкость в СТЖ (раствор, имитирующий телесную жидкость) с отложением гидроксиапатита (ГАП) и кальций-замещенного Mg-ГАП в поверхностном коррозионном слое [25, 26].

В ряду бинарных Mg-RE сплавов наибольшей коррозионной стойкостью обладает Mg-Nd по сравнению с Mg-Y, Mg-Gd, Mg-Ce, Mg-Ld, в целом характеризующихся хорошими механическими и антикоррозионными свойствами [27].

В электрохимическом исследовании L. Xu и соавт. (2008) были использованы высокоочищенные сплавы Mg-Mn ( $Mg-1,2Mn$ , мас. %), Mg-Mn-Zn ( $Mg_{1,2Mn}-1Zn$ , мас. %) и WE43 ( $Mg-4,0Y-3,0Nd-0,5Zr$ , мас. %), площадь контакта с электролитом составила 1 см<sup>2</sup> [28]. В качестве электролита использовалась забуференная фосфатом ( $KH_2PO_4$  и  $Na_2HPO_4$ ) СТЖ; pH = 7,3–7,5 контролировалась NaOH). Сплавы в качестве рабочих электродов погружались в СТЖ на 20 мин, поляризационные кривые снимали при скорости сканирования 0,3 мВ/с. Оказалось, что сплав WE43 обладал наибольшей коррозионной устойчивостью в электрохимическом тесте.

Далее авторами была изучена потеря/прибавка массы тестируемых образцов при  $(37 \pm 1)$  °С в течение 24, 48, 96 и 216 ч при соотношении площади поверхности образцов к объему СТЖ 1 см<sup>2</sup>/500 мл. Тестируемые сплавы Mg быстро корродировали в первые 24–48 ч с выделением

Mg и обратным осаждением аморфного фосфата магния (с 4 мг/см<sup>2</sup> в первые 24 ч до 15 мг/см<sup>2</sup> через 216 ч). Потеря массы образцов нарастала с увеличением времени растворения в шкале: Mg–Mn > WE43 > Mg–Mn–Zn. В период 48–96 ч скорость растворения / преципитации стабилизировалась, что свидетельствовало в пользу защитного эффекта фосфатного, прежде всего цинк-содержащего (для сплава Mg–Mn–Zn), слоя на коррозию магниевых сплавов.

Итак, легирующие элементы (Al, Mn, Ca, Zn, RE) преимущественно улучшают коррозионную устойчивость Mg изделий [29]. Однако следует учитывать потенциальную токсичность продуктов коррозии Mg и его сплавов. Согласно серии ASTM стандартов, 22 химических элемента (Al, Bi, Cu, Cd, RE, Fe, Th, Sr, Zr, Li, Mn, Ni, Pb, Ag, Cr, Si, Sn, Gd, Y, Ca, Sb, Zn), среди которых есть токсичные и жизненно необходимые элементы, разрешены для разработки Mg сплавов [30].

X. Gu и соавт. (2009) в течение 20 сут изучали *in vitro* биодеградацию 9 бинарных Mg–1X (мас. %) сплавов, легированных Al, Ag, In, Mn, Si, Sn, Y, Zn или Zr, в виде пластин 10 × 10 × 2 мм<sup>3</sup> в 50 мл раствора Хэнкса или СТЖ при 37 °C. В зависимости от легирования, концентрация Mg достигала в СТЖ 1,5–3,5 г/л, в физиологическом растворе 0,5–4,5 г/л. Содержание легирующих добавок через 20 сут составило для раствора Хэнкса и СТЖ, соответственно: алюминий 55 и 70 мг/л; серебро почти 20 мг/л; марганец и цинк практически 10 и 15 мг/л; кремний 20 и 25 мг/л; олово более 25 и 75 мг/л [21].

Таким образом, бинарные Mg сплавы проявляют во многом сходный (одного порядка) выход элементов в СТЖ и раствор Хэнкса. Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воде, согласно СанПиН 2.1.4.1074-01 [4], составляет (мг/л): 20–85 магния, 0,05 серебра, 0,1 марганца, 0,5 алюминия, 1–5 цинка, 2,0 олова и 10 кремния. При этом следует учитывать, что при длительном растворении Mg сплавов в стационарных (без протока жидкости) условиях наблюдается многократное превышение ПДК, которое может иметь негативный биологический эффект в первоначальный период в условиях нарушения микроциркуляции в зоне имплантации.

Для снижения скорости биодеградации, повышения коррозионной устойчивости Mg и его сплавов, контроля выхода легирующих элементов применяются методы химической, физической и комбинированной физико-химической модификации поверхности. Химическая модификация подразумевает формирование новых фаз на по-

верхности Mg сплавов посредством химических или электрохимических реакций, в том числе кислотное травление, щелочное термическое травление, фторирование, анодное и микродуговое оксидирование [31]. Микродуговое оксидирование можно считать физико-химическим методом модификации поверхности, поскольку переходный слой между подложкой и покрытием формируется за счет химических реакций, наращивание покрытия в большей степени протекает посредством физических процессов.

Физическая модификация подразумевает нанесение покрытий (апатитовых, полимерных, композитных и др.) без формирования химических связей между ним и Mg подложкой. Предлагаются различные методы нанесения покрытий на изделия: анодизация, плазменные покрытия, газофазное химическое осаждение (CVD), импульсное лазерное напыление (PLD), ионно-лучевое осаждение (IBAD), осаждение из раствора [32].

Подробно методы модификации поверхности Mg сплавов и их антикоррозийный эффект представлены в обзоре [10]. Проблема заключается в том, что покрытия должны обладать одновременно барьерными / биодеградируемыми свойствами и сглаживать нежелательные эффекты растворения Mg (неконтролируемая потеря механических и потребительских свойств имплантата, избыточное газообразование в зоне имплантации) [3].

При этом считается, что в случае нахождения Mg и его сплавов в хлоридном растворе пассивные стабильные пленки (Mg(OH)<sub>2</sub>, MgO) не образуются. Более того, никакие ранее сформированные защитные пленки специальной химической обработкой поверхности (фосфатирование, оксидирование, фторирование исходных материалов) неустойчивы при контакте с ионами хлора (снижение скорости растворения наблюдается только в течение первых дней испытаний). Тем не менее лабораторные испытания в контролируемых жестких условиях применяют для определения стойкости защитных покрытий [15] с использованием традиционного весового метода контроля деградации магниевых сплавов и химико-аналитического метода оценки процесса растворения в физиологическом растворе (0,9%-й NaCl) в динамическом режиме испытаний.

По мнению С.В. Гнеденкова и соавт. (2016), кальций-фосфатные (КФ) покрытия, в том числе содержащие ГАП, позволяют достичь биосовместимости имплантата, однако не защищают Mg сплав от коррозии. В качестве объектов исследования были использовали следующие магниевые сплавы (мас. %): MA8 – 1,5–2,5 Mn, 0,15–

0,35 Ce, остальное Mg; MA14–5,0–6,0 Zn, 0,3–0,9 Zr, остальное Mg; MA20 – 0,1 Mn, 1,0–1,5 Zn, 0,05–0,12 Zr, 0,12–0,25 Ce, остальное Mg. При 28-суточном исследовании *in vitro* в СТЖ разработанный авторами способ формирования композиционных полимерсодержащих покрытий на Mg сплавах посредством последовательной обработки поверхности образцов методами плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) в глицерофосфате кальция и погружения в спиртовую суспензию ультрадисперсного политетрафторэтилена является перспективным. Исследование элементного состава образцов с ПЭО-покрытиями показало, что на их поверхности присутствуют гидроксид магния и гидроксиапатит. Установлено, что композиционные покрытия на Mg сплавах, с одной стороны, являются защитными (по уменьшению выхода водорода), с другой – не препятствуют контакту находящегося в поверхностных слоях гидроксиапатита с биологической средой [33].

В то же время значительное число публикаций посвящено защитному (антикоррозионному) эффекту КФ слоев на магниевых сплавах. Разновидности КФ покрытий наиболее часто используются для модификации поверхности Mg изделий для кости [34]. Так, согласно J.V. Rau и соавт. (2018), импульсное лазерное напыление ГАП покрытия эффективно для контроля *in vitro* биодеградации Mg–1,4Ca сплава в СТЖ [35]. Ранее эта группа показала подобный антикоррозионное действие композитного (ГАП и воластонит) РККР-стеклокерамического толстого (100 мкм) наношероховатого ( $295 \pm 30$  нм) слоя [36].

Электрохимическое КФ покрытие толщиной 5 мкм на Mg–Ca сплаве способствует значительному подавлению миграции ионов Mg в культуральную клеточную среду Игла и на 95% снижает плотность тока при 2-часовой коррозии в СТЖ. Однако через 72 ч контакта с СТЖ поляризационное сопротивление уменьшается на 82%, что свидетельствует в пользу разрушения покрытия [37].

ГАП или октакальций-фосфатное (ОКФ) покрытие, полученные на сплаве AZ31 химическим осаждением из раствора, в первые 7 сут коррозионного теста ингибировали выход ионов магния, снижали примерно наполовину степень коррозии Mg сплава в течение 52 нед исследования. При этом ГАП покрытие на 20% оказалось эффективнее в сравнении с октакальций-фосфатным слоем. Коррозия протекала под покрытием, диффузно *in vitro* и локально (с образованием ямок) *in vivo* без образования гигантских мно-

гоядерных клеток инородных тел в окружающих тканях [38].

В работе F. Witte и соавт. (2006) проведено сравнительное исследование биодеградации магниевых сплавов AZ91D и LAE442 *in vitro* и *in vivo* согласно ASTM стандартам. Погружной и электрохимический тесты использовались для *in vitro* эксперимента. Было выполнено *in vivo* интрамедуллярное введение в бедро морских свинок с оценкой коррозии методом синхротронной микротомографии. В костномозговой полости степень биодеградации оказалась в 4 раза меньше, что, по мнению авторов, не позволяет считать *in vitro* тесты адекватными для предварительной оценки коррозии магниевых сплавов [18].

Согласно ISO стандартам, *in vitro* тестирование является обязательным этапом для изучения пригодности и приемлемого отклика новых материалов для биомедицины. В то же время высокая электрохимическая активность Mg и вариативность его микроокружения делают его коррозию непредсказуемой, что требует разработки *in vitro* тестов, реально коррелирующих с *in vivo* поведением Mg сплавов [39].

## БИОДЕГРАДАЦИЯ МАГНИЕВЫХ СПЛАВОВ IN VIVO

*In vivo* эксперименты на животных проводятся в приближенных к предполагаемым клиническим условиям, позволяют оценить местную тканевую реакцию и системную токсичность с использованием анализа крови и мочи, радиографических, микротомографических исследований, гистологического анализа, изучения состояния имплантата [40]. Реакция костной ткани на биодеградируемые Mg сплавы зависит от степени и продуктов их коррозии, а также стабильности имплантата [10].

Коррозия Mg изделий сопровождается выходом частиц металлического магния, продуктов его химической коррозии (60% – фосфаты магния и аммония  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot (6\text{H}_2\text{O})$ , 20% – карбонат магния  $\text{MgCO}_3$ , 10% – гидроокись  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , 10% – карбонат кальция  $\text{CaCO}_3$ ) и сопутствующих газов водорода и азота [5]. Один грамм Mg может генерировать 1 л газообразного водорода с развитием эмфизематозного расширения мягких тканей [41]. Продукты коррозии магниевого сплава локально повышают осмотическое давление и изменяют pH, что может влиять на формирование костной мозоли. Отдельную проблему представляют газообразные продукты [1, 6], которые могут приводить к эмболии кровеносных сосудов.

Скорость и степень *in vivo* коррозии магния и его сплавов зависят от многих условий, включая физико-химическое состояние и геометрию изделий, место их имплантации. Согласно сообщению E.D. McBride (1938), в плечевой кости человека 1 г Mg4%Al0,3%Mn сплава полностью растворяется через 120 сут. A. Lambotte (1932) описал сохранение механической стабильности пластин и прутков из чистого (99,7 мас. %) Mg при сдавливании пальцами через 4 мес имплантации; через 6 мес появились полости и ломкость изделий; через 9–10 мес автор отметил полное растворение без инфекционных и болевых осложнений [5]. В то же время под кожей собак сплав магния и марганца и коммерчески чистый Mg (99,9 мас. %) корродировали гомогенно с низкой скоростью (2 мг/сут) [42].

В 2012 г. Т. Краус и соавт. с помощью компьютерной микротомографии бедренной кости лабораторных крыс определяли 24-недельную биодеградацию цилиндрических штифтов (стержней) сплавов ZX50 (Mg–Zn–Ca) и WZ21 (Mg–Y–Zn–Ca) для биомедицинских приложений. Площадь поверхности ZX50 имплантатов заметно уменьшалась через 4 нед; общее уменьшение объема стержней достигало в среднем 50% после 6,5 нед при скорости деградации 1,2% в сут с массивным выделением водорода. Напротив, WZ21 стержни в первые 2 мес после введения теряли 2,3% от первоначального объема; в первые 4 нед объем имплантатов несколько увеличивался из-за преципитации продуктов деградации; после 8 нед линейная скорость деградации составила 0,5% в сут, 50%-я потеря объема стержней была отмечена только после 21,5 нед эксперимента на крысах. Выделение водорода в период быстрой коррозии на 8–21-й нед достигало 130 мм<sup>3</sup>, за весь период составило в среднем 7 мм<sup>3</sup> и переносилось животными без последствий для костной ткани и всего организма [43].

*In vivo* деградация сплавов системы Mg–xCa (x = 0,8–3 мас. %) в костях лабораторных животных, подробно описанная в обзоре [44], во многом схожа с другими материалами на основе магния: постепенная коррозия до полной или половинной абсорбции в период 3–12 мес (в зависимости от линейных размеров изделия), остеогенный эффект (формирование новой минерализованной кости вокруг имплантатов), газообразование и стабильная фиксация в кости в первые месяцы исследований. При этом КФ покрытия во всех случаях повышают устойчивость Mg сплавов к коррозии и их биосовместимость согласно обзору [45].

## БИОМЕХАНИКА МАГНИЕВЫХ СПЛАВОВ

Большой интерес вызывает эластичность магниевых сплавов, ведь кость как живая ткань постоянно ремоделирует под напряжением, и этот процесс может привести к стрессовому перелому имплантата. Для примера, модуль жесткости для нержавеющей стали – около 200 ГПа, для титановых сплавов – почти 115 ГПа. Mg сплавы имеют модуль упругости около 40–45 ГПа, который наиболее соответствует таковому для кости (3–40 ГПа) [5, 11, 28], что снижает эффект «экранирования нагрузки» на костную ткань вокруг металлических имплантатов [46].

Удельная плотность Mg и его сплавов составляет примерно 1,7–1,9 г/см<sup>3</sup>, что весьма близко к показателю для свода черепа человека (1,75 г/см<sup>3</sup>) [43]. Плотность сплава титана BT-6 (s (Ti–6Al–4V) составляет 4,47 г/см<sup>3</sup>, медицинской стали – 7,8 г/см<sup>3</sup> [10].

Регенерация кости включает фазы воспаления (3–7 сут), формирования костной мозоли (до 3–4 мес) и ремоделирования (до 1 года) [10]. В связи с этим имплантат должен быть механически стабильным, по крайней мере, 12 нед [47].

Легирование магниевого материала (кальций, алюминий, цинк, марганец, редкоземельные металлы, например, иттрий, гадолиний, неодим) для биомедицинских приложений является важнейшим аспектом улучшения его коррозионной стойкости и механической прочности. Однако следует учитывать потенциальную токсичность продуктов коррозии магниевых сплавов. ПДК в воде, согласно СанПиН 2.1.4.1074-01, для марганца составляет всего 0,1 мг/л, для алюминия 0,5 мг/л, для цинка 1–5 мг/л, для кальция 140 мг/л [4].

Другими словами, в плане биоинженерии костной ткани и потенциальной токсичности привлекательным легирующим элементом является кальций. Интересно, что сила фиксации винтов из биодеградируемого Mg–0,8Ca сплава в большеберцовой кости кроликов при одноосном разрыве (скорость 0,1 мм/с) 2–3 нед после имплантации статистически не отличалась от таковой для стальных (S316L) изделий. В последующем (до 8-й нед эксперимента) остеоинтеграция Mg сплава снижалась вследствие постепенной биодеградации винтов, сопровождавшейся потерей их массы и объема [48].

Стабильная межфазная граница «кость – имплантат» является необходимым условием успешного клинического использования изделий для биоинженерии кости. С биомеханических

позиций Mg–Y–Nd–Hf сплав на основе WE43, например, имеет сравнимую силу сцепления с Ti–6Al–7Nb [49]. Однако влияние кальция на механические свойства магниевых сплавов неоднозначно. Условный предел текучести у сплава Mg–0,9%Ca, в сравнении с чистым Mg, повышается с 30÷35 до 95 МПа, в то же время относительное удлинение сплава уменьшается с 10÷12 до 2÷3%. [50]. С увеличением в сплаве концентрации кальция до 3 мас. % снижается предел прочности на разрыв и относительное удлинение [24].

### МЕСТНАЯ И СИСТЕМНАЯ БИОСОВМЕСТИМОСТЬ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ МАГНИЕВЫХ СПЛАВОВ ДЛЯ ОСТЕОСИНТЕЗА

Согласно одной из классификаций [6], выделяют два класса современных биоматериалов: резорбируемые и биоактивные. Имплантаты на основе магния и его сплавов являются резорбируемыми и, по-видимому, биоактивными биоматериалами [6] вследствие их способности индуцировать рост костной ткани [8].

Сплав Mg–1%Ca не проявляет *in vitro* цитотоксичности в отношении L-929 клеток фибросаркомы мыши. Стержни Mg–1%Ca постепенно деградируют в бедренной кости кроликов в течение 90 сут с замещением на вновь образуемую кость без увеличения концентрации магния в сыворотке крови [24]. При этом электрохимическое КФ покрытие толщиной 5 мкм на Mg–Ca сплаве улучшает выживаемость L-929 клеток в культуральной среде Игла с 10%-й фетальной бычьей сыворотки [37]. Далее Mg–0,6–1,2Ca сплавы не влияли *in vitro* на жизнеспособность и функциональную активность дендритных клеток (ДК) и пролиферацию Т-лимфоцитов, что исключает иммуногенность материала при невысоких скоростях коррозии. В случае значительной концентрации магния порядка 10 мМ имели место усиленная экспансия и миграционная активность ДК [51].

Бинарный сплав Mg–6Zn не вызывал *in vitro* значительного гемолиза (3,4% при пределе 5% согласно стандарту ISO 10993-4), не тормозил адгезию бессмертной мышечной линии MC3T3-E1 преостеобластов при 2-часовой инкубации в DMEM питательной среде, несмотря на колебания pH [25]. Аналогичные результаты получены для экстрактов бинарных Mg–1X (мас. %) сплавов, Al, Ag, In, Mn, Si, Sn, Y, Zn или Zr. Из девяти видов образцов удалось установить, что Mg–1Al, Mg–1Sn, Mg–1Zn, Mg–1Si, Mg–1Y, Mg–1Zr не

показали *in vitro* цитотоксичность в отношении MC3T3-E1 клеток. Для экстрактов Mg–1In, Mg–1Mn, Mg–1Si и Mg–1Y степень гемолиза составила менее 5%. Тем не менее в разные сроки (2-, 4- или 7-е сут) сокультивирования с разными клетками (MC3T3-E1 клетки; L-929 и NIH3T3 фибробласты мыши; VSMC линия гладкомышечных клеток грызунов; ECV304 линия эндотелиоцитов пуповины человека) многие экстракты чистого и легированного магния, прежде всего Mg–1Ag композита, проявляли статистически значимую цитотоксичность [21], которую авторы связали с массивным выходом легирующих элементов (см. «Биодеградация магниевых сплавов *in vitro*»), но не магния или защелачиванием культуральной среды, отмеченными при биодеградации в растворе Хэнкса или СТЖ.

Новая костная ткань толщиной 10–30 мкм вокруг Mg–Zn–Mn имплантатов в кости крыс начинает формироваться после 6 нед имплантации, достигает максимума в период 10–26 нед. Дегградация имплантатов сопровождалась незначительным, по мнению [52], изменением состава крови, но не печени и почек. Напротив, ZEK100 (Mg–1,3Zn–0,2Nd–0,25Zr, примесь Mn 0,01 мас. %) сплав вызывает локальные патологические изменения костей при медленной коррозии и удовлетворительной биосовместимости в организме белых кроликов [40]. Авторы заключили, что контролируемая длительная биодеградация является желательным, но не достаточным условием успешной остеointеграции Mg сплавов.

Т. Kraus и соавт. (2012) изучали гистологию бедренной кости лабораторных крыс через 4, 12, 24 и 36 нед после введения цилиндрических штифтов (стержней) сплавов ZX50 (Mg–Zn–Ca) и WZ21 (Mg–Y–Zn–Ca) для биомедицинских приложений. Авторы не обнаружили значительной потери массы животных, вокруг быстро деградирующих ZX50 имплантатов отмечено образование новой костной ткани. До 12-й нед выделение водорода приводило к нарушению формирования костной мозоли вокруг стержней ZX50, к 16-й нед кортикальный дефект заживал, костномозговая полость восстанавливалась через 24 нед эксперимента. Усиленный остеогенез вокруг WZ21 стержней наблюдался на 4–8-й нед без нежелательных эффектов газов водорода, фазы ремоделирования костной ткани (остеоллиз / регенерация) протекали сбалансированно. В пределах 36 нед исследования не было значительных признаков коррозии поверхности WZ21 сплава с сохранением плотного контакта с окружающей костной тканью [43]. Согласно результатам

F. Witte и соавт. (2005), в костной ткани щелочной коррозионный слой на магниевых сплавах аккумулирует биологические фосфаты кальция, что обуславливает прямой контакт имплантатов с окружающей костной тканью, а ионы магния активируют остеобласты [8].

В таком случае КФ покрытия должны усиливать остеоинтеграцию Mg сплавов. Действительно, слой бета-трикальцийфосфата на AZ31 (Mg–3Al–1Zn) сплаве способствует *in vitro* пролиферации, адгезии и экспрессии морфогенетического белка кости (BMP-2) в культуре клеток остеосаркомы человека (SaOS-2), снижает коррозию имплантата *in vivo* (на 16%) и улучшает остеокондуктивные свойства в первые 12 нед после операции за счет абсорбции [53].

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАГНИЕВЫХ СПЛАВОВ

Современных клинических исследований Mg сплавов для биоинженерии костной ткани в литературе представлено немного. В основном в клинических приложениях применяются винты на основе Mg сплавов в местах, не требующих значительной опорной нагрузки вследствие недостаточной механической прочности материала.

В первую очередь, следует выделить работу Н. Windhagen и соавт. (2013), которые провели пилотное исследование клинической эффективности компрессионных винтов MAGNEZIX (Syn-tellix AG, Hannover, Германия) на основе сплава Mg–Y–RE–Zr согласно стандарту DIN EN 1753:1997-08 (состав сходен со сплавом WE43 (мас. %): Mg<sub>3,7</sub>–4,3Y<sub>2,4</sub>–4,4Re<sub>0,4</sub>Zr; удельная плотность 1,8 г/см<sup>3</sup>) на 26 пациентах с вальгусной деформацией первого пальца стопы. Клинические испытания были признаны успешными, поскольку не было различий субъективных и болевых ощущений, радиографических и лабораторных тестов в сравнении с традиционными титановыми винтами. Через 1–2 года имплантаты полностью рассасывались [54, 55]. В 2017 г. данные винты получили сертификационный знак CE на соответствие стандартам безопасности для здоровья и окружающей среды в Европейском экономическом пространстве [56].

В Южной Корее проведено длительное клиническое исследование винтов из Mg–5Ca–1Zn сплава при несрастающемся дистальном радиальном переломе ладьевидной кости запястья у 53 добровольцев. Через 1 год отмечено полное срастание места перелома с формированием новой кости взамен практически полностью растворившихся винтов с отсутствием болевых ощу-

ний и ограничений подвижности сустава [57]. В 2015 г. данные винты получили одобрение FDA (Food and Drug Administration) Южной Кореи и коммерциализуются как K-MET биорезорбируемые костные винты фирмой U&i Corp. (Gyeonggi-do, Республика Корея) [14].

В Китайской Народной Республике, согласно обзорам [14, 58], проведены клинические испытания Mg сплавов для остеосинтеза. Среди опубликованных данных следует выделить работу D. Zhao и соавт., которые с 2013 г. в течение года наблюдали за состоянием 25 пациентов после фиксации винтами из чистого Mg головки бедренной кости при остеонекрозе с удовлетворительными результатами высокой степени согласно шкале Харриса. Многообещающие результаты клинического изучения пластин, спиц и скаффолдов на основе Mg сплавов далеки до завершения и коммерциализации [34].

Выраженные газообразование, отек и болевые ощущения в первую неделю после имплантации, согласно [10, 59], остаются, в большинстве случаев, нерешенными клиническими проблемами Mg сплавов.

## ИНФЕКЦИОННЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ

Перипротезные инфекции являются серьезной угрозой в ортопедии и травматологии. В системе *in vitro* магниевые сплавы проявляют антимикробный эффект (например, [60]) вследствие увеличения значений pH и накопления гидроокисей. Напротив, у животных описана (в частности, [61]) необъяснимая повышенная восприимчивость имплантатов на основе магниевых сплавов к бактериальному воспалению с образованием бактериальной биопленки, несмотря на сопровождающую терапию антибиотиками. Одной из наиболее вероятных причин может быть преобладание скорости коррозии Mg сплава над тканевой регенерацией, приводящее к снижению прочности фиксации имплантата в кости и его расшатыванию. В свою очередь, известно, что механическая нестабильность имплантата способствует развитию инфекционных осложнений остеосинтеза [62].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На протяжении 20 последних лет ожидается, что биосовместимые, биodeградируемые, легкие и механически прочные магниевые сплавы найдут широкое применение в качестве имплантатов для ортопедии и травматологии [29]. Тем не менее быстрая неконтролируемая деградация и угроза перипротезной инфекции резко ограничивают их



клиническое внедрение. Разработка новых вариантов Mg сплавов посредством введения в состав или в покрытие жизненно важных элементов признается перспективным направлением контроля их деградации [10].

В связи с этим использование стратегии с добавлением антимикробных металлов (серебро, эссенциальные медь или цинк) в магниевый сплав или в состав покрытия рассматривается как современный подход к предупреждению инфекционных осложнений при соблюдении равновесия местной бактерицидности и нетоксичности для организма хозяина [41]. Серебро проявляет выраженную токсичность даже в низких концентрациях (мкМ) в отношении фибробластов и остеобластов [21, 63]. Однако введение меди в состав Mg сплава ограничено 100–300 ppm (частей на миллион; мг/кг), превышение предела сопровождается усилением скорости коррозии [64]. Возможно, в связи с этим новейшей тенденцией медицинского материаловедения является развитие сплавов на основе цинка, например, Zn–1 мас. % Mg или Zn–3Cu–1Fe со скоростью коррозии (0,12–0,13 мм/год) на 1–2 порядка ниже таковой для Mg сплавов [14]. В то же время ПДК в водных растворах для Zn на 1–2 порядка ниже по сравнению с Mg [4].

В этом плане цинк- или медьсодержащие покрытия находятся в тренде современных ортопедических решений в области модифицированных покрытий, отмеченном [65]. Такие покрытия технологически вариabельны и позволяют использовать различные подложки Mg сплавов для индивидуального подхода к решению механических, биомедицинских и инфекционных проблем биоинженерии костной ткани.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Черный В.Н. Перспективы применения биодеградирующих сплавов на основе магния в остеосинтезе. *Запорожский медицинский журнал*. 2013; 6 (81): 76–79. [Chornyi V.M. The prospects of using biodegradable magnesium-based alloys in osteosynthesis. *Zaporozhskii meditsinskii zhurnal*. 2013; 6 (81): 76–79 (in Russ.)].
2. Городецкий В.В., Талибов О.Б. Препараты магния в медицинской практике. *Малая энциклопедия магния*. М.: Медпрактика, 2003: 44. [Gorodetskii V.V., Talibov O.B. Magnesium drugs in medical practice. Small encyclopedia of magnesium. Moscow: Medpraktika Publ., 2003: 44 (in Russ.)].
3. Borcă A.C., Neacșu I.A., Vasile O.R., Ciucă I., Vasile I.M., Fayeş M.A., Vasile B.Ş. Mg–Zn alloys, most suitable for biomedical applications. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2018; 59 (1): 49–54.
4. СанПиН 2.1.4.1074-01 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения (с изменениями на 2 апреля 2018 года). М.: Минздрав России, 2002. [SanPiN 2.1.4.1074-01 Drinking water. Hygienic requirements to the quality of water from the centralized system of drinking water supply. Quality control. Hygienic requirements to safety of hot water supply system (with adjustments as of April 2, 2018). Moscow: Minzdrav Ros-sii, 2002 (in Russ.)].
5. Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomater.* 2010; 6 (5): 1680–1692. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.028.
6. Luthringer B.J.C., Feyerabend F., Willumeit-Römer R. Magnesium-based implants: a mini-review. *Magnes Res.* 2014; 27 (4): 142–154. DOI: 10.1684/mrh.2015.0375.
7. Saris N.E.L., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J.A., Lewenstam A. Magnesium – an update on physiologic, clinical and analytical aspects. *Clinics Chimica Acta.* 2000; 294 (1–2): 1–26.
8. Witte F., Kaese V., Haferkamp H., Switzer E., Meyer-Lindenberg A., Wirth C.J., Windhagen H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials.* 2005; 26 (17): 3557–3563. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.049.
9. Xu D.K., Han E.H. Relationship between fatigue crack initiation and activated twins in as-extruded pure magnesium. *Scr. Mater.* 2013; 69 (9): 702–705. DOI: 10.1016/j.scriptamat.2013.08.006.
10. Liu C., Ren Z., Xu Y., Pang S., Zhao X., Zhao Y. Biodegradable magnesium alloys developed as bone repair materials: a review. *Scanning.* 2018; 2018 (Article ID 9216314): 15. DOI: 10.1155/2018/9216314.
11. Чемерис А.И., Цивирко Э.И., Черный В.Н., Шаломеев В.А., Яцун Е.В. Биорезорбтивные свойства сплавов магния. *Травма*. 2011; 12 (3): 144–146. [Chemeris A.I., Tsvirko E.I., Chornyi V.M., Shalomeev V.A., Yatsun E.V. Bioresorptive properties of magnesium alloys. *Travma*. 2011; 12 (3): 144–146 (in Russ.)].
12. Zheng Y.F., Gu X.N., Witte F. Biodegradable metals. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 2014; 77: 1–34. DOI: 10.1016/j.mser.2014.01.001.
13. ASTM F3160-16: standard guide for metallurgical characterization of absorbable metallic materials for medical implants. ASTM International, West Conshohocken, 2016.
14. Hermawan H. Updates on the research and development of absorbable metals for biomedical applications. *Prog. Biomater.* 2018; 7 (2): 93–110. DOI: 10.1007/s40204-018-0091-4.
15. Пироженов Л.А., Сивцов С.В. Разработка метода аналитического контроля коррозионной стойкости магниевых сплавов. *Вопросы атомной науки и техники. Серия: Вакуум, чистые материалы, сверхпроводники*.



- ку (17). 2008; 1: 31–34. [Pirozhenko L.A., Sivtsov S.V. Developing a method of analytical control of corrosive resistance in magnesium alloys. *Voprosy atomnoi nauki i tekhniki. Seriya: Vakuum, chistye materialy, sverkhprovodniki* (17). 2008; 1: 31–34 (in Russ.)].
16. Song G. Recent progress in corrosion and protection of magnesium alloys. *Adv. Eng. Mater.* 2005; 7 (7): 563–586. DOI: 10.1002/adem.200500013.
  17. Gray-Munro J.E., Seguin C., Strong M. Influence of surface modification on the in vitro corrosion rate of magnesium alloy AZ31. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2009; 91 (1): 221–230. DOI: 10.1002/jbm.a.32205.
  18. Witte F., Fischer J., Nellesen J., Crostack H., Kaese V., Pisch A., Beckmann F., Windhagen H. *In vitro* and *in vivo* corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials*. 2006; 27 (7): 1013–1018. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.037.
  19. Ghoneim A.A., Fekry A.M., Ameer M.A. Electrochemical behavior of magnesium alloys as biodegradable materials in Hank's solution. *Electrochim. Acta*. 2010; 55 (20): 6028–6035. DOI: 10.1016/j.electacta.2010.05.062.
  20. Tan L., Yu X., Wan P., Yang K. Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. *J. Mater. Sci. Technol.* 2013; 29 (6): 503–513. DOI: 10.1016/j.jmst.2013.03.002.
  21. Gu X., Zheng Y., Cheng Y., Zhong S., Xi T. *In vitro* corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys. *Biomaterials*. 2009; 30 (4): 484–498. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.021.
  22. Hong D., Saha P., Chou D.-T., Lee B., Collins B.E., Tan Z., Dong Z., Kumta P.N. *In vitro* degradation and cytotoxicity response of Mg–4% Zn–0.5% Zr (ZK40) alloy as a potential biodegradable material. *Acta Biomater.* 2013; 9 (10): 8534–8547. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.07.001.
  23. Walter R., Kannan M.B. *In vitro* degradation behaviour of WE54 magnesium alloy in simulated body fluid. *Mater. Lett.* 2011; 65 (4): 748–750. DOI: 10.1016/j.matlet.2010.11.051.
  24. Li Z.J., Gu X.N., Lou S.Q., Zheng Y.F. The development of binary Mg–Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials*. 2008; 29 (10): 1329–1344. DOI: 10.1016/j.biomaterials.
  25. Zhang S., Li J., Song Y., Zhao C., Zhang X., Xie C., Zhang Y., Tao H., He Y., Jiang Y., Bian Y. *In vitro* degradation, hemolysis and MC3T3-E1 cell adhesion of biodegradable Mg–Zn alloy. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2009; 29 (6): 1907–1912. DOI: 10.1016/j.msec.2009.03.001.
  26. Cai S., Lei T., Li N., Feng F. Effects of Zn on microstructure, mechanical properties and corrosion behavior of Mg–Zn alloys. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2012; 32 (8): 2570–2577. DOI: 10.1016/j.msec.2012.07.042.
  27. Zheng Y., Gu X. Research activities of biomedical magnesium alloys in China. *JOM*. 2011; 3 (4): 105–108. DOI: 10.1007/s11837-011-0049-7.
  28. Xu L., Zhang E., Yin D., Zeng S., Yang K. *In vitro* corrosion behaviour of Mg alloys in a phosphate buffered solution for bone implant application. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008; 19 (3): 1017–1025. DOI: 10.1007/s10856-007-3219-y.
  29. Agarwal S., Curtin J., Duffy B., Jaiswal S. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016; 68: 948–963. DOI: 10.1016/j.msec.2016.06.020.
  30. ASTM-B275. Standard practice for codification of certain nonferrous metals and alloys, cast and wrought. Annual book of ASTM standards. Philadelphia, Pennsylvania, USA: American Society for Testing and Materials, 2005: 7.
  31. Wang J., Tang J., Zhang P., Li Y., Wang J., Lai Y., Qin L. Surface modification of magnesium alloys developed for bioabsorbable orthopedic implants: a general review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2012; 100 (6): 1691–1701. DOI: 10.1002/jbm.b.32707.
  32. Kirkland N.T. Magnesium biomaterials: past, present and future. *Corros. Eng. Sci. Technol.* 2012; 47 (5): 322–328. DOI: 10.1179/1743278212Y.0000000034.
  33. Гнеденков С.В., Синебрюхов С.А., Пузь А.В., Машталар Д.В., Опра Д.П. Антикоррозионные композиционные покрытия на биодеградируемых Mg-сплавах. *In vitro* исследования. *Журнал неорганической химии*. 2016; 61 (4): 445–449. DOI: 10.7868/S0044457X16040097. [Gnedenkova S.V., Sinebryukhov S.A., Puz A.V., Mashtal'yar D.V., Opra D.P. Anticorrosive composite coatings on biodegradable Mg-alloys. *Zhurnal neorganicheskoi khimii*. 2016; 61 (4): 445–449 (in Russ.)].
  34. Zhao D., Huang S., Lu F., Wang B., Yang L., Qin L., Yang K., Li Y., Li W., Wang W., Tian S., Zhang X., Gao W., Wang Z., Zhang Y., Xie X., Wang J., Li J. Vascularized bone grafting fixed by biodegradable magnesium screw for treating osteonecrosis of the femoral head. *Biomaterials*. 2016; 81: 84–92. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.038.
  35. Rau J.V., Antoniac I., Filipescu M., Cotrut C., Fosca M., Nistor L.C., Birjega R., Dinescu M. Hydroxyapatite coatings on Mg–Ca alloy prepared by pulsed laser deposition: properties and corrosion resistance in simulated body fluid. *Ceram. Int.* 2018; 44 (14): 16678–16687. DOI: 10.1016/j.ceramint.2018.06.095.
  36. Rau J.V., Antoniac I., Fosca M., De Bonis A., Blajan A.I., Cotrut C., Graziani V., Curcio M., Cricenti A., Niculescu M., Ortenzi M., Teghil R. Glass-ceramic coated Mg–Ca alloys for biomedical implant applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016; 64: 362–369. DOI: 10.1016/j.msec.2016.03.100.
  37. Kannan M.B., Walter R., Yamamoto A. Biocompatibility and *in vitro* degradation behavior of magnesium–calcium alloy coated with calcium phosphate using an unconventional electrolyte. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2016; 2 (1): 56–64. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5b00343.
  38. Hiromoto S., Inoue M., Taguchi T., Yamane M., Ohtsu N. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility and corrosion behaviour of a bioabsorbable magnesium alloy coated with

- octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 2015; 11: 520–530. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.09.026.
39. Martinez Sanchez A.H., Luthringer B.J.C., Feyerabend F., Willumeit R. Mg and Mg alloys: How comparable are *in vitro* and *in vivo* corrosion rates? A review. *Acta Biomater.* 2015; 13: 16–31. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.11.048.
  40. Dziuba D., Meyer-Lindenberg A., Seitz J.M., Waizy H., Angrisani N., Reifenrath J. Long-term *in vivo* degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant. *Acta Biomater.* 2013; 9 (10): 8548–8560. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.08.028.
  41. Rahim M.I., Ullah S., Mueller P.P. Advances and challenges of biodegradable implant materials with a focus on magnesium-alloys and bacterial infections. *Metals.* 2018; 8 (7): 532. DOI: 10.3390/met8070532.
  42. Fontenier G., Freschard R., Mourot M. Study of the corrosion *in vitro* and *in vivo* of magnesium amodes involved in an implantable bioelectric battery. *Med. Biol. Eng.* 1975; 13 (5): 683–689.
  43. Kraus T., Fischerauer S.F., Hänzli A.C., Uggowitzer P.J., Löffler J.F., Weinberg A.M. Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: *in vivo* studies of their degradation and interaction with bone. *Acta Biomater.* 2012; 8 (3): 1230–1238. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.11.008.
  44. Salahshoor M., Guo Y. Biodegradable Orthopedic Magnesium-Calcium (MgCa) Alloys, Processing, and Corrosion Performance. *Materials.* 2012; 5 (1): 135–155. DOI: 10.3390/ma5010135.
  45. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate coatings on magnesium and its biodegradable alloys. *Acta Biomater.* 2014; 10 (7): 2919–2934. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.026.
  46. Kuśnierczyk K., Basista M. Recent advances in research on magnesium alloys and magnesium–calcium phosphate composites as biodegradable implant materials. *J. Biomater. Appl.* 2017; 31 (6): 878–900. DOI: 10.1177/0885328216657271.
  47. Staiger M.P., Pietak A.M., Huadmai J., Dias G. Magnesium and Its Alloys as Orthopedic Biomaterials: A Review. *Biomaterials.* 2006; 27 (9): 1728–1734. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.003.
  48. Erdmann N., Angrisani N., Reifenrath J., Lucas A., Thorey F., Bormann D., Meyer-Lindenberg A. Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: a comparative *in vivo* study in rabbits. *Acta Biomater.* 2011; 7 (3): 1421–1428. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.10.031.
  49. Castellani C., Lindtner R.A., Hausbrandt P., Tschegg E., Stanzl-Tschegg S.E., Zanoni G., Beck S., Weinberg A.M. Bone-implant interface strength and osseointegration: biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control. *Acta Biomater.* 2011; 7 (1): 432–440. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.08.020.
  50. Zhang B., Hou Y., Wang X., Wang Y., Gend L. Mechanical properties, degradation performance and cytotoxicity of Mg–Zn–Ca biomedical alloys with different compositions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2011; 31 (8): 1667–1673. DOI: 10.1016/j.msec.2011.07.015.
  51. Feser K., Kietzmann M., Baumer W., Krause C., Bach F.W. Effects of degradable Mg–Ca alloys on dendritic cell function. *J. Biomater. Appl.* 2011; 25 (7): 685–697. DOI: 10.1177/0885328209360424.
  52. Zhang E.L., Xu L.P., Yu G.N., Pan F., Yang K. *In vivo* evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2009; 90 (3): 882–893. DOI: 10.1002/jbm.a.32132.
  53. Chai H., Guo L., Wang X., Gao X., Liu K., Fu Y., Guan J., Tan L., Yang K. *In vitro* and *in vivo* evaluations on osteogenesis and biodegradability of a  $\beta$ -tricalcium phosphate coated magnesium alloy. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2012; 100 (2): 293–304. DOI: 10.1002/jbm.a.33267.
  54. Windhagen H., Radtke K., Weizbauer A., Diekmann J., Noll Y., Kreimeyer U., Schavan R., Stukenborg-Colsman C., Waizy H. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed. Eng. Online.* 2013; 12: 62. DOI: 10.1186/1475-925X-12-62.
  55. Plaass C., Von Falck C., Ettinger S., Sonnow L., Calderone F., Weizbauer A., Reifenrath J., Claassen L., Waizy H., Daniilidis K., Stukenborg-Colsman C., Windhagen H. Bioabsorbable magnesium versus standard titanium compression screws for fixation of distal metatarsal osteotomies—3 year results of a randomized clinical trial. *J. Ortho. Sci.* 2018; 23 (2): 321–327. DOI: 10.1016/j.jos.2017.11.005.
  56. Biber R., Pauser J., Brem M., Bail H.J. Bioabsorbable metal screws in traumatology: a promising innovation. *Trauma Case Rep.* 2017; 8: 11–15. DOI: 10.1016/j.tcr.2017.01.012.
  57. Lee J.W., Han H.S., Han K.J., Park J., Jeon H., Ok M.R., Seok H.K., Ahn J.P., Lee K.E., Lee D.H., Yang S.J., Cho S.Y., Cha P.R., Kwon H., Nam T.H., Han J.H., Rho H.J., Lee K.S., Kim Y.C., Mantovani D. Long-term clinical study and multiscale analysis of *in vivo* biodegradation mechanism of Mg alloy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016; 113 (3): 716–721. DOI: 10.1073/pnas.1518238113.
  58. Zhao D., Witte F., Lu F., Wang J., Li J., Qin L. Current status on clinical applications of magnesium-based orthopaedic implants: a review from clinical translational perspective. *Biomaterials.* 2017; 112: 287–302. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.017.
  59. Kuhlmann J., Bartsch I., Willbold E., Schuchardt S., Holz O., Hort N., Höche D., Heineman W.R., Witte F. Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding magnesium implants. *Acta Biomater.* 2013; 9 (10): 8714–8721. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.10.008.
  60. Robinson D.A., Griffith R.W., Shechtman D., Evans R.B., Conzemius M.G. *In vitro* antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta*

- Biomater.* 2010; 6 (5): 1869–1877. DOI: 10.1016/j.act-bio.2009.10.007.
61. Rahim M.I., Rohde M., Rais B., Seitz J.-M., Mueller P.P. Susceptibility of metallic magnesium implants to bacterial biofilm infections. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2016; 104 (6): 1489–1499. DOI: 10.1002/jbm.a.35680.
  62. Nepola J.V. External fixation. Rockwood and Green's fractures in Adults. Four Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996; 1: 229–304.
  63. Yamamoto A., Honma R., Sumita M. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. *Mater. Res.* 1998; 39 (2): 331–340. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E.
  64. Südholz A.D., Kirkland N.T., Buchheit R.G., Birbilis N. Electrochemical properties of intermetallic phases and common impurity elements in magnesium alloys. *Electrochem. Solid St.* 2011; 14 (2): C5–C7. DOI: 10.1149/1.3523229.
  65. Hansen E.N., Zmistowski B., Parvizi J. Periprosthetic joint infection: what is on the horizon?. *Int. J. Artif. Organs.* 2012; 35 (10): 935–950. DOI: 10.5301/ijao.5000145.

## Сведения об авторах

**Хлусов Игорь Альбертович**, д-р мед. наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; профессор, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ; науч. сотрудник, ООО «НПК «СИНТЕЛ», г. Томск. ORCID iD 0000-0003-3465-8452.

**Митриченко Дмитрий Владимирович**, директор ООО «НПК «СИНТЕЛ», г. Томск.

**Просолов Александр Борисович**, зам. директора по научной работе, ООО «НПК «СИНТЕЛ», г. Томск.

**Николаева Ольга Олеговна**, начальник производственного участка, ООО «НПК «СИНТЕЛ», г. Томск.

**Слепченко Галина Борисовна**, д-р хим. наук, профессор, отделение химической инженерии, Инженерная школа природных ресурсов, вед. науч. сотрудник, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-0296-604X.

**Шаркеев Юрий Петрович**, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией физики наноструктурных биоконпозитов, ИФПМ СО РАН; профессор, Исследовательская школа физики высокоэнергетических процессов, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-5037-245X.

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

## Authors information

**Khlusov Igor A.**, DM, Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk; Research School of Chemistry & Applied Biomedical Sciences, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Mitrichenko Dmitrii V.**, Director, SINTEL LLC, Tomsk, Russian Federation.

**Prosolov Akexandr B.**, Vice-Director on Scientific Work, SINTEL LLC, Tomsk, Russian Federation.

**Nikolaeva Olga O.**, Head of Production Department, SINTEL LLC, Tomsk, Russian Federation.

**Slepchenko Galina B.**, DrScCh, Professor, Department of Chemical Engineering, Engineering School of Natural Resources; Leading Researcher, Research School of Chemistry & Applied Biomedical Sciences, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

**Sharkeev Yurii P.**, DrScPM, Professor, Head of Laboratory of Nanostructured Biocomposites, Institute of Strength Physics and Materials Science; Research School of High-Energy Physics, National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

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

Received 30.01.2019

Accepted 10.06.2019

Поступила в редакцию 30.01.2019

Подписана в печать 10.06.2019

## Endotypes of allergic rhinitis and asthma accompanying food allergy

Klimov A.V., Isaev P.Yu., Klimov V.V., Sviridova V.S.

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

### ABSTRACT

61 people suffering from persistent allergic rhinitis and asthma accompanying food allergies were studied using case histories, the NHANES questionnaire, polyspecific serum levels, allergen-specific IgE, IL4, IFN $\gamma$  and IL10 assays, and allergy skin tests. Four different endotypes have been identified, including entopic, which can be the basis for new approaches to the diagnosis and treatment of allergic rhinitis and asthma.

**Key words:** allergic rhinitis, asthma, food allergy, endotypes, entopy, allergens, IgE, cytokines, allergy skin tests.

**Conflict of interest.** The authors declare that there were no conflicts of interest related to this publication.

**Source of financing.** The authors declare that there was no funding associated with this publication.

**For citation:** Klimov A.V., Isaev P.Yu., Klimov V.V., Sviridova V.S. Endotypes of allergic rhinitis and asthma accompanying food allergy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 287–289. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-287-289>.

Persistent allergic rhinitis and bronchial asthma are the two main clinical manifestations of chronic atopy of the respiratory tract. The upper and lower airways cannot be separated from each other and can be treated with different immunomodulatory approaches, such as allergen-specific immunotherapy, as well as drugs that affect both compartments of the respiratory tract. Type II inflammation due to the Th2-controlled response to allergens in rhinitis and asthma is common, although these atopic conditions are characterized by some heterogeneity [1].

There are three aspects of heterogeneity: phenotype, endotype and biomarkers.

Phenotype is a classification category, which is determined by genotype, hereditary epigenetic factors and environmental factors. An endotype is a classification that is defined by various cellular and molecular pathways that underlie functional or pathobiological mechanisms. Endotypes include such features as clinical and immunological characteris-

tics, histopathology, upper and lower physiology, and the response to therapy for allergic rhinitis and asthma. Biological markers are specific parameters attributed to both phenotypes and endotypes [2–4].

A cohort of atopic patients of both sexes was studied in order to identify different endotypes and differentiate different therapeutic approaches associated with antigen-specific therapy and topical glucocorticoids. All patients ( $n = 61$ ), aged 18 to 60 years, suffered from persistent allergic rhinitis that was accompanied by mild to moderate asthma, and 21 of them had food allergies to the most common allergens in adults, such as cow's milk, shrimp, peanuts, chicken eggs and wheat flour. Twenty healthy volunteers of the same age served as a control group.

A study of the case, family, social and occupational histories, questionnaire NHANES [5], physical and functional airway examination, serum polyspecific and allergen-specific IgE to *Dermatophagoides pteronissinus* (Der p 1), common major food allergens (nBos d 4, rPen a 1, nAra h 2, nGal d 2, and rTri a 19), IL4, IFN $\gamma$ , IL10, and allergic skin tests were carried out.

✉ Klimov Andrew V., e-mail: klimov.lor@mail.ru.

The “cluster” analysis enabled dividing the patients into four groups, or endotypes (see Table).

Table

Endotypes of atopic conditions		
Entity	Endotype	n
1	Classical atopic endotype with subclinical food sensitization	15
2	Classical atopic endotype with food allergy	21
3	Classical atopic endotype with no food allergy	10
4	Entopic endotype [6]	15

The correlation analysis for the whole cohort demonstrated the close correlation ( $r = 0.88$ ,  $p < 0.002$ ) between serum IgE to *Dermatophagoides pteronissinus* (Der p1) and concentration of IL4 that

confirmed atopic nature of all aspects of the investigated cases (see Fig.).

It was established that the classical atopic endotypes were in total characterized by high serum concentration of polyspecific IgE, general Th2 polarization, the frequency of positive allergy skin tests, and atopic family heredity. The classical atopic endotype with subclinical food sensitization was differentiated by the high level of oral tolerance due to many described mechanisms [7].

Interestingly, the food sensitization in patients of this endotype was the same as in patients of the other classical atopic endotype with clinical signs of food allergy.

The absence of sensitization to food proteins and, correspondingly, food allergy symptoms may be linked to the high, well-controlled, oral tolerance [8].

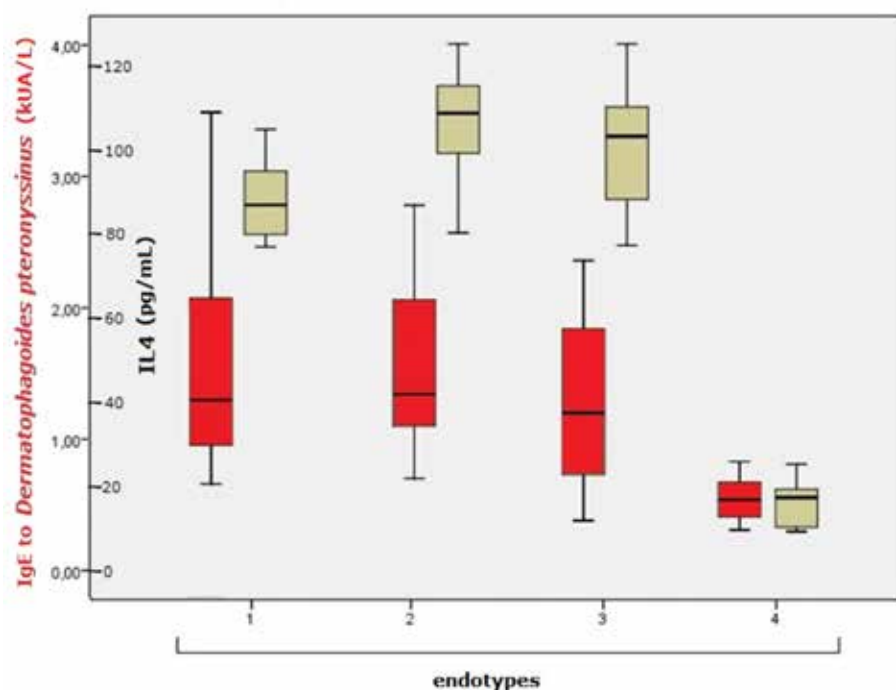


Figure. Correlation between serum IgE to dust mites and IL4

Entopy or entopic endotype is a new phenomenon discovered in allergology and immunology several years ago [6]. As our investigations showed, almost all parameters were the same as in healthy persons, and there are no systemic allergy signs. Nowadays, clinicians such as ENT specialists and lung physicians are involved in a discussion related to the diagnosis, treatment, and the relationship between local allergy and conventional or systemic allergy. Currently, the term “local rhinitis” is widely used, whereas there are only two references to “local asthma” [9, 10]. However, a positive response

to omalizumab in “non-allergic” severe asthma was described [11, 12] that demonstrated the presence of atopic IgE-dependent inflammation in such patients.

Atopic conditions are characterized by heterogeneity and may accompany the covert or clinical food sensitization, which enables downregulating the course of any atopic disease. The identification of atopic endotypes will promote and drive innovative developments in both allergen-specific immunotherapy and anti-inflammatory approaches, including severe asthma.

## REFERENCES

1. Bonilla F.A., Oettgen H.C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125 (2): 33–40. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.017.
2. Baker M.G., Sampson H.A. Phenotypes and endotypes of food allergy: path a to better understanding the pathogenesis and prognosis of food allergy. *Ann. Allergy, Asthma and Immunology.* 2018; 120 (3): 245–253. DOI: 10.1016/j.anai.2018.01.027.
3. De Greve G., Hellings P.W., Fokkens W.J. et al. Endotype-driven treatment in chronic upper airway diseases. *Clinical and Translational Allergy.* 2017; 7 (22): 1–14. DOI: 10.1186/s13601-017-0157-8.
4. Froidure A., Mouthuy J., Durham S.R. Asthma phenotypes and IgE responses. *Eur. Respir. J.* 2015; 12: 1–16. DOI: 10.1183/13993003.01824-2014.
5. Liu A.H., Jaramillo R., Sicherer S.H. et al. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National health and nutrition examination survey 2005–2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126: 798–806. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.07.026.
6. Powe D.G., Bonnin A.J., Jones N.S. 'Entropy': local allergy paradigm. *Clin. Exp. Allergy.* 2010; 40 (7): 987–997. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2010.03536.x.
7. Berin M.C., Shreffler W.G. Mechanisms underlying induction of tolerance to foods. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2016; 36: 87–102. DOI: 10.1016/j.iac.2015.08.002.
8. Bryce P.J. Balancing tolerance or allergy to food proteins. *Trends Immunol.* 2016; 37 (10): 659–667. DOI: 10.1016/j.it.2016.08.008.
9. Kılıç E., Ali Kutlu A., Hastalıkları G. et al. Does local allergy (entropy) exists in asthma? *J. of Clinical and Analytical Medicine.* 2016. Letters to Editors from 01.02.2016. DOI: 10.4328/JCAM.3272.
10. Klimov V.V. From basic to clinical immunology. Springer Nature Switzerland AG 2019: 377. DOI: 10.1007/978-3-030-03323-1.
11. De Llano L.P., Vennema M.C., Alvarez F.J. et al. Effects of omalizumab in non-atopic asthma: results from a Spanish multicenter registry. *J. Asthma.* 2013; 50 (3): 296–301. DOI: 10.3109/02770903.2012.757780.
12. Garcia G., Magnan A., Chiron R. et al. A proof-of-concept, randomized, controlled trial of omalizumab in patients with severe, difficult-to-control, nonatopic asthma. *Chest.* 2013; 144 (2): 411–419. DOI: 10.1378/chest.12-1961.

## Authors information

**Klimov Andrew V.**, PhD, MD, Assistant Professor, ENT Unit, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Isaev Pavel Yu.**, MD, Assistant Professor, Immunology and Allergy Unit, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Klimov Vladimir V.**, PhD, ScD, MD, Professor, Immunology and Allergy Unit, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Sviridova Valentina S.**, PhD, MD, Associate Professor, Immunology and Allergy Unit, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Klimov Andrew V.**, e-mail: klimov.lor@mail.ru.

Received 19.02.2019

Accepted 10.04.2019

УДК 616.329-009.12:616.8-008.61/.64]-055.2-053.7-07-08

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-290-298>

## Коморбидность ахалазии пищевода, смешанной тревожной и депрессивной реакции у пациентки молодого возраста: проблемы диагностики и лечения

Гарганеева Н.П.<sup>1,2</sup>, Белокрылова М.Ф.<sup>1,2</sup>, Костин А.К.<sup>2</sup>, Кошель А.П.<sup>1</sup>, Епанчинцева Е.М.<sup>2</sup>, Лебедева В.Ф.<sup>2</sup>, Аксенов М.М.<sup>2</sup>, Перчаткина О.Э.<sup>2</sup>, Карташова И.Г.<sup>2</sup>, Рудницкий В.А.<sup>1,2</sup>, Горбацевич Ю.Н.<sup>2</sup>, Цыбульская Е.В.<sup>2</sup>, Алексеев В.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт (НИИ) психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук  
Россия, 634014, г. Томск, ул. Алеутская, 4

### РЕЗЮМЕ

Ахалазия кардии (кардиоспазм, френоспазм, долихозофагус, мегаэзофагус, кардиостеноз) представляет собой первичное нарушение двигательной функции пищевода, связанное с ухудшением расслабления нижнего пищеводного сфинктера и дефектами перистальтики его грудного отдела. Диагностируется в возрасте 25–60 лет, составляя до 20% случаев всех заболеваний пищевода, характеризуется триадой симптомов: дисфагией, регургитацией, загрудинными болями при глотании. В большинстве случаев первым проявлениям ахалазии предшествуют стрессовые ситуации в анамнезе, что затрудняет дифференциальную диагностику с психогенным эзофагоспазмом.

Представленный клинический случай иллюстрирует трудности диагностики ахалазии кардиального отдела пищевода у женщины молодого возраста с выраженной тревожной и депрессивной симптоматикой, развившейся в условиях хронической стрессовой ситуации семейного и производственного плана. Обсуждаются вопросы междисциплинарного взаимодействия специалистов (терапевта, гастроэнтеролога, психиатра, психотерапевта, хирурга) по тактике обследования и ведения больной с коморбидной соматической и психической патологией. Эффективность интегративного подхода к лечению и реабилитации с использованием современных реконструктивных хирургических вмешательств, а также консервативных методов терапии, психофармакотерапии, личностно ориентированной психотерапии свидетельствует об актуальности изучения психосоматических аспектов ахалазии кардии.

**Ключевые слова:** ахалазия кардии, стресс, тревога, депрессия, коморбидность, хирургическая коррекция, психофармакотерапия, психотерапия.

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

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

**Для цитирования:** Гарганеева Н.П., Белокрылова М.Ф., Костин А.К., Кошель А.П., Епанчинцева Е.М., Лебедева В.Ф., Аксенов М.М., Перчаткина О.Э., Карташова И.Г., Рудницкий В.А., Горбацевич Ю.Н., Цыбульская Е.В., Алексеев В.А. Коморбидность ахалазии пищевода, смешанной тревожной и де-



прессивной реакции у пациентки молодого возраста: проблемы диагностики и лечения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 290–298. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-290-298>.

УДК 616.329-009.12:616.8-008.61/.64]-055.2-053.7-07-08  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-290-298>

## Comorbidity of esophageal achalasia, mixed anxiety and depressive reaction in a young female patient: problems of diagnosis and treatment

Garganeeva N.P.<sup>1,2</sup>, Belokrylova M.F.<sup>1,2</sup>, Kostin A.K.<sup>2</sup>, Koshel A.P.<sup>1</sup>, Epanchintseva E.M.<sup>2</sup>, Lebedeva V.F.<sup>2</sup>, Aksenov M.M.<sup>2</sup>, Perchatkina O.E.<sup>2</sup>, Kartashova I.G.<sup>2</sup>, Rudnitsky V.A.<sup>1,2</sup>, Gorbatshevich Yu.N.<sup>2</sup>, Tsybul'skaya E.V.<sup>2</sup>, Alekseev V.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian State Medical University (SSMU)  
 2, Moskow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup>Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC)  
 4, Aleut'skaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

### ABSTRACT

Achalasia cardia ("cardiospasm", "phrenospasm", "dolichoesophagus", "megaesophagus", "stenosis of cardia") represents a primary impairment of esophageal motor function associated with impaired lower esophageal sphincter relaxation and peristalsis defects of the thoracic esophagus. It is diagnosed at the age of 25 to 60 years, making up to 20% of all diseases of the esophagus, and is characterized by a triad of symptoms: dysphagia, regurgitation and chest pain when swallowing. In most cases the first manifestations of achalasia are preceded by stress situations in the anamnesis that complicates the differential diagnosis of psychogenic esophageal spasm.

The presented clinical case illustrates difficulties of early diagnosis of achalasia cardia in a young female patient with severe anxiety and depressive symptoms which develop under conditions of chronic stressful situations in the family or at work. The issues of interdisciplinary interaction of health professionals (physician, gastroenterologist, psychiatrist, psychotherapist, and surgeon) on the course of examination and management of patients with comorbid physical and mental pathology are discussed. The efficiency of the integrative approach to treatment and rehabilitation with the use of modern reconstructive surgical interventions as well as conservative methods of therapy, psychopharmacotherapy and personality-oriented psychotherapy proves the relevance of studying psychosomatic aspects of achalasia cardia.

**Key words:** achalasia cardia, stress, anxiety, depression, comorbidity, surgical correction, psychopharmacotherapy, psychotherapy.

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

**Source of financing.** The authors state that there is no funding for the study.

**For citation:** Garganeeva N.P., Belokrylova M.F., Kostin A.K., Koshel A.P., Epanchintseva E.M., Lebedeva V.F., Aksenov M.M., Perchatkina O.E., Kartashova I.G., Rudnitsky V.A., Gorbatshevich Yu.N., Tsybul'skaya E.V., Alekseev V.A. Comorbidity of esophageal achalasia, mixed anxiety and depressive reaction in a young female patient: problems of diagnosis and treatment. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 290–298. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-290-298>.

Изучение медицины последнего времени приводит нас все больше и больше к тому, что психической симптоматике в картине чисто соматических заболеваний должна быть отведена значительно большая роль, чем это делалось до сих пор.

Д.Д. Плетнев (1927)

## ВВЕДЕНИЕ

Ахалазия кардии (греч. а – отсутствие, *chala-sis* – расслабление, *kardia* – входное отверстие желудка) представляет собой идиопатическое нервно-мышечное заболевание, сопровождающееся функциональным нарушением проходимости кардии вследствие дискоординации между глотком, рефлекторным раскрытием нижнего пищеводного сфинктера (НПС), двигательной и тонической активностью гладкой мускулатуры пищевода [1]. Существуют три основные этиологические гипотезы формирования ахалазии кардии: генетическая, инфекционная и аутоиммунная [2–4]. Заболевание развивается постепенно, иногда – внезапно, наиболее характерным является триада симптомов: дисфагия, регургитация, загрудинные боли при глотании [5, 6], при прогрессировании возможны различные респираторные проявления [7]. По данным разных авторов, до появления симптомов ахалазии кардии в 12–94% случаев выявляются психосоциальные стрессоры [8]. Непроходимость кардии в начальной стадии болезни носит спастический функциональный характер, что затрудняет дифференциальную диагностику с психогенным эзофагоспазмом, в обоих случаях дисфагия провоцируется или усиливается при эмоциональном напряжении [9]. Наличие дисфагии и регургитации любого генеза приводит к психической дезадаптации пациентов, усиливающаяся замкнутость и раздражительность которых отражаются на их взаимодействии в семье и обществе, что связано с формированием широкого спектра невротических расстройств. Трудности ранней диагностики ахалазии кардии нередко обусловлены недооценкой психологического и психического состояния больных. Более 70% пациентов реагируют на психосоциальные стрессоры как ухудшением течения гастроинтестинального заболевания, так и формированием психопатологических симптомов, затрудняющих своевременность диагностики и лечения коморбидной патологии [10–12].

Медикаментозная терапия ахалазии зачастую является симптоматической, одно из современных направлений – хирургическое лечение [1, 8, 13]. Своевременность диагностики ахалазии кардии и восстановления функции пищевода позволяет предотвратить отдаленные осложнения заболевания, обусловленные как прогрессированием основного процесса, так и развитием психических расстройств.

Оценка личностных особенностей пациентов, психопатологических проявлений, ассоциирован-

ных с соматическим заболеванием, способствует решению сложной проблемы диагностики и лечения психических расстройств в клинике внутренних болезней, что важно для профессиональной подготовки специалистов общей медицинской сети и «необходимости совместного и одновременного изучения соматической и психической симптоматики» [14].

Представленный ниже клинический случай демонстрирует особенности течения ахалазии пищевода у пациентки с выраженной тревожной и депрессивной симптоматикой, развившейся в условиях хронической стрессовой ситуации и ставшей причиной обращения к психиатру и госпитализации в первое клиническое психиатрическое отделение клиники НИИ психического здоровья Томского НИМЦ.

## КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациентка К., 32 года, образование средне-специальное. *Анамнез жизни.* По линии матери и отца семейный анамнез отягощен гипертонической болезнью, сахарным диабетом 2-го типа. Пациентка – единственный, поздний ребенок в семье. Росла и развивалась соответственно возрасту. Особенности семейного воспитания в детстве были связаны с «доминирующей гиперпротекцией» (по А.Е. Личко, 1979) матери и непредсказуемыми, взрывчатыми и агрессивными поступками (в периоды алкоголизации) авторитарного отца. Эмоциональной привязанности к родителям не испытывала, тяготилась чрезмерным контролем матери. Росла робкой, стеснительной, тревожной, мнительной, нерешительной. Менструальный цикл с 12 лет, нерегулярный, сопровождается колебаниями настроения; часто болела острыми респираторными заболеваниями. В школьные годы была обязательной, прилежной ученицей, однако не смогла поступить сразу после окончания школы в вуз, обучалась на вечернем отделении колледжа. Вышла замуж в возрасте 18 лет, стремилась обрести самостоятельность («ушла от матери замуж»). Позже узнала, что муж употреблял инъекционные наркотики, своим поведением в семье напоминал ее отца. В браке родила дочь, не работала. Отношения в семье были конфликтными, через четыре года муж ушел из семьи. Воспитывала дочь одна. В возрасте 25 лет устроилась работать контролером. Поступила на вечернее отделение университета с большим желанием получить высшее образование. В течение 7 лет (с 25 лет) состоит в гражданском браке с мужчиной, который на 5 лет моложе пациентки, совместных детей нет. Отношения

в семье напряженные, частые конфликты, инициируемые сожителем. Во время ссор испытывает обиду, раздражение, которые внешне старается не проявлять, сдерживая эмоции. Вынуждена каждый раз делать выбор – поддерживать дочь, которую открыто игнорирует гражданский муж, или пытаться налаживать их взаимодействие в доме. Несмотря на неудовлетворенность сложившимися партнерскими отношениями, пассивно подчиняется его требованиям, старается сохранять мир в семье.

**Анамнез заболевания.** Около 5 лет назад (с 27 лет) впервые пациентку стали беспокоить ощущения дискомфорта при проглатывании пищи, связывала их с психоэмоциональным напряжением, стрессовой ситуацией в семье. Затруднения при прохождении пищи по пищеводу, ощущение остановки или «застревания» появлялись или усиливались во время и после конфликтов в семье. Через полтора года отметила резкое ухудшение состояния. Неожиданно пациентка проснулась ночью от обильного слюнотечения. С этого времени затруднения при приеме пищи стали мучительными, замечала, что не может ее проглотить. Связывала это с торопливостью и недостаточным пережевыванием пищи. За медицинской помощью не обращалась. Приспосабливаясь к своему состоянию, для улучшения проглатывания запивала пищу водой, измельчала, ела небольшими порциями. Однако затруднения при глотании сохранялись, учащались, усиливаясь при волнении, психоэмоциональном напряжении, и еще через полгода стали постоянными. Появилось ощущение, что пища «проваливается» и «встает» или «останавливается либо в горле, либо в области пищевода или эпигастрия», при этом появляются за грудиной боли. Для облегчения состояния вызывала рвоту. Начала подозревать у себя наличие опухолевого заболевания. Лишь спустя еще полгода (через пять лет с момента начала заболевания) с этими симптомами пациентка впервые обратилась к терапевту и была направлена в специализированное отделение НИИ гастроэнтерологии СибГМУ.

Комплексное обследование включало проведение фиброэзофагогастродуоденоскопии; эзофагеальной манометрии пищевода с оценкой давления в области нижнего пищеводного сфинктера; рентгенографии с контрастированием пищевода; эндоскопической ультрасонографии. По результатам исследования впервые была диагностирована ахалазия кардии II стадии. При рентгенографии с контрастированием пищевода было выявлено конусовидное сужение брюшного

отдела пищевода на протяжении 35 мм с супрастенотическим расширением до 35 мм, контраст сохранялся в течение всего времени наблюдения. По данным эндоскопической ультрасонографии, стенка пищевода на всем протяжении сохраняла равномерную слоистую структуру. Мышечный жом кардии был утолщен преимущественно за счет циркулярного мышечного слоя от 4 до 6 мм (мелкоточечные включения фиброза), продольный мышечный слой – 1,3 мм, гипоехогенный. Пациентке была выполнена эндоскопическая баллонная пневмокардиодилатация с использованием баллонного дилататора Wilson-Cook (Cooc Medical, Дания, Ирландия, США) 30 мм, длиной 10 см. Экспозиция баллона – 10–15 мин, давление в баллоне – до 1 атм. Всего проведено 4 сеанса с интервалом в 2–3 дня с положительной динамикой, регургитация и боли прекратились.

Однако через три месяца пациентка вновь отметила усиление дисфагии, была обеспокоена тем, что, несмотря на исключение диагноза «опухоль» и проведенное вмешательство, не могла свободно проглатывать пищу, вызывала рвоту при каждом ее приеме. За этот период к гастроэнтерологу не обращалась, объясняя свое состояние (усиление дисфагии) тревогой и реакцией на стресс после каждой ссоры в семье. На этом фоне еще более нарастала тревога, раздражительность, плаксивость, бессонница, снизилось настроение, пропал аппетит, за 6 мес похудела на 20 кг. Через полгода после эндоскопической баллонной пневмокардиодилатации вышеуказанные жалобы явились причиной ее обращения к психиатру и госпитализации в клинику НИИ психического здоровья.

При поступлении предъявляла жалобы на тревогу, сниженное настроение, плаксивость, бессонницу, нарушение глотания, ощущение «поперхивания» (дисфагии), задержки и «застревания» пищи на уровне горла или пищевода во время приема пищи, с облегчением после вызванной рвоты. Следом за ощущением задержки пищевого комка возникало ощущение «проваливания пищи», с появлением боли за грудиной или в эпигастриальной области. Дисфагия возникала при употреблении твердой, жидкой и полужидкой пищи. Иногда пациентка свободно проглатывала, например, мясо, сухари, запивая пищу теплой водой. Впервые появились ощущение кома в горле и нехватки воздуха, усилился страх наличия тяжелого онкологического заболевания. Это сопровождалось нарастанием тревоги, снижением настроения, нежеланием общаться, объяснять свое состояние, чем-либо заниматься, постоянным внутренним напряжением, обидчивостью («нака-

пливаю обиды и не умею прощать»), снижением аппетита, резкой слабостью, похудением.

**Психический статус.** Пациентка выглядит моложе паспортного возраста. Декоративной косметикой не пользуется. В разговор вступает охотно, голос тихий, модуляции сохранены. Во время беседы сутулится, избегает визуального контакта. Инициативы не проявляет, предпочитает отвечать на поставленные вопросы. Описывая свои «мучения» при каждом приеме пищи, плачет, с трудом останавливается. Признается, что «устала болеть», подозревает наличие неизвестного заболевания. Фиксирована на своем состоянии, которое описывает как постоянное напряжение, тревогу. Отмечает обидчивость, раздражительность, плаксивость, сниженное настроение, бессонницу. В семье частые конфликты, инициатором которых считает партнера. Обеспокоена тем, что он игнорирует ее дочь от первого брака. Говорит, что «очень устала» от работы и учебы, мало времени уделяет ребенку, семье. Мышление последовательное. Суицидальные мысли отрицает. Продуктивной симптоматики не выявлено. Интеллект соответствует полученному образованию и образу жизни. В актуальном состоянии пациентки при психологическом обследовании выявлены психастенические черты, повышенный уровень тревожности, ипохондричности, ригидности, склонность к принятию вины на себя, формированию зависимых отношений. Психический статус определялся тревожно-депрессивным синдромом с фиксацией на физических проявлениях соматического заболевания.

**Клинический диагноз.** F43.22. Расстройство адаптации: смешанная тревожная и депрессивная реакция. K 22.0. Ахалазия кардиальной части.

При обследовании не выявлено патологических изменений лабораторных показателей. Объективный осмотр: пациентка астенического телосложения, дефицит массы тела (индекс массы тела – 18,3 кг/м<sup>2</sup>). Кожа и слизистые без видимых изменений. Легкие: дыхание везикулярное, хрипы не выслушиваются. Сердце: ритм правильный, частота сердечных сокращений – 64 уд./мин. При аускультации сердца на верхушке выслушивается короткий систолический шум. Артериальное давление – 115/70 мм рт. ст. Живот мягкий, при пальпации болезненность в пилородуоденальной области. Ультразвуковое исследование органов брюшной полости, почек, щитовидной железы – без патологии. Эхокардиография – признаки дисплазии соединительной ткани сердца в виде малых аномалий. В полости левого желудочка определяется пролапс митрального клапана I сте-

пени без регургитации, аномально расположенная хорда. Проведенное комплексное лечение включало индивидуальную психотерапию с сеансами релаксации и обучением аутогенной тренировке, спазмолитические и улучшающие метаболические процессы препараты. С учетом современных данных о возможности и эффективности применения антидепрессантов при расстройствах адаптации [15, 16] пациентке был назначен пароксетин (20 мг/сут), обладающий антидепрессивным и противотревожным действием. В рамках комплексной терапии также был назначен сульпирид (200 мг/сут), показавший высокую эффективность при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, позволяющий уменьшить тревогу и ипохондрическую фиксацию [17]. Эффективность терапии проявлялась улучшением психического и соматического состояния пациентки: исчезло напряжение, выровнялось настроение, нормализовался сон, симптомы дисфагии значительно уменьшились, но окончательно не купировались, регургитация прекратилась, восстановился аппетит, масса тела увеличилась на 2 кг. Появилась позитивная установка на будущее.

Несмотря на положительную динамику психического состояния, при выписке из клиники было рекомендовано пройти повторное обследование у гастроэнтеролога, однако больная не сочла это необходимым. В течение месяца после выписки продолжала прием поддерживающей психотропной терапии, но, почувствовав улучшение общего состояния и работоспособности, самостоятельно прекратила. Амбулаторно посещала сеансы личностно ориентированной психотерапии. Следует отметить, что на тот период времени выраженной регургитации и снижения массы тела не наблюдалось. Успешно закончила вуз, получила диплом о высшем образовании, планировала трудоустройство по специальности. Однако на фоне сохраняющихся систематических семейных психогений и перегрузок, связанных с учебой в университете и работой, вновь стала испытывать тревогу, беспокойство, ощущение внутреннего напряжения, участились приступы нарушения глотания.

В связи с возобновлением симптоматики при очередном обращении к психиатру пациентка была направлена на консультацию к гастроэнтерологу, так как не исключалось прогрессирование основного процесса. Во время повторной госпитализации в НИИ гастроэнтерологии проведены фиброэзофагогастродуоденоскопия, рентгенография, абдоминальная ультрасонография. По данным эзофагеальной манометрии, обнаружено повышенное внутрижелудочное давление –

18,9 мм рт. ст., имел место гипертонус нижнего пищеводного сфинктера (НПС). Полного расслабления сфинктера при глотании не наступало, что свидетельствовало о наличии диффузного органического эзофагоспазма. С учетом клинко-инструментального обследования был установлен диагноз: «Ахалазия кардии III стадии. Состояние после эндоскопической баллонной пневмокардиодилатации. Диффузный катаральный эзофагит». В плановом порядке пациентке была выполнена реконструктивно-пластическая операция в объеме: демускуляризация абдоминального отдела пищевода с селективной проксимальной ваготомией и формированием инвагинационного клапана по методике Г.К. Жерлова [13]. В результате оперативного вмешательства была восстановлена свободная проходимость пищевода, регургитация прекратилась. На рис. 1–4 отражена динамика результатов исследования до и после операции: на рис. 1, 2 – данные рентгенологического исследования, на рис. 3, 4 – данные эндоскопической ультрасонографии.



Рис. 1. Ахалазия кардии III стадии. Рентгенограмма до операции: расширение и деформация пищевода  
Fig. 1. Stage III achalasia cardia. Roentgenogram before surgery: expansion and deformation of the esophagus



Рис. 2. Ахалазия кардии III стадии. Рентгенограмма через 3 мес после операции. Просвет пищевода не расширен. Стрелкой указаны зона пищеводно-кардиального перехода и зона сформированного инвагинационного клапана

Fig 2. Stage III achalasia cardia. Roentgenogram 3 months after surgery. The lumen of esophagus is not expanded. The zone of the esophageal-cardiac junction and the zone of the shaped invaginated valve are arrowed

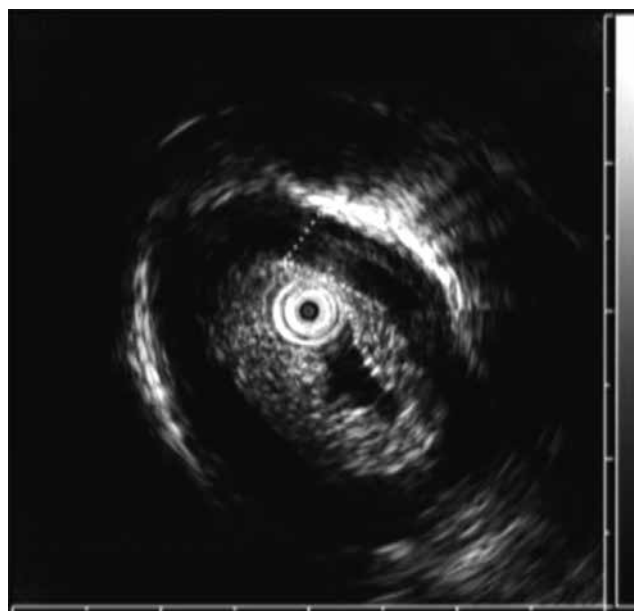


Рис. 3. Ахалазия кардии III стадии. Результаты эндоскопической ультрасонографии до операции. Стрелкой указан утолщенный циркулярный мышечный слой пищевода

Fig 3. Stage III achalasia cardia. Results of endoscopic ultrasonography before surgery. The thickened circular muscle layer of the esophagus is arrowed

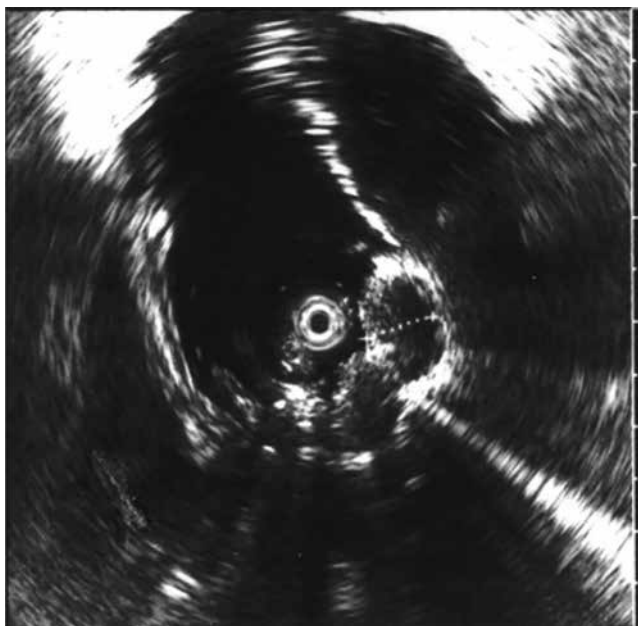


Рис. 4. Ахалазия кардии после операции. Данные эндоскопической ультрасонографии: утолщение стенки пищевода за счет дубликатуры слизисто-подслизистого слоя в зоне сформированного инвагинационного клапана

Fig. 4. Achalasia cardia after surgery. Data of endoscopic ultrasonography: thickening of the wall of the esophagus due to duplication of the mucous-submucous layer in the zone of the shaped invaginated valve

Через 4 мес после операции в связи с восстановлением проходимости пищевода и устранением препятствия к прохождению пищи в виде нерасслабляющегося нижнего пищеводного сфинктера, регургитации не наблюдалось, увеличилась масса тела, уменьшились тревога, ощущение беспокойства, внутренней напряженности. Через 6 мес, по данным эзофагеальной манометрии, давление в области сформированного клапана кардии соответствовало норме. Расслабление НПС при глотании было полным, период расслабления кардии не превышал 5 с. Средняя величина давления НПС по результатам манометрии составила 14,3 мм рт. ст.

Спустя год после оперативного вмешательства соматическое состояние пациентки стабильное, прежних проблем во время приема пищи не наблюдается, однако отмечает периодически возникающие беспокойство и опасения, что дисфагия может возобновиться. Многолетние психологические проблемы и пребывание в условиях длительной стрессовой ситуации в семье и на работе представляют неблагоприятный фон, способствующий сохранению повышенной тревоги и постоянного напряжения. С целью превенции негатив-

ных последствий хронического стресса больной рекомендовано продолжение курса психотерапии для выработки конструктивных стратегий поведения в ситуациях межличностного взаимодействия, формирования адекватной самооценки для преодоления сложившихся ранее стереотипов эмоционального реагирования, снятия фиксации на приобретенном за годы болезни опыте переживаний и телесных ощущений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный клинический случай демонстрирует трудности диагностики ахалазии кардии, обусловленные поздним обращением пациентки за медицинской помощью. По мере прогрессирования и нарастания гастроэнтерологической симптоматики в течение длительного времени в зависимости от стадии ахалазии – от начальных проявлений дисфагии до стойкой регургитации, появления загрудинных болей и потери массы тела, снижения качества жизни и трудоспособности пациентки, происходивших на фоне хронической стрессовой ситуации семейного и производственного плана, личностных и конституциональных особенностей – наблюдалась психическая дезадаптация с формированием тревожной и депрессивной симптоматики. На определенном этапе болезни коморбидность ахалазии кардии и психического расстройства обуславливает проблемы дифференциальной диагностики и приоритеты в лечении. Представленный клинический пример является иллюстрацией взаимодействия специалистов разного профиля (терапевта, гастроэнтеролога, психиатра, психотерапевта, хирурга) в вопросах диагностики и лечения пациентки с сочетанной тяжелой соматической и психической патологией, позволившего не только восстановить функции пищевода, но и в существенной степени улучшить ее социальное функционирование и качество жизни. Психотерапевтическое сопровождение и психотропная терапия явились дополнением к комплексной терапии и адаптации пациентки к проведению хирургического вмешательства. Ахалазия кардии представляет собой многогранную медицинскую проблему, требующую мультидисциплинарного подхода к диагностике, лечению и длительной комплексной реабилитации больных.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ивашкин В.Т., Трухманов А.С., Годжелло Э.А., Мавев И.В., Евсютина Ю.В., Лапина Т.Л., Сторонова О.А. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению ахалазии кар-

- дии и кардиоспазма. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2016; 26 (4): 36–54. [Ivashkin V.T., Trukhmanov A.S., Godzhello E.A., Mayev I.V., Evsyutina Yu.V., Lapina T.L., Storionova O.A. Diagnostics and treatment of cardiac achalasia and cardiospasm: guidelines of the Russian Gastroenterological Association. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2016; 26 (4): 36–54. (in Russ.)].
2. Евсютина Ю.В., Стороннова О.А., Трухманов А.С., Ивашкин В.Т. Ахалазия кардии: современные представления об этиологии, патогенезе, клинической картине и диагностике. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 24 (5): 4–12. [Evsyutina Yu.V., Storionova O.A., Trukhmanov A.S., Ivashkin V.T. Achalasia cardia: modern concepts of the etiology, pathogenesis, clinical presentation and diagnosis. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2014; 24 (5): 4–12 (in Russ.)].
  3. Pohl D, Tutuian R. Achalasia: an overview of diagnosis and treatment. *J. Gastrointest Liver Dis*. 2007; 16 (3): 297–303.
  4. Park W., Va H.F. Etiology and pathogenesis of achalasia: the current understanding. *Am. J. Gastroenterol*. 2005; 100 (6): 1404–1414.
  5. Eckardt V.F., Stauf B., Bernhard G. Chest pain in achalasia: patient characteristics and clinical course. *Gastroenterology*. 1999; 116 (6): 1300–1304.
  6. Joel E. Richter. Achalasia – an update. *J. Neurogastroenterol. Motil*. 2010; 16 (3): 232–242. DOI: 10.5056/jnm.2010.16.3.232.
  7. Kathis J.M., Foltys D.B., Scheuermann U., Stempel M., Niebisch S., Ebert M., Jansen-Winkel B., Gockel I., Lang H. Achalasia with megaesophagus and tracheal compression in a young patient: A case report. *Int. J. Surg. Case Rep*. 2015; 14: 16–18. DOI: 10.1016/j.ijscr.2015.06.020. Epub 2015 June 26.
  8. Черноусов А.Ф., Хоробрых Т.В., Ветшев Ф.П., Мелентьев А.А., Осминин С.В. Ахалазия кардии и кардиоспазм – современные принципы лечения. *Анналы хирургии*. 2012; 3: 5–10. [Chernousov A.F., Khorobrykh T.V., Vetshev F.P., Melentiev A.A., Osminin S.V. Esophageal achalasia and cardiospasm – contemporary principles of treatment. *Annals of Surgery*. 2012; 3: 5–10. (in Russ.)].
  9. Психосоматические расстройства в практике терапевта: руководство для врачей; под ред. В.И. Симаненкова. СПб: СпецЛит, 2008: 335. [Psychosomatic disorders in practice of an internist: Handbook for physicians; V.I. Simanenkova (ed.) SPb.: SpetsLit Publ., 2008: 335 (in Russ.)].
  10. Корнетов Н.А. Коморбидность соматических заболеваний и депрессивных расстройств – типичная проблема в современной медицине. *Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова*. 2011; 18 (4): 38–40. [Kornetov N.A. Comorbidity of physical diseases and depressive disorders – typical problem in modern medicine. *Proceedings of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University*. 2011; 18 (4): 38–40 (in Russ.)].
  11. Александровский Ю.А. Психические расстройства в общей медицинской практике и их лечение. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004: 240. [Aleksandrovsky Yu.A. Mental disorders in general medical practice and their treatment. М.: GEOTAR-Media Publ., 2004: 240 (in Russ.)].
  12. Циммерман Я.С. Гастроэнтерология: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012: 800. [Tsimmerman Ya.S. Gastroenterology: Handbook. М.: GEOTAR-Media Publ., 2012: 800 (in Russ.)].
  13. Жерлов Г.К., Кошель А.П., Зыков Д.В., Карпович А.В., Жерлова Т.Г., Рудая Н.С. Современная технология хирургического лечения ахалазии кардии II–III стадии. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2007; 9: 26–31. [Zherlov G.K., Koshel' A.P., Zykov D.V., Karpovich A.V., Zherlova T.G., Rudaya N.S. Modern technology of surgical treatment of achalasia cardia stage II–III. *Khirurgiya. Surgery. N.I. Pirogov Journal*. 2007; 9: 26–31 (in Russ.)].
  14. Гарганеева Н.П. Великое предвидение: Д.Д. Плетнев о «необходимости совместного и одновременного изучения соматической и психической симптоматики». *Клиническая медицина*. 2013; 91 (8): 68–73. [Garganeeva N.P. Great foresight: D.D. Pletnev on “the necessity of joint and simultaneous study of somatic and mental symptoms”. *Clinical Medicine*. 2013; 91 (8): 68–73 (in Russ.)].
  15. Антипова О.С. Расстройства адаптации: современные подходы к диагностике и терапии. *Психиатрия и психофармакотерапия*. 2012; 14 (6): 18–23. [Antipova O.S. Adjustment disorders: current approaches to diagnosis and therapy. *Psychiatry and Psychopharmacotherapy*. 2012; 14 (6): 18–23 (in Russ.)].
  16. Hameed U., Schwartz T.L., Malhotra K., West R.L., Bertone F. Antidepressant treatment in the primary care office: outcomes for adjustment disorders vs. major depression. *Ann. Clin. Psychiat*. 2005; 17 (2): 77–81.
  17. Вельтищев Д.Ю. Многоликий Эглонил. *Российский медицинский журнал*. 2001; 25: 1197–1202. [Veltishchev D.Yu. Eglonil of many faces. *Russian Medical Journal*. 2001; 25: 1197–1202 (in Russ.)].

## Сведения об авторах

Гарганеева Наталья Петровна, д-р мед. наук, профессор, кафедра общей врачебной практики и поликлиниче-

## Authors information

Garganeeva Natalia P., DM, Professor, General Medical Practice and Outpatient Therapy Department, SSMU,



ской терапии, СибГМУ; врач-терапевт, клиника НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-7353-7154.

**Белокрылова Маргарита Федоровна**, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение пограничных состояний, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ; профессор, кафедра психиатрии, наркологии и психотерапии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-2497-6684.

**Костин Алексей Константинович**, канд. мед. наук, науч. сотрудник, отделение пограничных состояний, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-6006-4853.

**Кошель Андрей Петрович**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой хирургии с курсом мобилизационной подготовки и медицины катастроф, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-5337-3183.

**Епанчинцева Елена Макаровна**, канд. мед. наук, зав. первым клиническим психиатрическим отделением, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-2974-2441.

**Лебедева Валентина Федоровна**, д-р мед. наук, заслуженный врач РФ, гл. врач, клиника НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-7722-8589.

**Аксенов Михаил Михайлович**, д-р мед. наук, профессор, зав. отделением пограничных состояний, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-8949-6596.

**Перчаткина Ольга Эрнстовна**, канд. мед. наук, зав. отделом координации научных исследований, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-5538-1304.

**Карташова Ирина Геннадьевна**, канд. мед. наук, врач-терапевт, врач ультразвуковой диагностики, клинико-диагностическое отделение, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-4250-8879.

**Рудницкий Владислав Александрович**, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение пограничных состояний, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, профессор, кафедра социальной работы, социальной и клинической психологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-1089-8793.

**Горбачевич Юлия Николаевна**, врач-психиатр, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-9024-4807.

**Цыбульская Елена Владимировна**, медицинский психолог, первое клиническое психиатрическое отделение, НИИ психического здоровья, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-6745-6462.

**Алексеев Владимир Александрович**, врач-хирург, соискатель, кафедра хирургии с курсом мобилизационной подготовки и медицины катастроф, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0001-7552-2848.

(✉) **Гарганеева Наталья Петровна**, e-mail: garganeeva@gmail.com.

Therapist, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7353-7154.

**Belokrylova Margarita F.**, DM, Lead Researcher, Borderline States Department, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation; Professor, Department of Psychiatry, Addiction Psychiatry and Psychotherapy, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2497-6684.

**Kostin Alexei K.**, PhD, Researcher, Borderline States Department, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6006-4853.

**Koshel Andrey P.**, DM, Professor, Head of the Department of Surgery with a Course of Mobilization Training and Medicine of Disasters, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5337-3183.

**Epanchintseva Elena M.**, PhD, Head of the First Clinical Psychiatric Unit, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2974-2441.

**Lebedeva Valentina F.**, DM, Chief Physician, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7722-8589.

**Aksenov Mikhail M.**, DM, Professor, Head of the Borderline States Department, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8949-6596.

**Perchatkina Olga E.**, PhD, Head of the Department of Coordination of Scientific Investigations, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5538-1304.

**Kartashova Irina G.**, PhD, Therapist, Ultrasound Diagnostician, Clinical Diagnostic Unit, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4250-8879.

**Rudnitsky Vladislav A.**, DM, Leading Researcher, Borderline States Department of Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation; Professor, Social Work, Social and Clinical Psychology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1089-8793.

**Gorbatsevich Yulia N.**, Psychiatrist, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9024-4807.

**Tsybul'skaya Elena V.**, Medical Psychologist, First Clinical Psychiatric Unit, Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6745-6462.

**Alekseev Vladimir A.**, Surgeon, Department of Surgery with the Course of Mobilization Training and Medicine of Disasters, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7552-2848.

(✉) **Garganeeva Natalia P.**, e-mail: garganeeva@gmail.com.

Поступила в редакцию 21.04.2018  
Подписана в печать 14.12.2018

Received 21.04.2018  
Accepted 14.12.2018

## Редкий случай сочетания рака шейки матки с односторонней полной аплазией придатков

Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Кишкина А.Ю., Очиров М.О.

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

### РЕЗЮМЕ

В статье представлен случай редкого сочетания рака шейки матки с врожденной патологией придатков – полной односторонней аплазией маточных придатков. Пороки развития женских половых органов составляют около 4% всех врожденных аномалий развития, при этом пороки развития придатков очень редки (менее 0,5%). В данном случае это была случайная находка при оперативном вмешательстве по поводу рака шейки матки. При проведении медико-генетического консультирования сделано заключение о наличии изолированной врожденной патологии.

**Ключевые слова:** рак, шейка матки, пороки эмбрионального развития, гонады.

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

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

**Для цитирования:** Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Кишкина А.Ю., Очиров М.О. Редкий случай сочетания рака шейки матки с односторонней полной аплазией придатков. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 299–303. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-299-303>.

## Combination of cervical cancer and unilateral complete aplasia of the adnexa: a case report

Chernyshova A.L., Kolomiets L.A., Kishkina A.Yu., Ochirov M.O.

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) SO RAS  
Kooperativny lane, 634050, Tomsk, Russian Federation

### ABSTRACT

We present a rare case of the combination of cervical cancer and unilateral complete aplasia of the uterine adnexa. Female genital tract anomalies account for about 4% of all congenital malformations.

Congenital malformations of the adnexa are very rare, accounting for less than 0.5%. In the presented case, this abnormality was found incidentally during surgery for cervical cancer. Medical genetic counseling confirmed the presence of the isolated congenital pathology.

**Key words:** cervical cancer, malformations in the embryonic development, gonads.

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

**Source of financing.** The authors state that there is no funding for the study.

**For citation:** Chernyshova A.L., Kolomiets L.A., Kishkina A.Yu., Ochirov M.O. Combination of cervical cancer and unilateral complete aplasia of the adnexa: a case report. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 299–303. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-299-303>.

## ВВЕДЕНИЕ

Анализ современной литературы показал, что пороки развития женских половых органов составляют 0,23–4% всех врожденных аномалий развития. При этом за последние 5 лет отмечено почти 10-кратное увеличение частоты пороков развития половых органов у девочек [1]. По данным мировой статистики гинекологической патологии, частота встречаемости пороков развития гениталий составляет 3,4%. В общей популяции это один случай на 4 000–5 000 новорожденных девочек, при этом чаще встречается аплазия влагалища или матки [2].

Одностороннее отсутствие придатков при нормальной матке – достаточно редкая патология, которая не часто описывается в литературе [3–5]. Выявление данной патологии значительно затруднено из-за бессимптомного течения. Также достаточно трудно определить частоту встречаемости данной аномалии. По данным различных авторов, она составляет 1: 11 240 [6]. Первый случай одностороннего отсутствия яичников был описан в 1923 г. [7]. За последнее десятилетие описан целый ряд клинических наблюдений с данной патологией, что может быть связано с широким использованием диагностической лапароскопии, однако общее число случаев остается небольшим [6–11].

Ряд авторов предполагает две возможные этиопатогенетические причины развития данной аномалии: во-первых, это бессимптомный перекрут одного или обоих придатков с ишемией органов во взрослой жизни или детстве или даже на стадии развития плода. Вторая причина может заключаться в том, что отсутствие придатков является следствием врожденного дефекта в развитии структур мюллерова протока и гонад [12].

К возникновению аномалий развития женских половых органов приводят наследственные, экзогенные, мультифакториальные причины. Возникновение пороков развития гениталий относят к критическому периоду внутриутробного развития. В основе лежат отсутствие слияния каудальных отделов парамезонефральных мюллеровых протоков, отклонения в преобразованиях урогенитального синуса, а также патологическое течение органогенеза гонад, который зависит от развития первичной почки. Эти отклонения составляют 16% всех аномалий. Аномалии развития половых органов чаще возникают при патологическом течении беременности у матери в разные сроки беременности. Это ранние и поздние гестозы, инфекционные заболевания, интоксикация, эндокринные нарушения в организме матери. Помимо этого, аномалии развития женских половых органов могут возникать под влиянием вредных факторов внешней среды, профессиональных вредных воздействий у матери, отравлениях токсическими веществами. При этом наряду с аномалиями гениталий, в 40% случаев встречаются аномалии мочевыделительной системы (односторонняя агенезия почки), кишечника (атрезия заднего прохода), костей (врожденный сколиоз), а также врожденные пороки сердца.

Исследования зарубежных авторов показали, что этиология яичникового и трубного перекрута многочисленна и связана с анатомическими (измененный мезосальпикс, удлиненная яичниковая ножка, трубные аномалии), физиологическими (аномальная перистальтика маточной трубы), гемодинамическими аномалиями (венозные застои в мезосальпиксе), внезапными изменениями положения тела, травмами, операциями или заболеваниями (перевязка маточных труб, воспалительное заболевание таза) и беременностью [13].

В литературе имеется целый ряд случаев, подтверждающих гипотезу о перекруте придатков, когда в дугласовом пространстве находились кальцинированные яичники [14]. Другие исследования также подтвердили гипотезу о перекруте придатков, поскольку отдельные остатки тканей маточной трубы и яичника наблюдались в брюшной полости [15, 16].

Некоторые исследования показали, что одностороннее отсутствие яичника может рассматриваться как возможный фактор бесплодия, если имеется функциональная контралатеральная маточная труба [17]. Ранее сообщалось о пациентке с такой аномалией, у которой было четыре нормальные беременности, завершившиеся нормальными влажными родами [18, 19]. У этой пациентки диагностированы отсутствие левого яичника и окклюзия правой маточной трубы во время лапароскопического исследования, однако матка и правый яичник были нормальными. Предположено, что патология контралатеральной маточной трубы может способствовать бесплодию. Однако неясно, могут ли односторонние врожденные аномалии маточной трубы и яичника влиять на функцию контралатеральной маточной трубы. Также неизвестно: может ли данная врожденная патология влиять каким-либо образом на развитие патологии шейки матки, в том числе рака шейки матки. Сочетание данных патологий в литературе не описано.

## КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациентка К., 58 лет, обратилась в гинекологическое отделение НИИ онкологии Томского НИМЦ в феврале 2018 г. с жалобами на мажущие выделения из половых путей в течение 2 мес на фоне менопаузы 10 лет. В женской консультации по месту жительства пациентке были выполнены конусовидная резекция шейки матки и раздельное диагностическое выскабливание полости матки и цервикального канала. По результатам гистологического заключения и данных пересмотра гистологических препаратов в условиях Томского НИИ онкологии получены данные за плоскоклеточную карциному шейки матки умеренной степени дифференцировки без ороговения, с инвазией на всю толщу биоптата (до 5 мм). При бимануальном исследовании наружные половые органы развиты правильно, оволосение по женскому типу. Влагалище емкое, своды эластичные. Шейка матки цилиндрической формы, эрозирована, контактно кровоточит. Матка увеличена до 5–6 нед, плотная, безболезненная. Придатки без особенностей. В анамнезе три беременности:

одни роды и два аборта. В ходе дополнительных методов исследования (магнитно-резонансная томография органов малого таза) определены инфильтративное утолщение в шейке матки, лимфаденопатия паховых лимфатических узлов. По ультразвуковому исследованию органов малого таза и брюшной полости – диффузные изменения печени, деформация желчного пузыря, хронический холецистит. Миома матки, серозометра, диффузные изменения миометрия шейки матки, объемное образование шейки матки, эхоскопически крупный левый яичник с диффузными изменениями. По результатам фиброгастродуоденоскопии – недостаточность кардии, хронические гиперпластические эрозии антрального отдела желудка, папиллома пищевода. По результатам колоноскопии – смешанный геморрой. Инфекционные и аллергические заболевания отрицает, наследственность неотягощена. Пациентке выставлен предварительный диагноз: «Рак шейки матки». Общеклинические анализы без патологии. Маркер SCC – 1 нг/мл (норма до 0,3 нг/мл).

Пациентке было выполнено оперативное вмешательство в объеме лапароскопии, расширенной экстирпации матки с придатками, в ходе операции выявлено полное отсутствие правой маточной трубы и правого яичника (рис. 1).



Рис. 1. Вид операционной раны  
Fig. 1. View of the surgical wound

На макропрепарате (рис. 2) на разрезе в области внутреннего зева определялся эрозивный участок с папиллярными разрастаниями. По результатам гистологического исследования операционного материала данные за плоскоклеточный неороговевший рак умеренной степени дифференцировки, глубина инвазии 5 мм, горизонтальная распространенность 8 мм. Без лимфоваскулярной инвазии. В лимфоузлах – очаговый

фиброз. Лейомиома матки. В яичнике белое тело. В трубе – хроническое воспаление. Послеоперационный период протекал без осложнений.

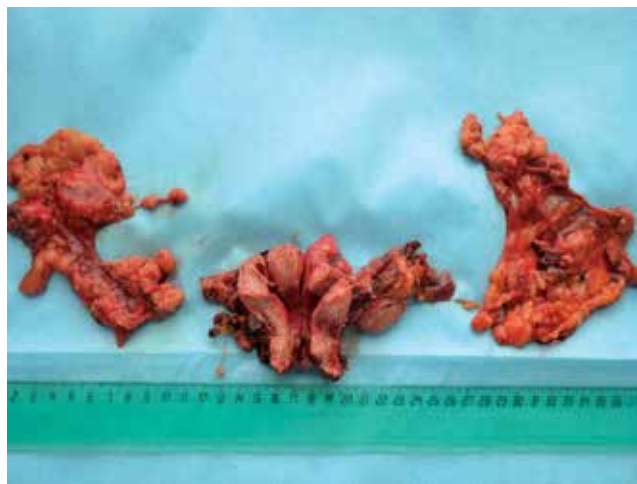


Рис. 2. Макропрепарат

Fig. 2. Gross specimen

Далее пациентке была проведена консультация генетика в условиях НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, по результатам которой данных за наследственную отягощенность не выявлено. Вероятнее всего, имеет место изолированная врожденная патология.

Пациентке выставлен заключенный диагноз: «Рак шейки матки IV<sub>1</sub> стадии». Полная односторонняя аплазия придатков. Состояние после оперативного лечения: лапароскопия, экстирпация матки с придатками, тазовая лимфодиссекция.

Больная была выписана с рекомендациями о проведении консультации и лечения в радиологическом отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном клиническом случае аномалия половых органов в виде полной аплазии правых придатков была диагностирована во время оперативного вмешательства. Можно утверждать, что она является врожденной патологией. Данная аномалия не выявлялась при различных методах исследования и никак не влияла на репродуктивную функцию пациентки. Описанный случай можно отнести к тем редким случаям, при которых полная аплазия придатков с одной стороны не стала причиной бесплодия и дала возможность пациентке реализовать свою репродуктивную функцию. Сочетание врожденной аномалии и онкологического процесса здесь, ве-

роятнее всего, имеет случайный характер и не влияет как на развитие, так и на дальнейшее течение онкогинекологического процесса.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Адамян Л.В., Кулаков В.И., Хашукоева А.З. Пороки развития матки и влагалища. М., 1998: 328. [Adamyan L.V., Kulakov V.I., Hashukoeva A.Z. Malformations of the uterus and vagina. M., 1998: 328 (in Russ.).]
2. Гинекология. Национальное руководство; под ред. В.И. Кулакова, Г.М. Савельевой, И.Б. Манухина. 2009: 1088. [Gynecology. National guidance; edited by V.I. Kulakov, G.M. Saveleva, I.B. Manukhin. 2009: 1088 (in Russ.).]
3. Eustace D.L. Congenital absence of fallopian tuba and ovary. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1992; 46 (2–3): 157–159.
4. Paternoster D.M., Costantini W., Uglietti A., Vasile C., Bocconi L. Congenital or torsion-induced absence of Fallopian tubes. Two case reports. *Minerva Ginecol.* 1998; 50 (5): 191–194.
5. Dahan M.H., Burney R., Lathi R. Congenital interruption of the ampullary portion of the fallopian tube. *Fertil. Steril.* 2006; 85 (6): 1820–1821.
6. Rapisarda G., Pappalardo E.M., Arancio A., La Greca M. Unilateral ovarian and fallopian tube agenesis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2009; 280 (5): 849–850. DOI: 10.1007/s00404-009-1018-z.
7. Alexander H.D. True unicornuate uterus and total absence of left broad ligament, round ligament, salpinx, ovary, kidney and ureter. *Can. Med. Assoc. J.* 1947; 56 (5): 539.
8. Rapisarda G., Pappalardo E.M., Arancio A., La Greca M. Unilateral ovarian and fallopian tube agenesis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2009; 280 (5): 849–850. DOI: 10.1007/s00404-009-1018-z.
9. Vaiarelli A., Luk J., Patrizio P. Ectopic pregnancy after IVF in a patient with unilateral agenesis of the fallopian tube and ovary and with endometriosis: search of the literature for these associations. *J. Assist Reprod. Genet.* 2012; 29 (9): 901–904. DOI: 10.1007/s10815-012-9819-6.
10. Gursoy A.Y., Akdemir N., Hamurcu U., Gozukucuk M. Incidental diagnosis of unilateral renal and adnexal agenesis in a 46-year-old multiparous woman. *Am. J. Case Rep.* 2013; 14: 238–240. DOI: 10.12659/AJCR.883970.
11. Muppala H., Sengupta S., Martin J.E. Unilateral absence of tube and ovary with renal agenesis and associated pyloric stenosis: communication. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2008; 137 (1): 123.
12. Spirina L.V., Bochkareva N.V. et al. Regulation of insulin-like growth NF-κB proteasome system in endometrial cancer. *Molecular Biology.* 2012; 46 (3): 407–413.
13. Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D. et al. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers. *Molecular Biology.* 2014; 48 (3): 384–389.



14. Duelholm M., Praest J. Isolated torsion of the normal fallopian tube. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1987; 66 (1): 89–90.
15. Yunusova N.V., Spirina L.V. et al. Relationship between the expression levels of PAPP-A metalloproteinase and growth and transcriptional factors in endometrial cancer. *Biology Bulletin.* 2013; 40 (3): 253–259.
16. Yunusova N.V., Kondakova I.V. et al. Serum adipokines and their receptors in endometrial and colon cancer patients: Relationship with tumor invasion and metastasis. *Voprosy Onkologii.* 2015; 61 (4): 619–623.
17. Uckuyu A., Ozcimen E.E., Sevinc Ciftci F.C. Unilateral congenital ovarian and partial tubal absence: report of four cases with review of literature. *Fertil. Steril.* 2009; 91 (3): 936 e5–e8. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.022.
18. Vaiarelli A., Luk J., Patrizio P. Ectopic pregnancy after IVF in a patient with unilateral agenesis of the fallopian tube and ovary and with endometriosis: search of the literature for these associations. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012; 29 (9): 901–904. DOI: 10.1007/s10815-012-9819-6.
19. Gursoy A.Y., Akdemir N., Hamurcu U., Gozukucuk M. Incidental diagnosis of unilateral renal and adnexal agenesis in a 46-year-old multiparous woman. *Am. J. Case Rep.* 2013; 14: 238–240. DOI: 10.12659/AJCR.883970.

## Сведения об авторах

**Чернышова Алена Леонидовна**, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение гинекологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-8194-2811.

**Коломиец Лариса Александровна**, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения гинекологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-6854-8940.

**Кишкина Анастасия Юрьевна**, аспирант, отделение гинекологии, НИИ онкологии Томский НИМЦ, г. Томск.

**Очиров Максим Олегович**, аспирант, отделение гинекологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск.

(✉) **Чернышова Алена Леонидовна**, e-mail: alacher@list.ru.

## Author information

**Chernyshova Alyona L.**, DM, Senior Research Scientist, Gynecology Department, Cancer Research Institute, TNRMC, Tomsk, Russian Federation.

**Kolomiets Larisa A.**, DM, Professor, Head of Gynecology Department, Cancer Research Institute, TNRMC, Tomsk, Russian Federation.

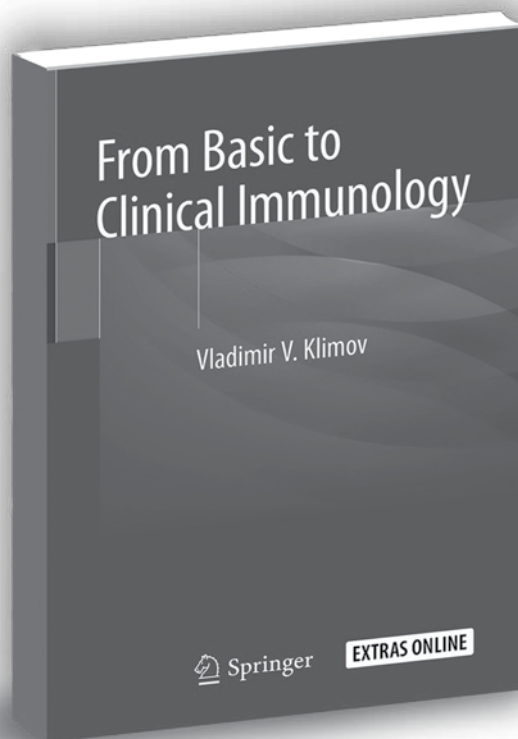
**Kishkina Anastasia Yu.**, Postgraduate Student, Gynecology Department, Cancer Research Institute, TNRMC, Tomsk, Russian Federation.

**Ochirov Maxim O.**, Postgraduate Student, Gynecology Department, Cancer Research Institute, TNRMC, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Chernyshova Alyona L.**, e-mail: alacher@list.ru.

Поступила в редакцию 03.05.2018  
Подписана в печать 14.12.2019

Received 03.05.2018  
Accepted 14.12.2019



В марте 2019 г. издательство Springer выпустило учебник по иммунологии премиум-класса на английском языке (377 стр.), написанный профессором СибГМУ В.В. Климовым. На подготовительном этапе рукопись прошла серьезное международное рецензирование. Этот учебник по иммунологии стал первым в отечественной истории и включен в каталог Библиотеки Конгресса США, о чем свидетельствует присланный автору сертификационный контрольный номер.

В настоящее время учебник в электронном и книжном вариантах продается через систему интернет-магазинов и медицинских книжных магазинов по всему миру.

Предназначен для медицинских студентов и практикующих врачей.



## СиБГМУ 1888–2019 гг.



На первый курс медицинского факультета осенью 1888 г. были зачислены 72 студента, из них 30 человек были выпускниками гимназий, двое перешли из других университетов, 40 окончили духовные семинарии.

**В 1893 г. первый выпуск медицинского факультета составил 34 студента, из них 31 выпускник держали испытания в государственной комиссии и были удостоены степени лекаря и лекаря с отличием.**

Среди выпускников были будущие профессора Томского университета П.В. Бутягин, И.М. Левашев и С.М. Тимашев. С 1893 г. по 1916 г. в испытательной медицинской комиссии Томского университета выдержали экзамены и были удостоены степени лекаря 1389 студентов, 568 из них получили дипломы с отличием.



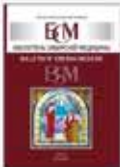
**На медицинском факультете осуществлялась подготовка не только лекарей, но также зубных врачей, дантистов, провизоров, аптекарских помощников и повивальных бабок.**



ISSN PRINT: 1682-0363
ISSN ONLINE: 1819-3684
Бюллетень сибирской медицины  
Bulletin of Siberian Medicine
bulletin
ENG | РУС

БМ  
Бюллетень сибирской медицины  
Расширенный поиск

ГЛАВНАЯ
О ЖУРНАЛЕ
МОЙ КАБИНЕТ
ПОИСК
СВЕЖИЙ НОМЕР
АРХИВ
НОВОСТИ
АРХИВ 2002-2011



Научно-практический рецензируемый журнал  
Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Бюллетень сибирской»

«Бюллетень сибирской медицины» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты научных исследований, ориентированных на разработку передовых медицинских технологий.

С целью объединения научной медицинской общности, распространения актуальной информации и содействия профессиональному росту специалистов журнал публикует оригинальные научные статьи, представляющие результаты экспериментальных и клинических исследований, лекции, научные обзоры, отражающие результаты исследований в различных областях медицины. Приоритет для публикации предоставляется материалам по перспективным направлениям современной медицинской науки:

- молекулярная медицина,
- регенеративная медицина и биомедицина,
- информационные технологии в биологии и медицине,
- инвазивные медицинские технологии,
- нейронауки и поведенческая медицина,
- фармакология и инновационная фармацевтика,
- ядерная медицина,
- трансляционная медицина.

Журнал выполняет широкий спектр функций, которые в целом дают представление об основных направлениях развития российской медицинской науки и ее достижениях, ее конкурентоспособности и степени интеграции в международное научное сообщество.

Научно-практический рецензируемый журнал «Бюллетень сибирской медицины» / Bulletin of Siberian Medicine издается Сибирским государственным медицинским университетом с 2001 г. при поддержке ТРОО «Академия доказательной медицины».

**Главный редактор** — академик РАН В.В. Новицкий.

Журнал зарегистрирован в Министерстве Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций.

Свидетельство ПИ № 77-7366 от 26.05.2001 г.  
ISSN 1682-0363

Журнал включен в Перечень периодических научных и научно-технических изданий, выпускаемых в РФ, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Перечень ВАК, редакция 01.12.2015).

**Индексация:**

- РИНЦ (RSCI; Science Index)
- Киберленка
- DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS
- WoS (ESCI) с 2016 года
- Scopus с 2018 года.

Продолжая традиции первых медицинских журналов, на

**Отправить статью**

Правила для авторов

Редакционная коллегия


Рецензирование

Этика публикаций

**ПОПУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ**

Содержание информационной системы учета аэробного и анаэробного обмена после физической нагрузки различного характера

Том 16, № 2 (2017)



**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР**  
Новицкий В.В.

**ОБЛАКО ТЕГОВ**

адаптация артериальная гипертензия  
бронхиальная астма воспаление дети

OPEN ACCESS

Аннотированный библиографический журнал

АНТИПЛАГИАТ

Scopus

ANRI

СИБИРСКАЯ МЕДИЦИНА

DOAJ

LIBRARY.RU

EMBASE/STARLINE

Global FO

Google

h360

NEICON

NLM Catalog

Open Archives

Research Bible

РГБ

Sciences Index

nmj.ru

ROAD

Russian Science Citation Index

Scopus

ULRICH'S PROLOGAS DIRECTORY

WorldCat

znanium.com