

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Выходит 4 раза в год

Том 19, № 2, 2020

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

Оригинал-макет:

Издательство СибГМУ.

634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

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

Перевод: М.Е. Орлова, Дж. Палацца

Электронная верстка, дизайн обложки

Л.Д. Кривцова

Отпечатано в ООО «Литбюро»,

634055, г. Томск, ул. Королёва, 4.

Подписано в печать 23.06.2020 г.

Формат 60 × 84/8. Печать офсетная.

Бумага мелованная. Гарнитура «Мысль».

Печ. л. 26. Усл. печ. л. 25.

Тираж 500 экз. Заказ 386.

Цена – свободная.

Дата выхода в свет 26.06.2020.

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, 2020

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

В.В. Новицкий, академик РАН (Томск)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

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

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

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

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

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

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

Л.И. Афтанас, академик РАН (Новосибирск)

А.Н. Байков, профессор, д-р мед. наук (Томск)

А.А. Баранов, академик РАН (Москва)

А.И. Венгеровский, профессор, д-р мед. наук (Томск)

Е.Г. Григорьев, член-корреспондент РАН (Иркутск)

А.М. Дыгай, академик РАН (Томск)

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

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

С.И. Карась, профессор, д-р мед. наук (Томск)

Р.С. Карпов, академик РАН (Томск)

В.И. Киселев, член-корреспондент РАН (Барнаул)

Н.А. Корнетов, профессор, д-р мед. наук (Томск)

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

А.Д. Макацария, член-корреспондент РАН (Москва)

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

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

В.П. Пузырев, академик РАН (Томск)

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

В.И. Стародубов, академик РАН (Москва)

Е.А. Степовая, профессор, д-р мед. наук (Томск)

А.Т. Тепляков, профессор, д-р мед. наук (Томск)

В.А. Ткачук, академик РАН (Москва)

В.А. Труфакин, академик РАН (Новосибирск)

О.С. Федорова, профессор, д-р мед. наук (Томск)

И.А. Хлусов, профессор, д-р мед. наук (Томск)

Е.Л. Чойнзонов, академик РАН (Томск)

А.Г. Чучалин, академик РАН (Москва)

А.В. Шабров, академик РАН (Санкт-Петербург)

В.А. Шкурупий, академик РАН (Новосибирск)

М.С. Юсубов, профессор, д-р хим. наук (Томск)

A. Antsaklis, профессор (Греция)

F. Chervenak, профессор (США)

C. Dadak, профессор (Австрия)

Y. Dekhtyar, профессор (Латвия)

M. Epple, профессор (Германия)

D. Gailani, профессор (США)

P. Odermatt (Швейцария)

J. Odland (Норвегия)

M. Poyurovsky, профессор (Израиль)

V. Zhdankin, профессор (США)

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

Peer-reviewed scientific-practical journal
Issued quarterly

Volume 19, No. 2, 2020

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

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

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

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

Signed to print 23.06.2020
Format 60 × 84/8. Offset print.
Coated paper. Mysl' font.
P.l. 26. C.p.l. 25.
500 copies. Odder no 386.

The price – free.
Date of publication 26.06.2020.

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

© Siberian State Medical University, 2020

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. Puzyryov, *Academician of RAS (Tomsk)*
V.Yu. Serebrov, *Professor (Tomsk)*
V.I. Starodubov, *Academician of RAS (Moscow)*
Ye.A. Stepovaya, *Professor (Tomsk)*
A.T. Teplyakov, *Professor (Tomsk)*
V.A. Tkachuk, *Academician of RAS (Moscow)*
V.A. Trufakin, *Academician of RAS (Novosibirsk)*
O.S. Fedorova, *Professor (Tomsk)*
I.A. Khlusov, *Professor (Tomsk)*
Ye.L. Choinzonov, *Academician of RAS (Tomsk)*
A.G. Chuchalin, *Academician of RAS (Moscow)*
A.V. Shabrov, *Academician of RAS (St. Petersburg)*
V.A. Shkurupiy, *Academician of RAS (Novosibirsk)*
M.S. Yusubov, *Professor (Tomsk)*
A. Antsaklis, *Professor (Greece)*
F. Chervenak, *Professor (USA)*
C. Dadak, *Professor (Austria)*
Y. Dekhtyar, *Professor (Latvia)*
M. Epple, *Professor (Germany)*
D. Gailani, *Professor (USA)*
P. Odermatt, *(Switzerland)*
J. Odland, *(Norway)*
M. Poyurovsky, *Professor (Israel)*
V. Zhdankin, *Professor (USA)*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	ORIGINAL ARTICLES
<p><i>Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И.</i> Закономерности изменений иммуно-гормональной регуляции при вибрационной болезни и нейросенсорной тугоухости</p>	<p><i>Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I.</i> Patterns of changes in immune and hormonal regulation in hand-arm vibration syndrome and sensorineural hearing loss</p>
<p><i>Верижникова Л.Н., Арямкина О.Л., Терентьева Н.Н.</i> Соматическая патология у жителей Ханты-Мансийского автономного округа – Югры</p>	<p><i>Verizhnikova L.N., Aryamkina O.L., Terentyeva N.N.</i> Somatic pathology in residents of Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Yugra</p>
<p><i>Горошинская И.А., Немашкалова Л.А., Франциянц Е.М., Сурикова Е.И., Медведева Д.Е., Маслов А.А.</i> Структурно-функциональные показатели мембран эритроцитов крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли и стадией злокачественного процесса</p>	<p><i>Goroshinskaya I.A., Nemashkalova L.A., Frantsiyants E.M., Surikova E.I., Medvedeva D.E., Maslov A.A.</i> Structural and functional indicators of erythrocyte membranes in gastric cancer patients with different histotypes of the tumor and stages of the malignant process</p>
<p><i>Зима А.П., Прохоренко Т.С., Саприн Т.В., Мусина Н.Н., Новицкий В.В., Байков А.Н.</i> Патогенез анемического синдрома у беременных с гестационным сахарным диабетом</p>	<p><i>Zima A.P., Prokhorenko T.S., Saprina T.V., Musina N.N., Novitsky V.V., Baykov A.N.</i> Pathogenesis of anemia in pregnant women with gestational diabetes mellitus</p>
<p><i>Иноземцева А.А., Помешкина С.А., Аргунова Ю.А., Барбараш О.Л.</i> Ассоциация полиморфизма гена рецептора серотонина 2с с депрессией и показателями качества жизни у пациентов перед операцией коронарного шунтирования</p>	<p><i>Inozemtseva A.A., Pomeshkina S.A., Argunova Yu.A., Barbarash O.L.</i> Association of serotonin 2c receptor gene polymorphism with depression and quality of life indicators in patients before coronary artery bypass grafting</p>
<p><i>Кайдаш О.А., Иванов В.В., Венгеровский А.И., Буйко Е.Е., Щепеткин И.А.</i> Экспериментальная модель сахарного диабета 2-го типа у крыс, вызванная диетой с высоким содержанием жиров и стрептозотоцином в низкой дозе</p>	<p><i>Kaydash O.A., Ivanov V.V., Vengerovsky A.I., Buyko E.E., Schepetkin I.A.</i> The experimental model of type 2 diabetes mellitus caused by a high-fat diet with low-dose streptozotocin in rats</p>
<p><i>Кробинец И.И., Минева Н.В., Богданова И.О., Четкин А.В.</i> Частота встречаемости антигенов нейтрофилов человека и риск аллоиммунизации у доноров и больных гематологическими заболеваниями</p>	<p><i>Krobinets I.I., Mineeva N.V., Bogdanova I.O., Chechetkin A.V.</i> Human neutrophil antigen allele frequencies and assessment of HNA alloimmunisation risk in donors and hematological patients</p>
<p><i>Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Кутихин А.Г., Мильто И.В., Сидорова О.Д., Барбараш Л.С.</i> Нарушение целостности эндотелиального монослоя биопротезов клапанов сердца как триггер развития первичной тканевой несостоятельности</p>	<p><i>Mukhamadiyarov R.A., Rutkovskaya N.V., Kutikhin A.G., Milto I.V., Sidorova O.D., Barbarash L.S.</i> Endothelial monolayer disruption in bioprosthetic heart valve as a trigger of primary tissue failure</p>

Нарыжная Н.В., Кошельская О.А., Харитоновна О.А., Жигалева Н.И., Журавлева О.А., Евтушенко В.В., Андреев С.Л., Евтушенко А.В., Бощенко А.А.

Морфофункциональные характеристики загрудинной жировой ткани и их связь с артериальной жесткостью у пациентов с коронарным атеросклерозом, подвергшихся операции аортокоронарного шунтирования

63

Naryzhnaya N.V., Koshelskaya O.A., Kharitonova O.A., Zhigaleva N.Y., Zhuravleva O.A., Evtushenko V.V., Andreev S.L., Evtushenko A.V., Boshchenko A.A.

Morphological and functional characteristics of retrosternal adipose tissue and their relation to arterial stiffness parameters in patients after coronary artery bypass grafting

Носарева О.Л., Орлов Д.С., Шахристовна Е.В., Степовая Е.А.

Молекулярные механизмы влияния N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии

72

Nosareva O.L., Orlov D.S., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A.

Molecular mechanisms of the effects of N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol on regulation of apoptosis in P19 cells under hypoxia

Песковец Р.Д., Штарик С.Ю., Евсюков А.А.

Скрининг депрессии с оценкой социально-экономического статуса пациентов в первичной медицинской сети в крупном промышленном центре Восточной Сибири

78

Peskovets R.D., Shtarik S.Yu., Evsyukov A.A.

Screening of depression with an assessment of the socioeconomic status of patients in the primary care network in the large industrial city of Eastern Siberia

Сулгин А.А., Сидорова Т.Н., Сидоров В.Ю.

Выращивание и характеристика тканеинженерной конструкции из гладкомышечных клеток коронарной артерии сердца человека

85

Sulgin A.A., Sidorova T.N., Sidorov V.Y.

Growth and characterization of a tissue-engineered construct from human coronary artery smooth muscle cells

Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Трепитаки Л.К., Немашкалова Л.А., Каплиева И.В., Лесовая Н.С.

Состояние антиоксидантной системы в митохондриях клеток кожи при росте экспериментальной меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли

96

Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Trepitaki L.K., Nemashkalova L.A., Kaplieva I.V., Lesovaya N.S.

State of the antioxidant system in mitochondria of skin cells during experimental B16/F10 melanoma growth with chronic neurogenic pain

Харламова О.С., Николаев К.Ю., Рагино Ю.И., Воевода М.И.

Влияние курения на уровни сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови у пациентов без бронхолегочных заболеваний

104

Kharlamova O.S., Nikolaev K.Yu., Ragino Yu.I., Voevoda M.I.

Effects of smoking on the level of sp-a and sp-d surfactant proteins in the blood of patients without bronchopulmonary diseases

Эсмедляева Д.С., Алексеева Н.П., Новицкая Т.А., Дьякова М.Е., Ариэль Б.М., Григорьев И.В., Соколов Е.Г.

Активность воспалительного процесса и маркеры деструкции внеклеточного матрикса при туберкулезе легких

112

Esmedlyaeva D.S., Alekseeva N.P., Novitskaya T.A., Dyakova M.Ye., Ariel I.V., Grigoriev B.M., Sokolovich E.G.

Inflammatory activity and markers of extracellular matrix destruction in pulmonary tuberculoma

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

REVIEWS AND LECTURES

Асанов М.А., Понасенко А.В.

Роль комплекса IL-33/ST2 в модуляции иммунного ответа при инфекционном эндокардите (обзор литературы)

120

Asanov M.A., Ponasenko A.V.

The role of IL-33/ST2 system in the modulation of the immune response in infective endocarditis (a literature review)

<i>Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю.</i> Биогенные полиамины при генитальной гонококковой инфекции: факты и гипотезы	132	<i>Karpunina T.I., Nesterova L.Yu.</i> Biogenic polyamines and genital gonococcal infection: facts and hypotheses	
<i>Карякин Н.Н., Шейко Г.Е., Воловик М.Г., Белова А.Н.</i> Технологии виртуальной реальности в комплексной медицинской реабилитации пациентов с детским церебральным параличом	142	<i>Karyakin N.N., Sheiko G.E., Volovik M.G., Belova A.N.</i> Virtual reality technologies in complex medical rehabilitation of patients with cerebral palsy	
<i>Кретов Е.И., Заполоцкий Е.Н., Таркова А.Р., Прохорихин А.А., Бойков А.А., Малаев Д.У.</i> Электроспиннинг для дизайна материалов медицинского назначения	153	<i>Kretov E.I., Zapolotsky E.N., Tarkova A.R., Prokhorikhin A.A., Boykov A.A., Malaev D.U.</i> Electrospinning for the design of medical supplies	
<i>Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г.</i> Мониторинг антибиотикорезистентности: обзор информационных ресурсов	163	<i>Kuzmenkov A.Yu., Vinogradova A.G.</i> Antimicrobial resistance monitoring: a review of information resources	
<i>Кучер А.Н.</i> Нейрогенное воспаление: биохимические маркеры, генетический контроль и болезни	171	<i>Kucher A.N.</i> Neurogenic inflammation: biochemical markers, genetic control and diseases	
<i>Лобанова Н.Ю., Чичерина Е.Н.</i> Нетрадиционные факторы риска и их значение в оценке сердечно-сосудистого риска у бессимптомных пациентов	182	<i>Lobanova N.Yu., Chicherina E.N.</i> Alternative risk factors and their importance in assessment of cardiovascular risk in asymptomatic patients	
<i>Матвеева М.В., Самойлова Ю.Г., Жукова Н.Г., Толмачев И.В., Бразовский К.С., Лейман О.П., Фимушкина Н.Ю., Тонких О.С.</i> Нейровизуализационные методики оценки головного мозга при сахарном диабете (литературный обзор)	189	<i>Matveeva M.V., Samoilova Yu.G., Zhukova N.G., Tolmachov I.V., Brazovskiy K.S., Leiman O.P., Fimushkina N.Yu., Rotkank M.A.</i> Neuroimaging methods for assessing the brain in diabetes mellitus (literature review)	
<i>Сорокина Л.Е., Петренко В.И., Субботкин М.В., Куланова А.А., Кучеренко А.С., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Номеровская А.Ю., Халилов С.С.</i> Оптогенетические методы и технологии в решении прикладных медицинских задач	195	<i>Sorokina L.E., Petrenko V.I., Subbotkin M.V., Kulanova A.A., Kucherenko A.S., Kubyshkin A.V., Fomochkina I.I., Nomerovskaya A.Yu., Halilov S.I.</i> Optogenetic methods and technologies in solving applied medical problems	
СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ		CASE CLINICAL PRACTICE	
<i>Цой Е.И., Роговская Ю.В., Демьянов С.В., Рябов В.В.</i> Клинический случай амилоидоза сердца, ассоциированного с миеломной болезнью	204	<i>Tsoi E.I., Rogovskaya Yu.V., Demyanov S.V., Ryabov V.V.</i> The clinical case of cardiac amyloidosis associated with multiple myeloma	

УДК 616-001.34:616.28-008.14]:612.017/.018
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-6-12>

Закономерности изменений иммуно-гормональной регуляции при вибрационной болезни и нейросенсорной тугоухости

Бодиенкова Г.М.^{1,2}, Курчевенко С.И.¹

¹ Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований
Россия, 665827, г. Ангарск, микрорайон 12А, 3

² Иркутский национальный исследовательский технический университет
Россия, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – выявить закономерности иммуно-гормональной регуляции при вибрационной болезни и нейросенсорной тугоухости для обоснования информативных биомаркеров.

Материалы и методы. Проведено обследование мужчин с профессиональной патологией, индуцированной воздействием вибрации и шума. В первую группу включены 26 пациентов с вибрационной болезнью I–II стадии, во вторую – 38 пациентов с профессиональной нейросенсорной тугоухостью. Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли содержание кортизола, дегидроэпандростерона сульфата, пролактина, свободного трийодтиронина, свободного тироксина, тиреотропного гормона (ТТГ); интерлейкина (IL) 1 β , IL-8, IL-10.

Результаты. Результаты исследования позволили выявить особенности иммуно-гормональной регуляции при вибрационной болезни и нейросенсорной тугоухости. Общей закономерностью у пациентов с вибрационной болезнью и нейросенсорной тугоухостью являются возрастание кортизола, пролактина, IL-8 и снижение свободного (св.) T₄, IL-1 β . Различия выявленных изменений в иммуно-гормональном статусе характеризовались для первых усилением продукции ТТГ, для вторых – возрастанием продукции св. T₃ и снижением IL-10. При вибрационной болезни высокие уровни кортизола сопровождались снижением концентрации IL-1 β и IL-10, а при нейросенсорной тугоухости возрастание концентрации пролактина – увеличением продукции IL-8.

Заключение. Выявленные особенности иммуно-гормональных взаимоотношений могут быть обусловлены интенсивностью выработки кортизола и пролактина при воздействии физических факторов различной природы. Сохраняющиеся высокие концентрации кортизола и пролактина у обследованных являются важными патогенетически значимыми факторами в развитии и течении заболеваний. Определены новые биомаркеры для дополнительной диагностики профессиональной нейросенсорной тугоухости (IL-4, пролактин, св. T₃).

Ключевые слова: вибрационная болезнь, нейросенсорная тугоухость, гормональный статус, цитокины, маркеры диагностики.

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. Обследования выполнены с информированного согласия пациентов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 6 от 15.11.2012).

✉ Курчевенко Светлана Ивановна, e-mail: svetlanakurchevenko@mail.ru.

Для цитирования: Бодиевкова Г.М., Курчевенко С.И. Закономерности изменений иммуно-гормональной регуляции при вибрационной болезни и нейросенсорной тугоухости. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 6–12. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-6-12>.

Patterns of changes in immune and hormonal regulation in hand-arm vibration syndrome and sensorineural hearing loss

Bodienkova G.M.^{1,2}, Kurchevenko S.I.¹

¹ East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research
3, 12A microdistrict, Angarsk, 665827, Russian Federation

² Irkutsk National Research Technical University
83, Lermontov Str., Irkutsk, 664074, Russian Federation

ABSTRACT

The purpose of the research was to identify changes in immune and hormonal regulation in patients with hand-arm vibration syndrome and sensorineural hearing loss to substantiate informative biomarkers.

Materials and methods. Men with occupational injury induced by exposure to vibration and noise were examined. The first group included 26 people diagnosed with stage 1 and 2 hand-arm vibration syndrome. The second group consisted of 38 patients diagnosed with sensorineural hearing loss. Serum levels of cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, prolactin, free triiodothyronine (T₃), free thyroxine (T₄), thyroid-stimulating hormone (TSH), and interleukins IL-1β, IL-8, IL-10 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. The results of the study revealed the peculiarities in the immune and hormonal regulation in hand-arm vibration syndrome and sensorineural hearing loss. More pronounced changes were observed in sensorineural hearing loss. A common pattern in patients with hand-arm vibration syndrome and sensorineural hearing loss was an increase in cortisol, prolactin and IL-8 and a decrease in free T₄ and IL-1β. Differences in the identified changes in the immune and hormonal status were characterized by increased TSH production in the first group, and increased free T₃ production and decreased IL-10 in the second group. In hand-arm vibration syndrome, high levels of cortisol were accompanied by a decrease in the IL-1β and IL-10 concentrations. In sensorineural hearing loss, an increase in the prolactin concentration was accompanied by increased production of IL-8.

Conclusions. The identified features of immune and hormonal relations may be induced by the intensity of cortisol and prolactin production under the effects of various physical factors. Persistent high levels of cortisol and prolactin in the examined patients are important pathogenetically significant factors in the development of the disease. New laboratory indicators (IL-4, prolactin, free T₃) for additional diagnosis of occupational sensorineural hearing loss were identified.

Key words: hand-arm vibration syndrome, sensorineural hearing loss, hormonal status, cytokines, diagnostic markers.

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 funds allocated for implementation of the state assignment of the East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research. No external funding was received.

Conformity with the principles of ethics. All procedures involving human participants were performed in accordance with the ethical standards of the 1964 Helsinki declaration and its later amendments, the ethical standards of the East-Siberian Research Center of Human Ecology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (Protocol No. 6 of November 15, 2012), and the Guidelines for Clinical Practice in the Russian Federation approved by the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 266 of June 19, 2003. All participants of the study signed an informed consent.

For citation: Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I. Patterns of changes in immune and hormonal regulation in hand-arm vibration syndrome and sensorineural hearing loss. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 6–12. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-6-12>.

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени проблема вибрационной болезни (ВБ) и профессиональной нейросенсорной тугоухости (НСТ) сохраняет свою медико-социальную значимость не только в связи с высокой распространенностью этих патологий, но и наносимыми социально-экономическими потерями, обусловленными инвалидизацией трудоспособного населения. И, как следствие, значительным экономическим ущербом обществу, поскольку уже через 5–7 лет контакта с шумо-вибрационным фактором развивается профессиональная патология. В ряде случаев (3,6%) заболевание у рабочих в условиях воздействия локальной вибрации регистрируется уже через 1–4 года работы [1]. В патогенезе как ВБ, так и НСТ важная роль отводится нарушениям нейроиммуноэндокринной регуляции [2].

Известно, что воздействие шума и вибрации на организм рабочих формирует состояние хронического стресса, при котором постоянная активность гормонов коры надпочечников угнетает активность клеток иммунной системы, что способствует снижению устойчивости организма к инфекционным заболеваниям, становится возможным рост различных опухолей и др. [3]. В этой связи актуальными остаются исследования, направленные на своевременное выявление нарушений иммуно-гормональной регуляции, позволяющие провести необходимые профилактические мероприятия для сохранения здоровья рабочих и предотвращения профессиональных и профессионально обусловленных заболеваний. Несмотря на значительное количество свидетельств о неблагоприятном влиянии шума и вибрации на организм [4, 5], недостаточно изученными остаются вопросы, касающиеся диагностической значимости гормонов при ВБ и НСТ.

Цель исследования заключалась в выявлении закономерностей иммуно-гормональной регуляции у пациентов с ВБ и НСТ для обоснования информативных диагностических показателей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 64 мужчин с профессиональной патологией, индуцированной воздействием вибрации и шума. В первую группу включены 26 пациентов с ВБ I–II стадии, средним возрастом ($48,9 \pm 1,8$) лет и стажем работы ($24,2 \pm 1,9$) года. Вторую группу составили 38 пациентов с профессиональной НСТ, средним возрастом ($54,1 \pm 0,1$) года, стажем работы ($31,1 \pm 1,4$) года. Постановка диагноза осуществлялась врачами клиники института в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) с помощью функциональных ме-

тодов исследования (электронейромиография и электроэнцефалография). Группу сравнения составили 24 практически здоровых мужчины (средний возраст – $49,0 \pm 2,03$) лет), не имеющие в профессиональном маршруте контакта с вибрацией и шумом.

Методом иммуноферментного анализа на автоматическом анализаторе Alisei Q.S. (SEAC, Италия) в сыворотке крови определяли концентрацию гормонов: кортизола, дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭА-С), пролактина, свободного трийодтиронина (св. T_3), свободного тироксина (св. T_4) и тиреотропного гормона (ТТГ) (компания «АлкорБио», г. Санкт-Петербург). А также цитокинов – интерлейкина (IL) 1 β , IL-4, IL-8, IL-10 (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Работа не ущемляет права и не подвергает опасности благополучия обследованных работников в соответствии с требованиями биомедицинской этики, предъявляемыми Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000) и Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Возраст и стаж работы обследованных представлены в виде средней и ее ошибки $M \pm m$. Полученные в ходе исследования результаты сравнительной оценки уровня гормонов и цитокинов у пациентов с ВБ и НСТ представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{25} - Q_{75})$. Для оценки непараметрических данных использовали критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони. За уровень статистической значимости различий принимали $p < 0,016$. Для выявления взаимосвязи признаков использовали корреляционный анализ Спирмена. Уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$. Для многомерного дискриминантного анализа использовали модуль Discriminant analysis. Информативность анализируемых показателей оценивали шаговыми процедурами, граничным значением F включения выбрана величина $F > 3,0$; критерием классификации служила мера D2 Махаланобиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В предыдущих исследованиях нами показано, что у стажированных работников под действием вибрации на начальных этапах иммунокомпроментации происходит активация периферических мононуклеарных клеток с выбросом провоспалительных цитокинов (IL-1 β и TNF α), которые, индуцируя выработку глюкокортикоидов, могут угнетать иммунную систему [3]. Предположим, что степень выраженности патологического процесса при развитии ВБ может определяться степенью соотношения влияния регулируемых

структур. В этой связи, основываясь на том, что стероидные гормоны коркового слоя коры надпочечников являются регуляторами фундаментальных процессов жизнедеятельности организма: координированного

роста, дифференцировки, размножения, адаптации, поведения [6], нами проведена сравнительная оценка уровней глюкокортикоидных и тиреоидных гормонов у пациентов с ВБ и НСТ (табл. 1).

Таблица 1

Содержание гормонов у пациентов с вибрационной болезнью (ВБ) и нейросенсорной тугоухостью (ТТ), Me (Q_{25} – Q_{75})			
Показатель	Пациенты с ВБ, n = 26	Пациенты с НСТ, n = 38	Группа сравнения, n = 24
Кортизол, нмоль/л	648,7 (278,9–803,6)*	1085,2 (795,1–1296,7)**	378,7 (211,9–532,4)
ДГЭА-С, нмоль/л	1,4 (1,2–1,9)	1,5 (1,1–1,9)	1,7 (1,3–1,9)
Пролактин, мМЕ/л	117,9 (19,8–184,9)*	254,9 (180,1–297,4)**	55,8 (0,001–109,9)
Св. Т ₃ , нмоль/л	4,6 (4,3–5,1)	5,4 (3,6–6,4)*	3,8 (3,2–4,8)
Св. Т ₄ , нмоль/л	11,7 (9,5–12,8)*	13,8 (12,2–14,7)**	15,5 (14,1–16,7)
ТТГ, мкМЕ/л	0,7 (0,5–1,3)*	1,7 (1,2–2,3)*	1,3 (1,0–1,6)

* различия по сравнению с группой сравнения; * различия между группами пациентов с ВБ и НСТ статистически значимы при $p < 0,016$.

В результате исследования выявлено превышение концентрации кортизола в сыворотке крови пациентов с ВБ в 1,7 раз ($p = 0,043$), а у пациентов с НСТ в 2,8 раза ($p = 0,0003$) по сравнению с лицами группы сравнения. При этом у пациентов с НСТ отмечается более выраженное (в 1,6 раз, $p = 0,001$) возрастание уровня кортизола, чем у пациентов с ВБ. Сравнительная оценка показателей ТТГ у пациентов обследуемых групп позволила выявить различия, характеризующиеся выраженным снижением его концентрации у пациентов в ВБ ($p = 0,002$) и ярко выраженной тенденцией к увеличению при НСТ ($p = 0,19$) по сравнению с группой сравнения. При этом у лиц с НСТ уровень тиреотропного гормона в 1,8 раза превышал таковой при ВБ ($p = 0,00003$). В нашем случае возрастание концентрации св. Т₃ обнаружено только у пациентов с НСТ относительно группы сравнения ($p = 0,016$). При этом показатели св. Т₄ у пациентов как с ВБ ($p = 0,00001$), так и с НСТ ($p = 0,005$) статистически значимо снижались относительно группы сравнения. Анализ сывороточных концентраций пролактина, стимулирующего продукцию ряда цитокинов [7], позволил выявить его превышение у пациентов с ВБ в 2,1 раза ($p = 0,04$), а у пациентов с НСТ в 4,5 раза ($p = 0,001$) относительно группы сравнения. Обращает на себя внимание значимое превышение указанного показателя у пациентов с НСТ по сравнению с лицами, страдающими ВБ ($p = 0,002$). Выявленные изменения в гормональном профиле обследованных пациентов сопровождалось нарушением цитокинового баланса (табл. 2).

Обнаружены статистически значимое снижение концентрации провоспалительного IL-1 β у пациентов с ВБ ($p = 0,013$) и ярко выраженная тенден-

ция к его снижению при НСТ ($p = 0,056$) по сравнению с группой сравнения. Высокие значения IL-8 определены у пациентов с ВБ и у пациентов с НСТ по сравнению с группой здоровых ($p = 0,0047$ и $p = 0,0016$ соответственно). Обращает на себя внимание снижение противовоспалительного IL-10 только у пациентов с НСТ по сравнению с группой здоровых, $p = 0,015$.

Таблица 2

Содержание цитокинов в сыворотке крови пациентов с вибрационной болезнью и нейросенсорной тугоухостью, пг/мл, Me (Q_{25} – Q_{75})			
Показатель	ВБ, n = 26	НСТ, n = 38	Группа сравнения, n = 24
IL-1 β	0,01 (0,01–0,1)*	0,01 (0,01–2,7)	0,9 (0,5–1,8)
IL-8	6,8 (5,7–8,3)*	8,7 (4,1–20,5)*	2,7 (1,8–3,1)
IL-4	0,01 (0,01–0,02)	0,01 (0,01–0,01)	0,01 (0,01–8,8)
IL-10	1,1 (0,01–1,66)	0,01 (0,01–0,01)*	2,1 (0,01–13,4)

* различия по сравнению с группой сравнения статистически значимы при $p < 0,016$.

На следующем этапе наших исследований представляло определенный интерес выявить особенности между изменениями показателей гормонального статуса и уровнем цитокинов. В результате корреляционного анализа установлены особенности иммуно-гормональной регуляции, характерные для ВБ и НСТ. Так, у пациентов с ВБ возрастание уровня кортизола сопровождалось снижением концентрации провоспалительного IL-1 β ($r = -0,49$; $p = 0,018$) и повышением противовоспалительного IL-10 ($r = 0,49$; $p = 0,018$). В то время как у пациентов с НСТ возрастание концентрации пролактина сопровождалось увеличением продукции IL-8 ($r = 0,44$; $p = 0,009$).

Далее для обоснования наиболее информативных лабораторных показателей к дополнительной диагностике НСТ нами выполнен дискриминантный анализ, в который были включены 23 исследуемых показателя в группе пациентов, страдающих НСТ, и группе сравнения. В результате выполненных расчетов наиболее значимыми критериями являлись IL-4 ($p = 0,0045$), пролактин ($p = 0,0098$) и св. T_3 ($p = 0,0227$). Точность диагностики НСТ составила 98%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка уровня глюкокортикоидных и тиреоидных гормонов у пациентов с ВБ и НСТ позволила выявить как общие закономерности, так и отличительные особенности в их содержании. Установлено превышение концентрации кортизола у пациентов с ВБ и НСТ. Отмечено, что у пациентов с НСТ усиление продукции кортизола почти в два раза больше, чем у пациентов с ВБ. Содержание ДГЭА-С не выявило ожидаемых статистически значимых различий у пациентов с ВБ и НСТ по сравнению с лицами группы сравнения.

Известно, что длительная гиперкортизолемиа может сопровождаться нарушением чувствительности клеток коры надпочечников к адренокортикотропному гормону и, как следствие, снижением продукции ДГЭА-С, который по своим биологическим эффектам рассматривается как антигормон по отношению к действию кортизола на различные системы организма (прежде всего, на иммунную систему и мозг) [8–10].

Отдельные авторы при некоторых заболеваниях, сопровождающихся нарушениями в ЦНС, отмечают уменьшение продукции ДГЭА-С, при этом уровень кортизола не меняется или слегка повышается, в результате чего снижается соотношение ДГЭА-С и кортизола [11]. У пациентов с НСТ по сравнению с пациентами с ВБ установлено также превышение более чем в два раза уровня пролактина, который во время стрессорного воздействия оказывает влияние на иммунную систему [12], стимулируя продукцию цитокинов, активируя Т-клеточную пролиферацию, НК-клетки, нейтрофилы, дендритные клетки [13]. Общей закономерностью для ВБ и НСТ являются снижение среднего уровня св. T_4 , IL-1 β и возрастание IL-8.

Особенность выявленных изменений для НСТ – возрастание продукции св. T_3 и снижение уровня противовоспалительного IL-10. Для пациентов с ВБ характерно усиление продукции ТТГ. Как известно [14], в регуляции выброса ТТГ участвуют T_3 и T_4 . При этом основным супрессором является T_3 , высокие

концентрации которого блокируют продукцию ТТГ, а низкие – увеличивают [15].

В работе Р.Г. Феединой и соавт. [16] показано, что уже у практически здоровых рабочих виброопасных профессий происходит значительное повышение кортизола, свидетельствующее о гиперкортизолемии, снижение T_3 и T_4 . В то же время В.С. Рукавишниковым и А.В. Лизаревым [17] показано, что с увеличением стажа работы в динамике у пациентов с ВБ отмечаются лишь незначительные их колебания в зависимости от периода обследования. В литературе имеются данные обследования рабочих, трудящихся на предприятиях машиностроительной отрасли, где неблагоприятными производственными факторами также является повышенный уровень вибрации и шума. У рабочих отмечено усиление адренокортикотропной и лютеотропной активности аденогипофиза, снижение секреции андрогенов [18].

Полученные результаты подтверждают факт того, что длительное воздействие высоких доз кортизола и пролактина способствует развитию различных нарушений в регуляции иммунной системы [19]. Так, у пациентов с ВБ высокий уровень кортизола сопровождался снижением концентрации провоспалительного IL-1 β и противовоспалительного IL-10. У пациентов с НСТ возрастание концентрации пролактина сопровождалось увеличением продукции IL-8. Следует отметить, что IL-1, являясь многофункциональным цитокином, с одной стороны, легко проникает в мозг через гематоэнцефалический барьер, индуцируя в гипоталамусе секрецию кортикотропин-рилизинг-фактора, который, в свою очередь, оказывает влияние на функциональную активность гипофиза и надпочечников. В ответ на это гипофиз стимулирует секрецию адренокортикотропного гормона, а кора надпочечников – глюкокортикоидные гормоны. С другой стороны, имеются экспериментальные доказательства, что цитокины, характеризующиеся одновременно иммуно- и нейротропным действием, продуцируются в ЦНС и могут оказывать непосредственное влияние на нервную систему [20, 21].

Установленные различия иммуно-гормональных взаимоотношений, по-видимому, могут быть обусловлены интенсивностью выработки кортизола и пролактина при ВБ и НСТ. Полученные результаты доказывают, что высокие концентрации кортизола и пролактина у пациентов с ВБ и НСТ являются важными патогенетически значимыми факторами в развитии и течении заболеваний. В результате исследований обоснованы новые информативные лабораторные показатели для выявления изменений иммуно-гормональной регуляции при НСТ: IL-4, пролактин, св. T_3 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований выявлены закономерности иммуно-гормональной регуляции при ВБ и НСТ профессионального генеза. Общей закономерностью изменений гормонального и цитокинового профилей у лиц с ВБ и НСТ являются повышение уровня кортизола, пролактина, IL-8 и снижение св. T_4 , IL-1 β . Различия выявленных изменений характеризовались для профессиональной НСТ возрастанием продукции св. T_3 и снижением противовоспалительного IL-10, а для пациентов с ВБ – усилением продукции ТТГ. Установлено, что у пациентов с ВБ высокие уровни кортизола сопровождались снижением концентрации провоспалительного IL-1 β и противовоспалительного IL-10, а у пациентов с НСТ возрастание концентрации пролактина коррелировало с усилением продукции IL-8. Выявленные особенности иммуно-гормональных взаимоотношений, по-видимому, могут быть обусловлены интенсивностью выработки кортизола и пролактина. Сохраняющиеся высокие уровни кортизола и пролактина являются важными патогенетически значимыми факторами в развитии и течении ВБ и НСТ. Обоснованы новые информативные лабораторные показатели (IL-4, пролактин, св. T_3), позволяющие расширить доказательную базу диагностики и производственную обусловленность патологического процесса при НСТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рукавишников В.С., Панков В.А., Кулешова М.В., Русанова Д.В., Картопольцева Н.В., Судокова Н.Г., Катаманова Е.В., Бодиенкова Г.М., Лизарев А.В., Кожевников В.В., Вершинина Т.Л., Потылицына С.А. Итоги и перспективы изучения профессиональных заболеваний у рабочих авиационной промышленности в Восточной Сибири. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2012; 83 (1): 105–112.
2. Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И. Нейроиммуноэндокринные взаимоотношения при воздействии локальной вибрации на рабочих. *Медицина труда и промышленная экология*. 2015; 4: 39–42.
3. Жеглова А.В., Федина И.Н. Современные подходы к проведению профилактических осмотров рабочих виброопасных профессий. *Гигиена и санитария*. 2016; 95 (11): 1048–1064. DOI: 10.18821/0016-9900-2016-95-11-1048-1051.
4. Сааркоппель Л.М., Кирьяков В.А., Ошкодеров О.А. Роль современных биомаркеров в диагностике вибрационной болезни. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017; 2: 6–10.
5. Преображенская Е.А., Сухова А.В., Ильницкая А.В., Зорькина Л.А. Сравнительная оценка диагностической чувствительности современных методов исследования слуха у рабочих «шумоопасных» профессий. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017; 2: 38–41.
6. Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Филатенкова Т.А., Дмитриенко Е.В., Каплина Э.Н. Механизмы нейромимунных взаимодействий при стрессе и подходы их коррекции. *Фундаментальные исследования*. 2013; 2–1: 120–123.
7. Goffin V., Binart N., Tourane P., Kelly P.A. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Ann. Rev. Physiol.* 2002; 64: 47–67. DOI: 10.1146/annurev.physiol.64.081501.131049.
8. Кочетков Я.А., Бельтикова К.В., Горобец Л.Н. Анаболическо-катаболический баланс при депрессии: влияние коаксала. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2006; 106 (10): 47–51.
9. Пухальский А.Л., Шмарина Г.В., Алёшкин В.А. Иммунологические нарушения и когнитивный дефицит при стрессе и физиологическом старении. *Вестник РАМН*. 2014; 5–6: 14–22.
10. Селедцова Н.В., Хонина Н.А., Пасман Н.М. и др. Роль дегидроэпиандростерона в регуляции функциональной активности иммунокомпетентных клеток: обзор литературы. *Бюллетень СО РАМН*. 2007; 1 (27): 40–46.
11. Иванова С.А., Бохан Н.А., Семке В.Я., Гусев С.И., Криковцов А.С. Стероиды и агрессия у пациентов с психическими расстройствами в условиях пенитенциарных учреждений. *Судебная и социальная психиатрия (Казахстан)*. 2008; 2 (7): 9–12.
12. Попова Е.В., Тиньков А.А., Никоноров А.А., Попова Ю.В., Караулов А.В. Влияние пролактина на иммунитет при стрессе. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2016; 1: 14–19. DOI: 10.14427/jirai.2016.1.14
13. Pearce S.H., Brabant G., Duntas L.H. et al. ETA guideline: Management of subclinical hypothyroidism. *Eur. Thyroid. J.* 2013; 2 (4): 215–228. DOI: 10.1159/000356507.
14. Строев Ю.И., Чурилов Л.П. О диагностическом значении определения тиреотропного гормона: всегда ли уровень тиреотропного гормона служит объективным критерием функции щитовидной железы? *Медицина XXI век*. 2006; 5: 58–66.
15. Шестакова Т.П. Субклинический гипотиреоз – современный взгляд на проблему. *Русский медицинский журнал «Медицинское обозрение»*. 2016; 1: 6–8.
16. Федина Р.Г., Потеряева Е.Л., Филиппова С.Н. Эндокринно-метаболические характеристики у практически здоровых мужчин-доноров и рабочих производственных виброопасных профессий. *Аллергология и иммунология*. 2017; 18 (3): 187–189.
17. Рукавишников В.С., Лизарев А.В. К обоснованию концепции «гироскопического» эффекта эндокринной системы при воздействии на организм физических факторов. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2006; 3 (49): 99–101.
18. Кирьяков В.А., Сухова А.В., Крылова И.В., Новикова А.В. Гормонально-метаболические нарушения у рабочих машиностроения. *Медицина труда и промышленная экология*. 2011; 7: 27–29.
19. Kino T., Charmandari E., Chrousos G. P. Disorders of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Handbook of Neuroendocrinology*. 2012; 1: 639–657.
20. Lynn M., MacLachlan L., Finkelmeyer A., Clark J., Locke J., Todryk S., Ng W.F., Newton J.L., Watson S. Reduction of

glucocorticoid receptor function in chronic fatigue syndrome. *Mediators of Inflammation*. 2018; 2018: 3972104. DOI: 10.1155/2018/3972104.

21. Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И., Русанова Д.В.

Роль цитокинов в развитии нарушений периферической нервной системы при вибрационной болезни. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11 (20): 58–63.

Информация об авторах

Бодиенкова Галина Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований, Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований, г. Ангарск; профессор, кафедра промышленной экологии и безопасности жизнедеятельности, Иркутский национальный исследовательский технический университет, г. Иркутск. ORCID 0000-0003-0428-3063.

Курчевенко Светлана Ивановна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований, Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований, г. Ангарск. ORCID 0000-0001-9155-1008.

(✉) **Курчевенко Светлана Ивановна**, e-mail: svetlanakurchevenko@mail.ru.

Поступила в редакцию 14.01.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Соматическая патология у жителей Ханты-Мансийского автономного округа – Югры

Верижникова Л.Н., Арямкина О.Л., Терентьева Н.Н.

*Сургутский государственный университет (СурГУ)
Россия, 628412, г. Сургут, пр. Ленина, 1*

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение 8-летней динамики соматической патологии у жителей Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (ХМАО – Югры).

Материалы и методы. Проведен анализ миграции населения Крайнего Севера, изучена динамика заболеваемости хронической неинфекционной патологией у жителей территории, приравненной к Крайнему Северу, – ХМАО – Югры. Используются данные литературы и официально регистрируемой статистики по клинико-статистическим группам за период 2010–2017 гг.

Результаты. Выявлены лидирующие группы соматической патологии в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре. Оценены показатели динамики населения территорий Крайнего Севера России.

Заключение. Полученные данные позволяют определить приоритеты для научных исследований, направленных на анализ частоты болезней внутренних органов на территориях, приравненных к Крайнему Северу, особенностей их течения и исходов, а также разработку эффективных программ первичной и вторичной профилактики этих заболеваний.

Ключевые слова: Крайний Север, заболеваемость, соматическая патология, метаболический синдром, стеатогепатит, болезни органов дыхания, болезни пищеварительной системы, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, описторхоз.

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: Вержникова Л.Н., Арямкина О.Л., Терентьева Н.Н. Соматическая патология у жителей Ханты-Мансийского автономного округа – Югры. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 13–19. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-13-19>.

Somatic pathology in residents of Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Yugra

Verizhnikova L.N., Aryamkina O.L., Terentyeva N.N.

*Surgut State University
1, Lenina Av., Surgut, 628412, Russian Federation*

ABSTRACT

Aim. To study the 8-year dynamics of somatic pathology in residents of the Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Yugra.

Materials and methods. The article analyzes the migration of the population of the Far North and the dynamics of the incidence of chronic non-infectious pathology among residents of territories equated to the Far North – the Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Yugra, based on literature data and officially registered statistics for clinical and statistical groups for the period 2010–2017.

Results. The analysis revealed the leading groups of somatic pathology in the Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Yugra. The indicators of population dynamics of the territories of the Far North of Russia were estimated.

Conclusions. The study identified patterns in different flows of the Russian population in and from the North, the incidence rate (defined by the leading group of diseases) and its dynamics, characteristic of the territories equated to the Far North. The obtained data make it possible to identify priority research areas aimed at analyzing the frequency of diseases of internal organs in the territories equated to the Far North, the features of their course and outcomes as well as to develop effective programs of primary and secondary prevention of these diseases.

Key words: Far North, morbidity, somatic pathology, metabolic syndrome, steatohepatitis, respiratory diseases, diseases of the digestive system, hypertension, coronary heart disease, opisthorchiasis.

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 claim that they received no funding for the study.

For citation: Verizhnikova L.N., Aryamkina O.L., Terentyeva N.N. Somatic pathology in residents of Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Yugra. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 13–19. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-13-19>.

ВВЕДЕНИЕ

Проблемы, связанные со здоровьем населения Земли, обусловлены множеством факторов, в первую очередь генетических и экологических. Особое значение при оценке здоровья человека имеет понимание степени влияния климато-географических (в первую очередь холода и повышенной геомагнитной активности) и техногенных факторов. В связи с миграцией населения в экономически развитые регионы мира, а также в районы Крайнего Севера и приравненные к нему территории необходим контроль за состоянием здоровья как коренного населения, так и прибывшего [1].

Северные территории занимают 20% Земли, и только в 11 субъектах Российской Федерации на данных территориях (за 60-й параллелью) проживает 7,4% населения [2]. Все возрастающий интерес к северным территориям объясним богатством полезных ископаемых (газ, нефть, алмазы и т.д.), а также активно развивающейся добывающей промышленностью.

Миграция в большинстве регионов Крайнего Севера и приравненных к ним территорий обусловлена урбанизацией (частичной или полной) коренных малочисленных народов Севера, а также перемещением трудоспособного населения страны для работы в национальных и международных корпорациях из благополучных климатических условий жизни в неблагоприятные и сложные [2–4]. Миграционные процессы сложны как для первой, так и для второй

категории населения в связи с развивающимися процессами дезадаптации организма человека, характеризующиеся напряженностью и перестройкой гомеостаза [4, 5].

Проблема жизнедеятельности человека в северных широтах определяется выживаемостью в экстремальных ситуациях, необходимостью сохранить здоровье в сложном взаимодействии новых техногенных, экологических, социальных, психологических факторов [3, 6, 7]. Немаловажную роль играет изменение характера питания, особенно малочисленных коренных народов Севера, привычных к своим веками сложившимся стереотипам и культурам [1, 4, 7].

С учетом того, что в условиях Севера риск развития заболеваний внутренних органов значительно повышается [7–10], в рамках парадигмы медицины, основанной на принципах «5-П», представляется чрезвычайно важной разработка мероприятий, направленных на улучшение качества и увеличение продолжительности жизни человека, проживающего в нетипичных и в экстремальных условиях [11, 12].

Клиническая эпидемиология, как инструмент «медицины, основанной на доказательствах», позволяет объективно оценить ситуацию с неинфекционной патологией, доминирующей в структуре смертности, и, в конечном итоге, обосновать мероприятия по направленной коррекции негативных воздействий в группах повышенного риска [6, 12, 13].

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования явилось изучение в сравнительном

аспекте параметров и структуры наиболее распространенной соматической патологии у жителей Ханты-Мансийского автономного округа – Югры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методом сплошной выборки за период 2010–2017 гг. проанализированы демографические параметры и показатели заболеваемости жителей ХМАО – Югры. Используются данные официальной статистики по демографическим показателям (численность и миграция населения России) [14] и сборников, подготовленных специалистами Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации и ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, утвержденных Министерством здравоохранения Российской Федерации. В основу формирования клинко-статистических групп легли официальные отчетные статистические формы № 12 «Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у больных, проживающих в районе обследо-

вания лечебного учреждения» и № 14 «Сведения о деятельности стационара».

Проанализирована динамика наиболее важных параметров заболеваемости, в том числе среднеголетних по соматическим системам органов и систем. Исследование проведено в рамках темы НИР кафедры внутренних болезней СурГУ, утвержденной 24.06.2019 г. (в ЕГИСУ НИОКТР зарегистрирована инициативная тема НИОКТР «Предикторы генеза развития, течения и исходов хронических и коморбидно протекающих заболеваний», № ААА-А-19-119062490051-6).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ динамики движения миграционных потоков из Центральной России в северные регионы и обратно позволяет оценить демографическую ситуацию в стране. На 01.01.2018 г. в Российской Федерации проживало 146 880 432 человека. На 26 местностях, являющихся регионами Крайнего Севера, и на территориях, приравненных к ним, проживало 9 920 891 человек, или 6,75% от всего населения страны, или каждый 14–15-й житель (табл. 1).

Таблица 1

Показатели числа жителей и миграционные тренды территорий Крайнего Севера и местностей, приравненных к ним, в 2018 г., абс.*					
№	Регион	Численность населения на 01.01.2018 г.	Общий прирост	Естественный прирост	Миграционный прирост
Районы Крайнего Севера и местности, приравненные к ним, всего		9 920 891	-37 895	12 975	-50 870
1	Республика Алтай	30 762	213	446	-233
2	Республика Бурятия	94 897	-1 283	120	-1 403
3	Республика Карелия	622 484	-4 428	-3 108	-1 320
4	Республика Коми	840 873	-10 638	-1 362	-9 276
5	Республика Саха (Якутия)	964 330	2 679	5 619	-2 940
6	Республика Тыва	321 722	2 701	3 681	-980
7	Забайкальский край	21 041	-440	-13	-427
8	Камчатский край	315 557	-834	-132	-702
9	Красноярский край	439 276	-133	1 201	-1 334
10	Пермский край	28 387	-393	-77	-316
11	Приморский край	99 173	-1 676	-687	-989
12	Хабаровский край	515 285	-5 610	-2 064	-3 546
13	Амурская область	94 690	-1 380	-297	-1 083
14	Архангельская область, включая Ненецкий АО	1 155 028	-10 909	-3 816	-7 093
15	Ненецкий АО	43 997	-168	224	-392
16	Архангельская область без АО	1 111 031	-10 741	-4 040	-6 701
17	Иркутская область	534 792	-6 712	-1 772	-4 940
18	Магаданская область	144 091	-2 857	-194	-2 663
19	Мурманская область	753 557	-5 501	-1 099	-4 402
20	Сахалинская область	490 181	-543	-219	-324
21	Томская область	192 620	-2120	-190	-1 930
22	Тюменская область, включая АО	2 212 797	11 654	16 860	-5 206
23	ХМАО – Югра	1 655 074	8 721	12 145	-3 424

Окончание табл. 1

№	Регион	Численность населения на 01.01.2018 г.	Общий прирост	Естественный прирост	Миграционный прирост
24	Ямало-Ненецкий АО	538 547	2 932	4 667	-1 735
25	Тюменская область без АО	19 176	1	48	-47
26	Чукотский АО	49 348	315	78	237

Примечание. АО – автономный округ (здесь и в табл. 2).

* http://www.rosstat.gov.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/publications/catalog/doc_1140096034906

Из официальных данных Росстата видно, что в 25 регионах из 26 отмечается преимущественно отрицательная миграционная статистика, и лишь в каждом втором (на 12 (46,2%) территориях) – позитивная динамика с естественным приростом населения. Анализируя миграционные процессы в 11 субъектах

Российской Федерации – в регионах Крайнего Севера – можно отметить, что в 10 из них установлен отток населения. В 2018 г. на Крайний Север России прибыло 271 384 человека, а выбыло 305 382, и миграционная убыль населения составила 33 998 человек (табл. 2).

Таблица 2

Миграция населения в регионах Крайнего Севера в 2018 г.*				
№	Регион	Число прибывших	Число убывших	Динамика, %
1	Республика Карелия	22 161	23 331	-1,05
2	Республика Коми	31 695	40 484	-1,28
3	Ненецкий АО	2 309	2 566	-1,11
4	Мурманская область	35 460	39 866	-1,12
5	ХМАО – Югра	66 390	72 549	-1,09
6	Ямало-Ненецкий АО	30 549	34 211	-1,12
7	Республика Тыва	12 307	13 406	-1,09
8	Республика Саха (Якутия)	39 226	44 404	-1,13
9	Магаданская область	6 629	8 707	-1,31
10	Сахалинская область	19 383	20 769	-1,07
11	Чукотский АО	5 275	5 089	1,04
	Итого	271 384	305 382	-33 998

* http://www.rosstat.gov.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/publications/catalog/doc_1140096034906

В 2018 г. из 11 северных территорий России наиболее привлекательными оказались Сахалинская область, ХМАО – Югра и Республика Тыва, из которых уехали 1,07–1,09% населения (см. табл. 2). Наибольшее число обратных мигрантов отмечено в Республике Коми – 8 789 (1,28%) и наименьшее – в Чукотском АО, из которого выехали лишь 186 человек (+1,04%). На 01.01.2018 и на 01.01.2019 в ХМАО – Югре проживали 1 655 074 и 1 663 795 человек соответственно с общим приростом населения в 1,5%. В ХМАО – Югре проживает 1,14% всего населения России (данные на 01.01.2019), это преимущественно молодые люди в возрасте 34–39 лет.

В силу общности климато-географических и экологических особенностей всех северных территорий результаты изучения эпидемиологических показателей на одной из них могут быть экстраполированы на все северные территории России и мира. При этом особое значение имеет длительность проживания человека в условиях Севера, так как мигрирующие на иные климатические территории люди исходно об-

ременены хроническими соматическими заболеваниями [3].

В ХМАО – Югре показатель смертности в целом ниже, чем в других регионах страны, но в когорте трудоспособного возраста он достигает 73,5% от общего числа всех смертей, что диктует необходимость детального изучения причин развития данной ситуации и разработки организационных мероприятий деятельности практического здравоохранения [3, 9, 13].

Изучая официально регистрируемые показатели заболеваемости в России и на территориях Тюменской области, из которых ХМАО – Югра является регионом Крайнего Севера, мы получили следующие данные. По уровню среднемноголетних показателей общей заболеваемости населения ХМАО – Югра в целом не отличался от других субъектов (рис. 1). Однако на территории Севера регистрируется прогрессивный рост заболеваемости системы органов дыхания людей, несмотря на их молодой возраст (рис. 2). А общая заболеваемость населения ХМАО – Югры

выше, чем среди населения Уральского федерального округа (УрФО) и Тюменской области без учета АО (см. рис. 1).

Сравнивались региональные показатели заболеваемости с показателями в России, УрФО и Тюменской области без учета населения АО. Анализируя состояние здоровья населения ХМАО – Югры, нами выявлены следующие факты.

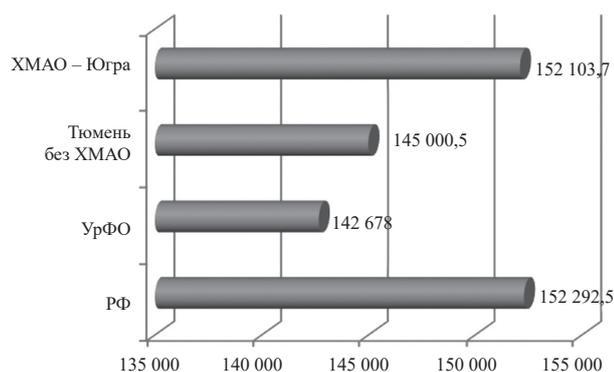


Рис. 1. Средневзвешенные показатели общей заболеваемости населения за период 2010–2018 гг. (на 100 тыс. населения): УрФО – Уральский федеральный округ, РФ – Российская Федерация (здесь и в рис. 2–6)

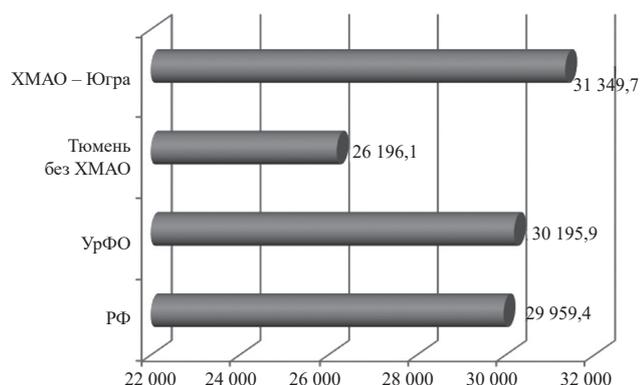


Рис. 2. Средневзвешенные показатели патологии системы органов дыхания за период 2010–2018 гг. (на 100 тыс. населения)

За 8-летний период среднепогодные (средневзвешенные) параметры заболеваемости в пересчете на 100 тыс. населения на сравниваемых территориях варьировали от 142 678 до 152 292,5 [5]. При этом в ХМАО – Югре, несмотря на невысокий средний возраст, общая заболеваемость мало отличалась от показателя по РФ и на 9 425,7 превышала его по сравнению с УрФО, 7 103,2 – с Тюменской областью. Кроме того, заболеваемость имеет более высокие темпы роста, в том числе при сравнении с общей заболеваемостью в Российской Федерации (см. рис. 1).

Среди соматической патологии лидируют заболевания органов дыхания, сердечно-сосудистой си-

стемы, органов пищеварения, эндокринной системы, что согласуется с данными литературы [2].

С 2010 г. болезни органов дыхания в ХМАО – Югре преобладают над аналогичными показателями в России, не говоря уже о показателях в Тюменской области и УрФО, с ежегодным прогрессивным увеличением, начиная с 2013 г. В ХМАО – Югре сердечно-сосудистая заболеваемость оказалась наименьшей по сравнению с другими регионами и Россией. Отмечается нестабильность числа новых случаев болезней сердечно-сосудистой системы в разные годы (рис. 3).

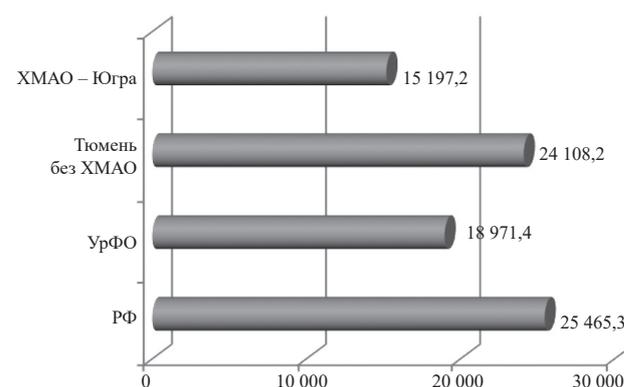


Рис. 3. Средневзвешенные показатели заболеваемости патологии сердечно-сосудистой системы за период 2010–2018 гг. (патология сердечно-сосудистой системы на 100 тыс. населения)

Патология сердечно-сосудистой системы представлена в подавляющем большинстве артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца. Некоронарогенные заболевания миокарда и перикардит встречаются значительно реже, как и острая ревматическая лихорадка. Вместе с тем высоки показатели заболеваемости атеросклерозом различных локализаций, официально регистрируемых в других группах патологий и инфекционным эндокардитом.

Патология органов пищеварения встречается значительно чаще в ХМАО – Югре, чем в УрФО и Тюменской области, а также имеет прогрессивные темпы роста (рис. 4). Это объяснимо широкой распространенностью описторхоза в Обь-Иртышском бассейне [14]. При этом рост заболеваемости стеатогепатитом и кардиоваскулярной патологией в рамках сердечно-сосудистого континуума, а также гипертонической болезнью, формирующей парадигму метаболического синдрома [15], подтверждается динамикой заболеваемости сахарным диабетом 2-го типа и ожирением у населения ХМАО – Югры (рис. 5).

Больше, чем в России в целом, больных сахарным диабетом 2-го типа также в УрФО и Тюменской области, что может быть маркером метаболического синдрома жителей Приуралья, Севера и приравненных к нему территорий.

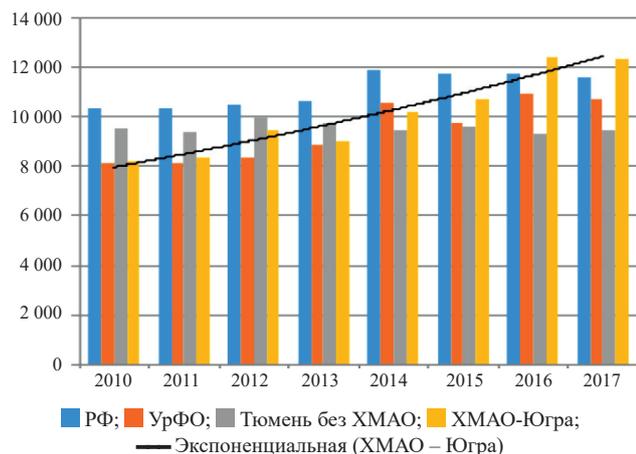


Рис. 4. Динамика показателей заболеваемости в ХМАО – Югре и других регионах России за период 2010–2018 гг. (патология пищеварительной системы на 100 тыс. населения)

Ожирение одинаково часто встречается в УрФО, на Крайнем Севере и в Тюменской области, однако число лиц с ожирением в этих территориях все же выше, чем в России (рис. 6). Данный показатель у жителей Тюменской области и ХМАО – Югры, несмотря на молодой трудоспособный возраст и большие миграционные потоки, характеризует прогрессивный темп роста заболеваемости, что видно из представленных данных по линиям тренда.

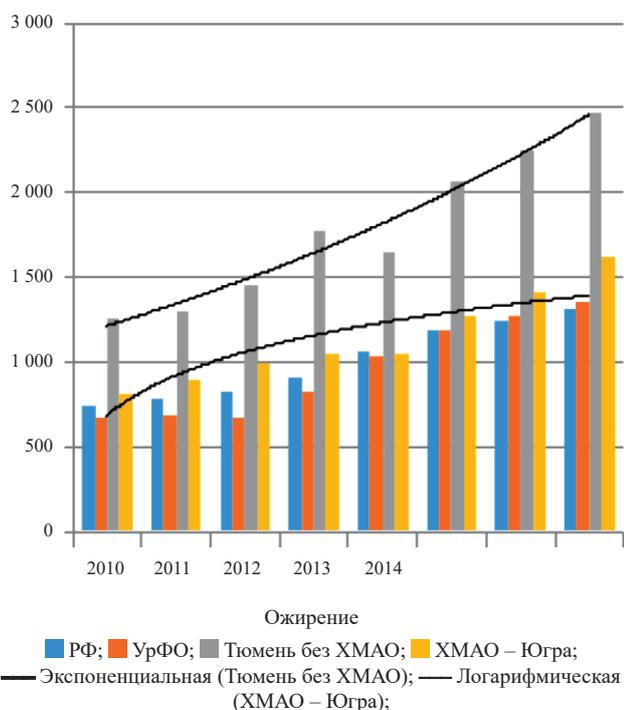


Рис. 6. Динамика показателей заболеваемости ожирением населения ХМАО – Югры за период 2010–2018 гг. (на 100 000 населения)

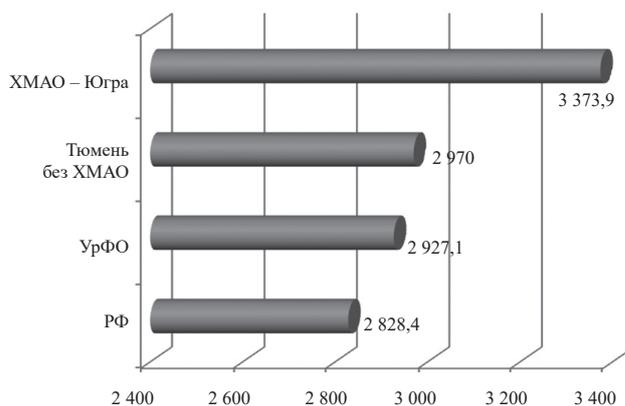


Рис 5. Средневзвешенные показатели заболеваемости сахарным диабетом 2-го типа за период 2010–2018 гг. (на 100 тыс. населения)

Таким образом, на территории ХМАО – Югры с минимальным оттоком населения только в 2018 г., при молодом возрасте жителей, сопоставимых с Россией параметрах общей заболеваемости регистрируется рост метаболических расстройств, в первую очередь ожирения и сахарного диабета 2-го типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами проанализирована заболеваемость по основным классам патологий внутренних органов у лиц, проживающих на экономически развитых территориях России, приравненных к Крайнему Северу. ХМАО – Югра привлекает наибольшее число мигрантов со всей страны, тогда как из округа уезжает наименьшее число людей. В регионе отмечается наибольшая и прогрессирующая заболеваемость в первую очередь болезнями органов дыхания и патологиями, составляющими метаболический синдром – сахарный диабет и ожирение. В ХМАО – Югре наибольшее число заболевших сахарным диабетом 2-го типа, ожирением и болезнями органов пищеварения, в частности, стеатогепатитом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпин В.А., Гудков А.Б., Усынин А.Ф., Столяров В.В., Шуленин К.С. Воздействие территориальной неоднородности земной коры на заболеваемость жителей северной урбанизированной территории. *Экология человека*. 2018; 12: 20–25.
2. Зайченко И.М., Ищенко Е.А. Анализ трудовых ресурсов регионов Крайнего Севера России. *Россия в глобальном мире*. 2016; 9 (32): 232–241.
3. Писарева Л.Ф., Ляхова Н.П., Одинцова И.Н., Перинов Д.А., Чемитдоржиева Т.Н., Шухоева Е.А. Демографическая характеристика Республики Бурятия. *Бюллетень сибирской*

- медицины. 2015; 14 (3): 23–29. DOI: 10.20538/1682-0363-2015-3-23-29.
4. Ананенков А. Г., Ставкин Г.П., Андреев О.П. Социальные аспекты технического регулирования вахтового метода работы в условиях Крайнего Севера. М.: Недра, 2005: 256.
 5. Александрова Г.А. Российский статистический ежегодник 2018. М., 2018: 694. URL: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2017-god>.
 6. Ершов Е.В., Бабенко А.И., Понич Е.С., Хаснулин В.И. Система мониторинга состояния здоровья работников газодобывающего предприятия на Крайнем Севере. *Бюллетень СО РАМН*. 2008; 2 (130): 57–62.
 7. Foukal P., North G., Wigley T. Climate. A stellar view on solar variations and climate. *Science*. 2004; 306 (5693): 68–69. DOI: 10.1126/science.1101694.
 8. Кладов С.Ю., Конобеевская И.Н., Карпов Р.С. Алкоголь и преждевременная смертность населения Томской области. *Бюллетень сибирской медицины*. 2010; 9 (1): 126–129. DOI: 10.20538/1682-0363-2010-1-126-129.
 9. Луценко М.Т., Пирогов А.Б. Хронические заболевания легких в условиях Севера России. *Фундаментальные исследования*. 2012; 4 (1): 74–79.
 10. Зенченко Т.А., Димитрова С., Стоилова И., Бреус Т.К. Индивидуальные типы реакций артериального давления практически здоровых людей на геомагнитную активность. *Клиническая медицина*. 2009; 4 (87): 18–23.
 11. Никитин Ю.П., Хаснулин В.И., Гудков А.Б. Современные проблемы северной медицины и усилия ученых по их решению. *Вестник Северного (арктического) федерального университета. Серия: медико-биологические науки*. 2014; 3: 63–72.
 12. Хаснулин В.И., Артамонова М.В., Хаснулин П.В. Реальное состояние здоровья жителей высоких широт в неблагоприятных климатогеографических условиях Арктики и показатели официальной статистики здравоохранения. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 9-1: 68–73.
 13. Даренская М.А., Колесникова Л.И., Рычкова Л.В., Гребенкина Л.А., Храмова Е.Е., Колесников С.И. Показатели метаболического статуса у подростков тофаларов, представителей малого коренного этноса Восточной Сибири. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (2): 31–40. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-2-31-40.
 14. Федорова О.С., Ковширина Ю.В., Ковширина А.Е., Федотова М.М., Деев И.А., Петровский Ф.И., Филимонов А.В., Дмитриева А.И., Кудяков Л.А., Салтыкова И.В., Михалев Е.В., Одерматт П., Огородова Л.М. Анализ заболеваемости инвазией *Opisthorchis felinus* и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы в Российской Федерации. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 147–158. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-5-147-158.
 15. Головач Е.А., Федорова О.С., Саприна Т.В., Иванов В.В., Перина Е.А., Ковширина Ю.В., Огородова Л.М. Метаболический синдром, нарушения углеводного и липидного обмена при гельминтозах: обзор современных данных. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (4): 187–198. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-187-198.

Вклад авторов

Верижникова Л.Н. – разработка дизайна и интерпретация данных. Арямкина О.Л. – проверка интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации. Терентьева Н.Н. – разработка дизайна и интерпретация данных.

Сведения об авторах

Верижникова Людмила Николаевна, ст. преподаватель, кафедра внутренних болезней, СурГУ, г. Сургут. ORCID 0000-0002-7397-7048.

Арямкина Ольга Леонидовна, д-р мед наук, профессор, зав. кафедрой внутренних болезней, СурГУ, г. Сургут. ORCID 0000-0002-0149-6103.

Терентьева Надежда Николаевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра внутренних болезней, СурГУ, г. Сургут. ORCID 0000-0002-0462-3526.

(✉) **Верижникова Людмила Николаевна**, e-mail: x218am@mail.ru.

Поступила в редакцию 27.11.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Структурно-функциональные показатели мембран эритроцитов крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли и стадией злокачественного процесса

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

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

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить структурно-функциональные показатели мембран эритроцитов в крови больных раком желудка (РЖ) при аденокарциноме, в зависимости от степени ее дифференцировки, при перстневидноклеточном раке (ПКР) и сочетанном поражении желудка (СПЖ).

Материалы и методы. Оценивали текучесть мембран в области липидного бислоя и белок-липидных контактов, полярность липидного бислоя и погруженность белков в липидный матрикс мембраны в эритроцитах крови с использованием гидрофобного зонда пирена флуориметрическим методом. В исследование было включено 86 больных РЖ, в зависимости от гистотипа разделенных на шесть групп: G1-2, G3, ПКР, СПЖ, G4 + ПКР и G4 + G2-3. Отдельно были проанализированы результаты исследования у больных с прорастанием опухоли в серозную оболочку и распространением на соседние структуры (T4 по системе классификации TNM) и у больных, находившихся в IV стадии.

Результаты. Во всех группах больных РЖ установлено увеличение текучести мембран, более выраженное в зоне белок-липидных контактов, но наблюдавшееся и в липидном бислое. При этом текучесть возрастала по мере снижения степени дифференцировки аденокарциномы и была максимальной при наличии в опухоли желудка недифференцированных клеток: выше, чем в группе здоровых, на 93,8% в зоне белок-липидных контактов и на 54,1% в липидном бислое. Наблюдалось также повышение полярности липидной фазы, наиболее выраженное (на 7–8%, $p = 0,002–0,003$) у больных аденокарциномой с наличием недифференцированных клеток и при IV стадии процесса. Изменение погруженности белков в липидный матрикс эритроцитов было менее характерно для РЖ по сравнению с другими раками (молочной железы, легкого, онкогинекологической патологией).

Заключение. Изменение структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов отражает состояние процесса у больных раком желудка и может иметь значение для прогнозирования течения заболевания и успешности лечения.

Ключевые слова: рак желудка, различные гистотипы опухоли и стадии процесса, мембраны эритроцитов, текучесть, полярность, погруженность белков, флуоресцентный зонд пирен.

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

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках госзадания Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен советом по этике ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» (протокол № 11/1 от 03.11.2016).

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

Для цитирования: Горошинская И.А., Немашкалова Л.А., Франциянц Е.М., Сурикова Е.И., Медведева Д.Е., Маслов А.А. Структурно-функциональные показатели мембран эритроцитов крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли и стадией злокачественного процесса. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 20–27. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-20-27>.

Structural and functional indicators of erythrocyte membranes in gastric cancer patients with different histotypes of the tumor and stages of the malignant process

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

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

ABSTRACT

The purpose was to study the structural and functional parameters of erythrocyte membranes in the blood of patients with gastric cancer (GC) – adenocarcinoma, depending on its grade, signet ring cell carcinoma (SRCC), and combined gastric lesions (CGL).

Materials and methods. The membrane fluidity in the area of the lipid bilayer and protein-lipid contacts, the polarity of the lipid bilayer and the immersion of proteins in the lipid matrix of the membrane in red blood cells were evaluated by fluorimetry using the hydrophobic pyrene-based probe. The study included 86 patients with GC divided into six groups: well- and moderately-differentiated adenocarcinoma (G1-2); poorly-differentiated adenocarcinoma (G3); SRCC; CGL and two groups of patients with a component of undifferentiated cancer: G4 + SRCC and G4 + G2-3. The results of the study were also analyzed in patients with serosal invasion and the spread to adjacent structures (T4 according to the TNM classification of malignant tumors) and in patients with stage IV disease.

Results. In all groups of GC patients, an increase in the membrane fluidity was observed. It was more pronounced in the zone of protein-lipid contacts, but it was also observed in the lipid bilayer. The membrane fluidity increased together with the grade of adenocarcinoma and was maximal when there were undifferentiated cells in stomach tumors, reaching 93.8% in the zone of protein-lipid contacts and 54.1% in the lipid bilayer, compared with healthy people (20 donors). An increase in the polarity of the lipid phase was also observed; it was most pronounced (by 7–8%, $p = 0.002–0.003$) in adenocarcinoma patients with undifferentiated cells and with stage IV disease. A change in the immersion of proteins in the lipid matrix of erythrocytes was less characteristic of GC, compared with other cancers (breast, lung tumors, gynecological oncopathology, etc.).

Conclusions. Changes in the structural and functional properties of erythrocyte membranes reflect the state of the disease in patients with gastric cancer and may be important for predicting the course of the disease and the success of treatment.

Key words: gastric cancer, various tumor histotypes and cancer stages, erythrocyte membrane, fluidity, polarity, protein immersion, pyrene-based fluorescent probe.

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

Source of financing. This work was carried out as part of the state assignment of Rostov Research Institute of Oncology.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study protocol was approved by the Ethics Council of Rostov Research Institute of Oncology (Protocol No. 11/1, of November 3, 2016).

For citation: Goroshinskaya I.A., Nemashkalova L.A., Frantsiyants E.M., Surikova E.I., Medvedeva D.E., Maslov A.A. Structural and functional indicators of erythrocyte membranes in gastric cancer patients with different histotypes of the tumor and stages of the malignant process. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 20–27. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-20-27>.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным современной липидомики, мембранные липиды играют важную роль в реализации многих клеточных функций и участвуют в развитии ряда патологий, в том числе рака [1]. Выявленные особенности состава различных мембран (наружный и внутренний слой внешней мембраны, мембраны оргanelл) опухолевых клеток при разных типах рака и стадиях открывают возможности для новых терапевтических стратегий в лечении и профилактике рака [2].

К числу неспецифических нарушений гомеостаза, развивающихся в результате действия опухоли на организм, относятся изменения структурно-функциональных свойств мембран клеток периферической крови, в первую очередь эритроцитов [3, 4]. При болезнях различного генеза эритроциты претерпевают как специфические, так и неспецифические структурно-функциональные и метаболические перестройки, поэтому при изучении различных физиологических процессов и патологических состояний их рассматривают как универсальную клеточную модель, отражающую изменения в организме [5]. Предполагается, что исследование функционального состояния мембран эритроцитов у больных раком очень важно для ранней диагностики заболевания и мониторинга успешности проводимого лечения [6]. К данному заключению авторы пришли на основе изучения диэлектрической проницаемости, определяемой структурными изменениями мембран, в эритроцитах 28 здоровых доноров и 62 пациентов с раком молочной железы и легких.

Исследование мембран с помощью флуоресцентных зондов позволяет получить важную информацию о структурном состоянии мембран. Параметры флуоресценции зонда, введенного в мембрану, зависят от физико-химических свойств его непосредственного микроокружения в мембранах: текучести, полярности среды, близости заряженных групп, наличия различных молекул-акцепторов, энергии электронного возбуждения, диффузии молекул – тушителей флуоресценции [7, 8]. Использование гидрофобного зонда пирена дает возможность оценить текучесть мембран клеток крови в зонах белок-липидных контактов и липидного бислоя, полярность и погруженность белков в липидный матрикс. Текучесть является комплексным показателем, отражающим как структуру, так и основные свойства липидной составляющей мембран и зон белок-липидных взаимодействий, ей принадлежит ключевая роль в регуляции всех процессов, протекающих в клеточных мембранах. Текучесть характеризует не только состояние мембран, но и их способность реа-

гировать на изменения, происходящие в организме в ответ на развитие злокачественного процесса и воздействие химиопрепаратов [1, 9–11]. Доказано, что индукция апоптоза многими противоопухолевыми агентами связана с изменением текучести мембран опухолевых клеток под их влиянием [12]. Полярность липидного бислоя отражает состояние гидрофобной фазы мембраны, уровень в ней гидрофильных кластеров, образующихся гидроперекисями. Оценка погруженности белков в липидный матрикс позволяет судить об ассоциации белков с мембранами, а также об олигомеризации мембранных белков, одной из причин которой может быть их окислительная модификация [8].

Целью данной работы явилась оценка структурно-функциональных показателей мембран эритроцитов в крови больных раком желудка (РЖ) при аденокарциноме, в зависимости от степени ее дифференцировки, при перстневидноклеточном раке (ПКР) и сочетанном поражении желудка (СПЖ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 86 больных раком желудка, ранее не получавших лечения. Средний возраст пациентов составил 62 года ($61,9 \pm 1,2$). В зависимости от гистотипа опухоли больные были разделены на шесть групп: 1) высоко- и умеренно дифференцированная аденокарцинома (G1-2) – 24 человека, 16 мужчин и 8 женщин; 2) низкодифференцированная аденокарцинома (G3) – 15 больных, 10 мужчин и 5 женщин; 3) ПКР – 19 человек, 10 мужчин и 9 женщин; 4) СПЖ – аденокарцинома с наличием перстневидноклеточных фрагментов – 15 больных, 14 мужчин и 1 женщина; 5) больные с наличием недифференцированных клеток и перстневидноклеточных фрагментов (G4 + ПКР) – 5 человек, 3 мужчин и 2 женщины; 6) больные с наличием недифференцированных клеток при аденокарциноме желудка (G4 + G2-3) – 8 человек, 6 мужчин и 2 женщины.

В группе G1-2 в 92% случаев была выявлена умеренно дифференцированная аденокарцинома. Кроме того, отдельно были проанализированы результаты исследования у больных с прорастанием опухоли в серозную оболочку и распространением на соседние структуры (T4 по системе классификации TNM) и у больных, находившихся в IV стадии. Данные, полученные в крови больных, сравнивались со значением соответствующих показателей в группе относительно здоровых мужчин и женщин без онкопатологии, средний возраст которых сопоставим с возрастом обследованных больных (группа доноров – 20 человек). У всех больных было получено информированное согласие на использо-

вание биологического материала для научных исследований.

Эритроциты получали центрифугированием гепаринизированной крови в течение 15 мин при 1 500 об./мин с последующим трехкратным промыванием физиологическим раствором, забуференным фосфатным буфером (рН 7,4), и центрифугированием при 3 000 об./мин, 10 мин, при 4 °С. В эритроцитах крови больных РЖ оценивали структурно-функциональные показатели мембран с использованием флуоресцентного зонда пирена ($C_{16}H_{10}$, $M = 202,3$; Serva, США), определяя текучесть мембран в области липидного бислоя и белок-липидных контактов, полярность липидного бислоя и погруженность белков в липидный матрикс мембраны по методу Ю.А. Владимирова и Г.Е. Добрецова (1980) [7] на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (Россия).

Метод определения текучести мембран основан на способности флуоресцентного зонда пирена эксимеризоваться в неполярной среде. Текучесть липидного бислоя мембран прямо пропорциональна коэффициенту эксимеризации пирена F_{λ}/F_M , определяемому отношением величины пика флуоресценции эксимера пирена F_{λ} (в относительных ед. флуоресценции при λ исп. = 470 нм) к пику флуоресценции мономера F_M (в относительных ед. флуоресценции при λ исп. = 393 нм) при λ возб. = 334 нм.

Текучесть белок-липидных контактов определяли по соотношению интенсивности флуоресценции эксимера и мономера пирена при λ возб. = 282 нм. В основе метода лежит способность пирена перехватывать с ароматических остатков белка энергию поглощенного света в пределах расстояния, называемого радиусом Ферстера. Полярность липидной фазы мембран оценивали по соотношению интенсивностей флуоресценции двух мономерных форм F_{372}/F_{393} в тонкой структуре спектра пирена при λ возб. = 334 нм. Степень погружения белков в липидный бислой определяли по тушению флуоресценции ароматических аминокислотных остатков (тирозина и триптофана) в результате безизлучательного переноса энергии на молекулу пирена. Для измерения погруженности белков суспензию эритроцитов флуориметрировали при λ возб. = 282 нм и λ исп. = 330 нм. Затем после 1-минутного инкубирования с пиреном снова измеряли интенсивность флуоресценции пробы. Высота пика флуоресценции в этом случае F была меньше, чем при первом измерении F_0 , благодаря тушению пиреном триптофановой флуоресценции. Определяли эффективность переноса энергии с триптофанилов на пирен, равную величине $F_0 - F$.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США) по t -критерию Стьюдента для

двух независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$, а при $0,1 > p > 0,05$ – на уровне статистической тенденции к значимости. Предварительно проводили проверку выборок на соответствие нормальному распределению по W -критерию Шапиро – Уилка и критерию Колмогорова – Смирнова. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании состояния мембран эритроцитов во всех группах больных РЖ было обнаружено увеличение их текучести по сравнению с уровнем у доноров как в зоне белок-липидных контактов, так и в липидном бислое (таблица). Лишь у больных с G1-2 текучесть была увеличена только в зоне белок-липидных контактов на 31,1%. У больных с низкодифференцированной аденокарциномой прирост показателя относительно здоровых составил в зоне белок-липидных контактов составил 52,3%, в липидном бислое – 36,6%, что было выше, чем у больных с G1-2 на 30,2% ($p = 0,054$). Увеличение распространенности аденокарциномы (Т4) значимо не влияло на уровень текучести – она была повышена в зоне белок-липидных контактов на 38,5% ($p < 0,001$), а в липидном бислое наблюдалась тенденция к повышению на 19,5%. Наиболее выраженное повышение текучести эритроцитарных мембран было выявлено у больных аденокарциномой с наличием недифференцированных клеток (G4 + G2-3): на 93,8% в зоне белок-липидных контактов и на 54,1% в липидном бислое относительно здоровых, что статистически значимо превышало уровень у больных с G1-2 на 47,8 и 46,9% ($p < 0,05$) соответственно. При ПКР и сочетанном поражении текучесть была повышена в зоне белок-липидных контактов на 36–38%, а в липидном бислое – на 17,2–21,5%. При наличии недифференцированных клеток у больных ПКР повышение текучести относительно здоровых составило 51,9 и 34% соответственно. Максимально высоким оказалось повышение текучести липидного бислоя мембран у больных с IV стадией процесса – на 62,4%, при этом в зоне белок-липидных контактов показатель был увеличен на 32,3%.

Увеличение текучести мембран почти во всех группах сопровождалось повышением полярности их липидной фазы. Статистически значимое увеличение полярности выявлено у больных с умеренно дифференцированной аденокарциномой – на 3,9%, при распространенной форме аденокарциномы (Т4) – на 4,6%, сочетанном поражении – на 5,1%. Наибольшее повышение полярности зафиксировано у больных аденокарциномой с наличием недифференцированных клеток – на 7,1% и при IV стадии процесса – на 7,8%.

Структурно-функциональные показатели мембран эритроцитов крови больных раком желудка с разной гистологией и стадией злокачественного процесса, у.е. флуоресценции, $M \pm m$				
Показатель	Текучесть мембран в зоне		Полярность липидной фазы мембран	Погруженность белков в липидный матрикс
	белок-липидных контактов	липидного бислоя		
Здоровые, $n = 20$	$0,405 \pm 0,010$	$0,303 \pm 0,015$	$1,422 \pm 0,013$	$0,203 \pm 0,005$
Больные с аденокарциномой G1-2, $n = 24$	$0,531 \pm 0,028$ $p < 0,001$	$0,318 \pm 0,017$ $p_{IV} = 0,011$	$1,477 \pm 0,017$ $p = 0,013$	$0,204 \pm 0,012$ $p_{IV} = 0,050$
Больные с аденокарциномой G3, $n = 15$	$0,617 \pm 0,057$ $p < 0,001$	$0,414 \pm 0,053$ $p = 0,017$ $p_1 = 0,054$	$1,448 \pm 0,024$	$0,199 \pm 0,017$ $p_{IV} = 0,082$
Больные с ПКР, $n = 19$	$0,551 \pm 0,021$ $p < 0,001$	$0,355 \pm 0,016$ $p = 0,020$ $p_{IV} = 0,040$	$1,454 \pm 0,018$ $p_{IV} = 0,078$	$0,198 \pm 0,017$ $p_{IV} = 0,086$
Больные с сочетанным поражением желудка (G2-3 + ПКР), $n = 15$	$0,559 \pm 0,027$ $p < 0,001$	$0,368 \pm 0,038$ $p = 0,066$	$1,494 \pm 0,018$ $p = 0,002$	$0,231 \pm 0,016$ $p = 0,077$
Больные с наличием недифференцированных клеток (G4 + ПКР), $n = 5$	$0,615 \pm 0,08$ $p < 0,001$	$0,406 \pm 0,107$ $p = 0,071$	$1,457 \pm 0,024$	$0,219 \pm 0,032$
Больные с наличием недифференцированных клеток (G4 + G2-3), $n = 8$	$0,785 \pm 0,155$ $p < 0,001$ $p_1 = 0,019$ $p_{IV} = 0,065$	$0,467 \pm 0,105$ $p = 0,014$ $p_1 = 0,037$	$1,523 \pm 0,033$ $p = 0,002$ $p_2 = 0,084$	$0,171 \pm 0,029$ $p = 0,035$ $p_{IVst} = 0,037$
Больные с аденокарциномой T4, $n = 17$	$0,561 \pm 0,035$ $p < 0,001$	$0,362 \pm 0,033$ $p = 0,074$	$1,487 \pm 0,021$ $p = 0,010$	$0,223 \pm 0,019$
Больные с IV стадией, $n = 4$	$0,536 \pm 0,035$ $p < 0,001$	$0,492 \pm 0,125$ $p = 0,003$	$1,533 \pm 0,037$ $p = 0,003$	$0,274 \pm 0,049$ $p = 0,013$

Примечание. ПКР – перстевидноклеточный рак. Статистическая значимость различий: p – относительно группы здоровых, p_1 – относительно группы больных аденокарциномой G1-2, p_2 – относительно группы больных аденокарциномой G3, p_{IV} – относительно больных с IV стадией.

Интересно, что у больных РЖ статистически значимое увеличение погруженности белков в липидный матрикс мембран эритроцитов выявлено только при IV стадии (на 35%, $p = 0,015$), а также наблюдалась тенденция к увеличению у больных с сочетанным поражением (на 13,8%, $p = 0,077$). А у больных с наличием недифференцированных клеток при аденокарциноме желудка имело место снижение погруженности белков (на 15,8%, $p = 0,035$). Согласно данным, полученным в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте ранее, данный показатель оказывался наиболее лабильным, резко увеличенным при большинстве локализаций злокачественного процесса и его изменения нередко коррелировали с состоянием больных и эффективностью проводимой терапии. Значительные изменения погруженности белков в липидный матрикс мембран клеток крови выявлены при онкогинекологической патологии, раке молочной железы, раке легкого, раке орофарингеальной области, злокачественных поражениях головного мозга [13, 14]. У больных раком молочной железы с высокой эффективностью химиотерапевтического лечения наблюдалась нор-

мализация изначально увеличенной погруженности белков в липидный матрикс мембран эритроцитов и лимфоцитов крови при отсутствии положительных изменений у больных со стабилизацией процесса [15]. Следовательно, при РЖ изменение погруженности белков в липидный матрикс мембран эритроцитов отличалось от картины, наблюдавшейся при других формах рака.

Отдельно следует остановиться на показателях эритроцитарных мембран у больных с IV стадией поражения желудка. У этих больных повышение текучести было более выражено в липидном бислое – 62,4%, чем в зоне белок-липидных контактов – 32,3%, в то время как во всех других группах больных более выраженным было увеличение текучести в зоне белок-липидных контактов. Максимальному среди всех групп увеличению текучести липидного слоя соответствовало и наибольшее увеличение полярности липидной фазы мембран и погруженности белков в липидный матрикс. Текучесть липидного бислоя у больных с IV стадией была статистически значимо выше, чем у больных аденокарциномой G1-2 и ПКР (на 54,7 и 38,6% соответственно). Выяв-

лена также тенденция к статистической значимости более высоких уровней полярности у этих больных относительно больных ПКР (на 5,4%) и погруженности относительно больных аденокарциномой G1-2 и G3, ПКР (на 34,3; 37,7 и 38,4% соответственно). Статистически значимым у больных с IV стадией было превышение погруженности белков относительно сниженного уровня этого показателя у больных G4 + G2-3 (на 60,2%), при тенденции к снижению текучести белок-липидных контактов (на 31,7%) относительно той же группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, для большинства обследованных больных РЖ было характерно увеличение текучести мембран эритроцитов, более выраженное в зоне белок-липидных контактов, но наблюдавшееся и в липидном бислое. Наибольшие изменения были выявлены при наличии в опухоли желудка недифференцированных клеток. При этом наблюдалось увеличение текучести мембран эритроцитов как при аденокарциноме желудка, так и при ПКР, что также сопровождалось более выраженным повышением полярности липидной фазы мембран при аденокарциноме. И только для группы G4 + G2-3 было характерно статистически значимое снижение погруженности белков в липидный матрикс мембраны.

Известно, что текучесть характеризует способность мембран реагировать на происходящие в организме нарушения, в том числе и на развитие злокачественного процесса [16]. Причиной увеличения текучести липидного бислоя может стать усиление процессов свободнорадикального окисления липидов мембран, их взаимодействие с продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ), изменение липидного состава мембран [3, 17]. К основным факторам, определяющим текучесть мембран, относятся содержание холестерина, способствующего более жесткой упорядоченности липидного бислоя, и содержание ненасыщенных липидов, повышающих текучесть и проницаемость мембран [2]. Поскольку липиды мембран формируют среду для функционирования мембранных белков, то изменение структуры липидного бислоя ведет к нарушению конформации связанных с ним белков. Интенсификация свободнорадикального окисления белков мембраны приводит к изменению их третичной структуры, повышению агрегации белков или фрагментации их, что способствует увеличению текучести в зоне белок-липидных контактов, погруженности белков в липидный матрикс и, как следствие, снижению их функциональных возможностей, в том числе рецепторного аппарата [5]. Показа-

но, что участки мембран (домены), обогащенные холестерин и сфинголипидами, со встроенными в них рецепторами эпидермального фактора роста (EGF), эстрогенов и др., участвуют в пролиферации клеток, в то время как обогащенный керамидом домен со встроенными рецепторами Fas (CD95) и TNF-R1 запускает работу каспаз и способствует процессу апоптоза [2]. Изменения в липидных доменах и в белках, находящихся внутри домена, могут быть вовлечены в злокачественную трансформацию, неконтролируемый рост, инвазивность и метастазирование [18], а также влиять на состояние антиоксидантной и протеолитической систем, играющих важную роль при онкопатологии [19, 20].

На функциональную важность изменения белковой составляющей мембран при злокачественной патологии косвенно указывает выявленная в эритроцитах больных РЖ большая выраженность увеличения текучести мембран в зоне белок-липидных контактов. С активацией процессов свободнорадикального окисления, как одной из причин увеличения текучести мембран эритроцитов, согласуются полученные нами результаты об интенсификации ПОЛ в плазме крови и эритроцитах больных раком желудка. При этом уровень продуктов ПОЛ и степень нарушения сопряженной работы антиоксидантных ферментов эритроцитов увеличивались при снижении дифференцировки аденокарциномы и, особенно, при наличии в опухоли недифференцированных клеток [21].

Анализ изменений свойств мембран, происходящих при раке, привел к заключению, что увеличение текучести мембран опухолевых клеток способствует метастазированию, а снижение текучести обуславливает развитие множественной лекарственной устойчивости [2]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что функционально значимые особенности структуры характерны не только для опухолевых клеток. Изменение текучести, полярности липидного бислоя и погруженности в него белков происходят и в мембранах эритроцитов, завися при этом от гистологических характеристик опухоли, типов рака и стадий процесса. Таким образом, результаты, полученные при изучении мембран эритроцитов при раке желудка, согласуются с высказанным зарубежными учеными [2, 22, 23] мнением о том, что углубленные исследования клеточных мембран и их липидного состава, т.е. липидомики различных типов рака и стадий процесса, а также модификация мембранных компонентов предоставляют большие возможности для лечения и профилактики рака и будут чаще использоваться в ближайшие годы в качестве маркеров прогноза и прогрессирования при злокачественной патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение текучести мембран эритроцитов в зоне белок-липидных контактов и липидном бислое, как правило, сопровождается небольшим по величине, но статистически значимым повышением полярности липидной фазы мембран, характерно для больных РЖ и усиливается по мере снижения степени дифференцировки опухоли. У больных с IV стадией процесса выявлено максимальное увеличение текучести и полярности липидного бислоя, сопровождаемое значительным ростом погруженности белков в липидный матрикс. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменения структурных и, следовательно, функциональных свойств мембран, характерные не только для опухолевых клеток, но и для клеток крови, могут вносить вклад в особенности развития опухолевого процесса и использоваться в качестве прогностических маркеров прогрессирования заболевания и успешности лечения.

ЛИТЕРАТУРА

- Alves A.C., Ribeiro D., Nunes C., Reis S. Review biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016; 1858 (9): 2231–2244. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.06.025.
- Zalba S., Hagen ten T.L.M. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*. 2017; 52: 48–57. DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.10.008.
- Степовая Е.А., Новицкий В.В., Гольдберг В.Е., Рязанцева Н.В., Ткаченко С.Б., Колосова М.В. Особенности состояния мембран и метаболизма эритроцитов у больных раком легкого. *Вопросы онкологии*. 2004; 50 (1): 63–67.
- Белоногов Р.Н., Титова Н.М., Дыхно Ю.А., Савченко А.А. Особенности редоксзависимой модификации белков в эритроцитах больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от стадии заболевания. *Сибирский онкологический журнал*. 2010; 6: 32–35.
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Федорова Т.С., Кравец Е.Б., Иванов В.В., Жаворонюк Т.В., Часовских Н.Ю., Чудакова О.М., Бутусова Н.В., Яковлева Н.М. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 5 (2): 62–69.
- Batyuk L., Kizilova N. Dielectric properties of red blood cells for cancer diagnostics and treatment. *Acta Scientific Cancer Biology*. 2018; 2 (10): 55–60.
- Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980: 320.
- Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989: 276.
- Дятловицкая Э.В. Сфинголипиды и злокачественный рост. *Биохимия*. 1995; 60 (6): 843–850.
- Shinitzky M. Membrane fluidity in malignancy adversative and recuperative. *Biochim. Biophys. Acta*. 1984; 738 (4): 251–261. DOI: 10.1016/0304-419x(83)90007-0.
- Pop D.A., Jucu V. Membrane microviscosity in cell/virus systems. *Romanian Journal of Virology*. 1993; 44 (1-2): 79–83.
- Baritaki S., Apostolakis S., Kanellou P., Dimanche-Boitrel M.-T., Spandidos D.A., Bonavida B. Reversal of tumor resistance to apoptotic stimuli by alteration of membrane fluidity: therapeutic implications. *Adv. Cancer Res*. 2007; 98: 149–190. DOI: 10.1016/S0065-230X(06)98005-1.
- Горошинская И.А., Голотина Л.Ю., Владимирова Л.Ю., Снежко И.В., Шалашная Е.В., Немашкалова Л.А., Нескубина И.А., Качесова П.С. Прогностическое значение показателей состояния мембран и свободнорадикальных процессов в крови онкологических больных. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Спецвыпуск*. 2005; 1: 27–30.
- Горошинская И.А., Неродо Г.А., Сурикова Е.И., Неродо Е.А., Немашкалова Л.А., авторы; ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, патентообладатель. Способ прогнозирования возникновения рецидива рака вульвы. Патент Российской Федерации 2517541. 10 января 2013.
- Горошинская И.А., Владимирова Л.Ю., Шалашная Е.В., Немашкалова Л.А. Исследование показателей свободно-радикальных процессов и состояния мембран у больных раком молочной железы. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2004; 4: 46–51.
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск, 2004: 202.
- Лебедева В.А., Пушкарев С.В., Сафронов И.Д., Трунов А.Н. Выраженность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантный потенциал у больных с распространенным раком яичников в динамике полихимиотерапии. *Сибирский онкологический журнал*. 2007; 2: 42–45.
- Hryniewicz-Jankowska A., Augoff K., Biernatowska A., Podkalicka J., Sikorski A.F. Membrane rafts as a novel target in cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 2014; 1845 (2): 155–165. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.01.006.
- Розенко Л.Я., Сидоренко Ю.С., Франциянц Е.М. Влияет ли объем опухоли на состояние антиоксидантной защиты организма. *Вопросы онкологии*. 1999; 45 (5): 538–541.
- Сидоренко Ю.С., Мусиенко Н.В., Франциянц Е.М. Некоторые показатели активности протеолитической системы в ткани злокачественной опухоли и перифокальной зоны при различных локализациях рака. *Вестник Южного научного центра РАН*. 2008; 4 (2): 93–98.
- Горошинская И.А., Медведева Д.Е., Сурикова Е.И., Немашкалова Л.А., Качесова П.С., Малинин С.А., Каминский Г.В., Маслов А.А., Кит О.И. Состояние окислительного метаболизма в крови больных раком желудка с разным гистотипом опухоли. *Современные проблемы науки и образования*. 2019; 1. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28440> (дата обращения: 15.01.2019)
- Bandu R., Mok H.J., Kim K.P. Phospholipids as cancer biomarkers: Mass spectrometry-based analysis. *Mass Spectrom. Rev*. 2016; 37 (2): 107–138. DOI: 10.1002/mas.21510.
- Yan G., Li L., Zhu B., Li Y. Lipidome in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016; 7 (22): 33429–33439. DOI: 10.18632/oncotarget.7960.

Вклад авторов

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

Сведения об авторах

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

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

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

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

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

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

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

Поступила в редакцию 29.03.2019

Подписана в печать 25.12.2020

Патогенез анемического синдрома у беременных с гестационным сахарным диабетом

Зима А.П.¹, Прохоренко Т.С.^{1,2}, Саприна Т.В.¹, Мусина Н.Н.¹, Новицкий В.В.¹,
Байков А.Н.¹

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

² Томский региональный центр крови
Россия, 634045, Томск, ул. Вершинина, 45

РЕЗЮМЕ

Цель. Установить роль медиаторов воспаления и метаболизма железа в патогенезе различных видов анемического синдрома у беременных с гестационным сахарным диабетом (ГСД).

Материалы и методы. Проведено обследование 32 беременных с ГСД, из которых 14 пациенток имели железодефицитную анемию, а 18 – анемию хронических заболеваний. В сыворотке крови беременных методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию интерлейкина 6, гепсидина, растворимого рецептора к трансферрину, методом турбидиметрии – концентрацию С-реактивного белка и трансферрина.

Результаты. У беременных с ГСД концентрация интерлейкина 6 повышена в сравнении с его уровнем у здоровых беременных и не зависит от вида анемического синдрома. У беременных с ГСД, имевших анемию хронических заболеваний, концентрация в крови С-реактивного белка превышала таковую у здоровых беременных и беременных с железодефицитной анемией. Анализ содержания в крови у беременных с ГСД маркеров метаболизма железа показал, что у женщин с анемией хронических заболеваний концентрация гепсидина значительно выше, чем у пациенток с железодефицитной анемией и здоровых беременных.

Заключение. Установлена гетерогенность анемического синдрома при беременности, отягощенной ГСД: истинную железодефицитную анемию имели менее половины пациенток, в то время как у большей части женщин анемия была связана с внутриклеточной блокадой железа. Подтверждено, что ГСД сопровождается развитием субклинического воспаления, более выраженного при анемии хронических заболеваний. Показано, что механизм развития анемии хронических заболеваний с участием белка гепсидина реализуется и при ГСД, характеризующимся субклиническим воспалением. Полученные результаты указывают на важность установления вида анемического синдрома у беременных с ГСД с целью эффективного терапевтического сопровождения пациенток.

Ключевые слова: беременность, анемия хронических заболеваний, гестационный сахарный диабет, воспаление, гепсидин.

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

Источник финансирования. Государственное задание № 056-0093-18-00 от 26.12.2017. Совет по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7).

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 3431 от 2013).

✉ Прохоренко Татьяна Сергеевна, e-mail: mmikld.ssmu@gmail.com.

Для цитирования: Зима А.П., Прохоренко Т.С., Саприна Т.В., Мусина Н.Н., Новицкий В.В., Байков А.Н. Патогенез анемического синдрома у беременных с гестационным сахарным диабетом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 28–33. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-28-33>.

Pathogenesis of anemia in pregnant women with gestational diabetes mellitus

Zima A.P.¹, Prokhorenko T.S.^{1,2}, Saprina T.V.¹, Musina N.N.¹, Novitsky V.V.¹, Baykov A.N.¹

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

² Tomsk Regional Blood Center
45, Vershinina Str., Tomsk, 634045, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the research was to establish the role of inflammation mediators and iron metabolism in the pathogenesis of various types of anemic syndrome in pregnant women with gestational diabetes mellitus (GDM).

Materials and methods. 32 pregnant patients with GDM were examined; 14 of them had iron deficiency anemia, 18 – anemia of chronic diseases. The enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the concentration of IL-6, hepcidin and a soluble receptor for transferrin in the blood serum of pregnant women, the concentrations of C-reactive protein and transferrin were determined with the method of turbidimetry.

Results. It was shown that women with GDM had higher IL-6 level compared to healthy pregnant women, and the concentration of IL-6 did not depend on the type of anemic syndrome. The C-reactive protein concentration was higher in patients with GDM and anemia of chronic diseases than in healthy pregnant women or in pregnant women with iron deficiency anemia. An analysis of iron metabolism markers in pregnant women with GDM established that patients with anemia of chronic diseases had higher hepcidin levels than women with iron deficiency anemia or healthy pregnant women.

Conclusions. We established the heterogeneity of the anemic syndrome in pregnancy complicated by GDM. It was confirmed that GDM was accompanied by subclinical inflammation, which was more pronounced in anemia of chronic diseases. The research showed that the mechanism of development of anemia of chronic diseases involving the hepcidin protein was also realized in GDM, characterized by subclinical inflammation. The results indicate the importance of establishing the type of the anemic syndrome in pregnant women with GDM for effective therapeutic follow-up.

Key words: pregnancy, anemia of chronic diseases, gestational diabetes mellitus, inflammation, hepcidin.

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

Source of financing. The study was carried out within the state assignment No. 056-0093-18-00 of December 26, 2017 and supported by the Council on Grants of the President of the Russian Federation for state support of leading scientific schools (SS-2690.2018.7).

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No. 3431, 2013).

For citation: Zima A.P., Prokhorenko T.S., Saprina T.V., Musina N.N., Novitsky V.V., Baykov A.N. Pathogenesis of anemia in pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 28–33. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-28-33>.

ВВЕДЕНИЕ

К числу наиболее часто встречающихся экстрагенитальных патологий у беременных относятся нарушение углеводного обмена и анемический синдром. По данным Всемирной организации здравоохранения (2014), в большинстве случаев анемия у беременных является железодефицитной, а ее частота в развитых странах достигает 20–25%, в России до 35–43%. Однако при беременности, отягощенной нарушением углеводного обмена, вследствие реализации механизмов глюкозо-, липотоксичности и формирования субклинического воспаления, велика вероятность развития анемии хронических заболеваний, резистентной к лечению препаратами железа. Высокая распространенность анемического синдрома, его гетерогенность (при наличии сопутствующей патологии) у беременных и возможные осложнения (повышение перинатальной смертности, задержка развития плода, внутриутробная гипоксия, неонатальная асфиксия, слабость родовой деятельности, плохая переносимость кровопотери и пр.) делают актуальной проблему изучения патогенеза анемии, а также совершенствования методов ее лабораторной диагностики [1].

Цель исследования – установить роль медиаторов воспаления и метаболизма железа в патогенезе различных видов анемического синдрома у беременных с гестационным сахарным диабетом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 32 беременных с гестационным сахарным диабетом (ГСД), наблюдавшихся у врача-эндокринолога на базе ОГАУЗ «Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко» г. Томска. Диагноз ГСД беременным выставлен в соответствии с диагностическими уровнями гликемии (на основании Российского национального консенсуса «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение», 2012), установлен в первом триместре беременности в рамках первого биохимического скрининга. Все беременные женщины с ГСД были компенсированы на фоне диетотерапии без применения препаратов инсулина.

На основании комплексного анализа лабораторных данных выявляли наличие анемического синдрома и его вид. Оценивали основные гематологические показатели (количество эритроцитов и ретикулоцитов, концентрацию гемоглобина) (с использованием 5-diff гематологического анализатора Sysmex xs-1000i, Sysmex, Япония), биохимические показатели обмена железа (концентрацию сыворо-

точного железа, ферритина, общую железосвязывающую способность) (с использованием анализатора Cobas c 311, Roche, Германия). Анемическим синдромом у беременных считали снижение концентрации гемоглобина в крови менее 110 г/л. Железодефицитную анемию (ЖДА) верифицировали на основании снижения содержания в крови железа и ферритина в комплексе с повышенным значением общей железосвязывающей способности. При сниженных значениях общей железосвязывающей способности и концентрации сывороточного железа, но нормальной или повышенной концентрации ферритина в крови устанавливали диагноз анемии хронических заболеваний. По результатам обследования женщины были разделены на две группы: имевшие ЖДА – 14 пациенток; имевшие анемию хронических заболеваний (АХЗ) – 18 беременных.

На момент исследования все пациентки находились на втором триместре беременности. Возраст обследуемых – от 23 до 44 лет. Группу сравнения составили 12 здоровых беременных сопоставимого группы обследования возраста. Критериями исключения беременных из программы исследования являлись: применение препаратов железа, наличие на момент обследования острых и обострения хронических инфекций, гнойно-некротических заболеваний, наличие в анамнезе или на момент скрининга аллергических заболеваний (бронхиальная астма, атопический дерматит и т.д.), нефрит любой этиологии, псориаз, а также отказ от участия в исследовании. Исследование соответствовало этическим стандартам, все лица подписали добровольное информированное согласие.

Материалом исследования явилась сыворотка венозной крови, взятой утром до приема пищи из локтевой вены в количестве 10 мл в вакуумную пробирку BD Vacutainer с активатором свертывания диоксидом кремния (Becton Dickinson, США). Методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли концентрацию цитокина интерлейкина 6 (IL-6) (пг/мл) (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), гепсидина (нг/мл) (MyBioSource, США) и растворимого рецептора к трансферрину (sTfR) (нмоль/л) (R&D Systems, США) согласно инструкциям фирм-производителей наборов реагентов. Считывание результатов производилось с помощью автоматического фотометра для микропланшет Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм. Концентрацию исследуемых маркеров определяли по стандартной калибровочной кривой. Турбидиметрическим методом с использованием анализатора Cobas c311 (Roche, Германия) в сыворотке крови определяли концентрации С-реактивного белка

(мг/л) (при длине волны 552 нм) и трансферрина (г/л) (при длине волны 570 нм).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS Statistics 18. Проверка нормальности распределения проводилась по критерию Шапиро – Уилка. Пороговый уровень статистической значимости различий был принят равным 0,05. Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения и были представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{25}-Q_{75})$. В целях установления значимости различий значений показателей между независимыми группами сравнения была проведена статистическая обработка с помощью критериев Краскела – Уоллиса с учетом поправки Бонферрони

для трех групп исследования, Манна – Уитни – для двух групп. Корреляцию между признаками оценивали с помощью критерия Спирмана для непараметрических данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке содержания в крови маркеров воспаления было установлено, что у беременных с ГСД концентрация IL-6 повышена ($p < 0,05$) в сравнении с его уровнем у здоровых беременных и не зависит от вида анемического синдрома. Беременных с ГСД и АХЗ отличала от здоровых беременных и беременных с ГСД и ЖДА повышенная концентрация в крови С-реактивного белка ($p < 0,05$ во всех случаях) (таблица).

Т а б л и ц а

Концентрация маркеров воспаления и метаболизма железа в сыворотке крови беременных с гестационным сахарным диабетом с учетом вида анемического синдрома, $Me (Q_{25}-Q_{75})$			
Показатель	Беременные без гестационного сахарного диабета и анемии, $n = 12$	Беременные с гестационным сахарным диабетом	
		и железодефицитной анемией, $n = 14$	и анемией хронических заболеваний, $n = 18$
IL-6, пг/мл	0,5 (0–1,0)	2,8 (2,6–2,8)*	2,7 (1,8–3,0)*
С-реактивный белок, мг/л	1,33 (1,0–1,65)	2,82 (1,85–3,29)	8,79 (6,32–10,12) * **
Гепсидин, нг/мл	5,55 (0–11,1)	7,1 (3,4–11,7)	12,2 (11,6–14,6)* **
sTfR, нмоль/л	20,15 (5,94–34,36)	34,79 (23,92–38,85)	38,41 (24,5–42,47)
Трансферрин, г/л	–	4,03 (3,65–4,39)	4,05 (4,05–4,15)

* статистически значимое различие по сравнению с аналогичными показателями беременных без гестационного сахарного диабета и анемии ($p < 0,05$), ** беременных с железодефицитной анемией.

Анализ содержания в крови у беременных с ГСД маркеров метаболизма железа показал, что у женщин с АХЗ концентрация гепсидина значительно выше, чем у пациенток с ЖДА ($p < 0,05$) и здоровых беременных ($p < 0,05$). В ходе работы выявлена средняя положительная линейная зависимость между повышением концентрации гепсидина и С-реактивного белка ($r = 0,61$; $p < 0,05$) в сыворотке крови у пациенток с гестационным сахарным диабетом и анемией хронических заболеваний. Различий концентрации в крови трансферрина и растворимого рецептора к трансферрину в зависимости от вида анемического синдрома у беременных с ГСД выявлено не было ($p > 0,05$ во всех случаях) (см. таблицу).

Однако нами была показана сильная положительная линейная зависимость между повышением концентрации трансферрина и его растворимого рецептора ($r = 0,84$; $p < 0,05$) в сыворотке крови у пациенток с ГСД и железодефицитной анемией, что отражает классическую концепцию патогенеза ЖДА.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование уже на этапе стратификации пациенток по группам клинического об-

следования показало, что практически в половине случаев анемия у беременных с ГСД не является железодефицитной, а следовательно, не может быть скорректирована приемом препаратов железа. Неоднородность структуры анемического синдрома у лиц с таким нарушением углеводного обмена, как сахарный диабет 1-го типа (у беременных и небеременных больных сахарным диабетом 1-го типа), подтверждена другими исследованиями [2, 3]. Из этого следует вывод, что у беременных с нарушением углеводного обмена необходимо проведение четкой дифференцировки анемии хронических заболеваний и железодефицитной анемии.

Установлено, что при анемии хронических заболеваний ключевая роль в активации синтеза острофазного белка гепсидина принадлежит группе провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, TNF α [4], но особое значение отводится IL-6 [5]. Основная функция гепсидина, в свою очередь, заключается в блокирующем действии на белок-переносчик железа – ферропортин, в результате чего нарушается выход железа из макрофагов, энтероцитов, плаценты и других клеток, развивается гипоферремия [6]. Таким образом, патогенез анемии хронических заболева-

ний связан с избытком продукции IL-6, активацией синтеза гепсидина и снижением доступности железа для эритропоэза. Данное исследование, а также ранее проведенные нами работы [7, 8] указывают на наличие воспалительного процесса при ГСД, поскольку содержание IL-6 в сыворотке крови женщин с данной патологией было выше, чем при физиологической беременности. Необходимо отметить, что концентрация IL-6 в крови беременных с ГСД при различных видах анемического синдрома имела сопоставимые значения. При этом значимое повышение концентрации в крови гепсидина наблюдалось только у беременных с АХЗ. Это указывает на наличие дополнительных факторов, стимулирующих продукцию гепсидина и способствующих развитию анемии хронических заболеваний при ГСД.

Наиболее чувствительным клинико-лабораторным индикатором воспаления является С-реактивный белок. Максимальное значение концентрации С-реактивного белка зафиксировано в сыворотке крови у беременных с ГСД, имевших анемию хронических заболеваний, что свидетельствует о большей активации воспаления у данных пациенток по сравнению с беременными, страдающими железодефицитной анемией. Таким образом, описанный в научной литературе механизм развития анемии хронических заболеваний с участием гепсидина, IL-6 и С-реактивного белка реализуется и при субклиническом воспалении, сопровождающим гестационный сахарный диабет.

В качестве дифференциально-диагностических маркеров ЖДА и АХЗ рассматриваются трансферрин и sTfR. Указывается, что у больных с анемией хронических заболеваний концентрация трансферрина и sTfR в сыворотке крови определяется в области нормальных значений или снижена, в то время как у больных с железодефицитной анемией содержание данных маркеров повышается [9, 10]. Однако помимо количества железа, депонированного в организме, содержание трансферрина и sTfR в крови отражает активность эритропоэза [11, 12], которая возрастает к концу первого триместра беременности. Таким образом, ставится под сомнение информативность результатов данных тестов после 12 нед беременности.

Настоящее исследование подтвердило ограниченное применение трансферрина и его растворимого рецептора в качестве показателей верификации АХЗ у беременных с ГСД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гестационный сахарный диабет сопровождается развитием субклинического воспаления, которое бо-

лее выражено при анемии хронических заболеваний, в сравнении с железодефицитной анемией. Показано, что механизм развития анемии хронических заболеваний с участием белка гепсидина реализуется и при ГСД, характеризующимся субклиническим воспалением. Установлена гетерогенность анемического синдрома при беременности, отягощенной ГСД: истинную железодефицитную анемию имели менее половины пациенток, в то время как у большей части женщин анемия была связана с внутриклеточной блокадой железа. Полученные результаты указывают на важность установления вида анемического синдрома у беременных с ГСД с целью эффективного терапевтического сопровождения пациенток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lin L., Wei Y., Zhu W., Wang C., Su R., Feng H., Yang H. Prevalence, risk factors and associated adverse pregnancy outcomes of anaemia in Chinese pregnant women: a multicentre retrospective study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2018; 18 (1): 111. DOI: 10.1186/s12884-018-1739-8.
2. Куфелкина Т.Ю., Валеева Ф.В. Анемия у больных сахарным диабетом 1 типа. *Сахарный диабет*. 2010; 13 (4): 49–53. DOI: 10.14341/2072-0351-6057.
3. Абакумова А.А., Куфелкина Т.Ю. Структура анемического синдрома у больных сахарным диабетом 1 типа на фоне беременности. *Практическая медицина*. 2011; 55 (7): 35–38.
4. Nemeth E., Ganz T. Anemia of inflammation. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 2014; 28 (4): 671–781. DOI: 10.1016/j.hoc.2014.04.005.
5. Pietrangelo A., Dierssen U., Valli L., Garuti C., Rump A., Corradini E., Ernst M., Klein C., Trautwein C. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin *in vivo*. *Gastroenterology*. 2007; 132 (1): 294–300. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.10.018.
5. Ganz T., Olbina G., Girelli D., Nemeth E., Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008; 112 (10): 4292–4297. DOI: 10.1182/blood-2008-02-139915.
6. Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Новицкий В.В., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Цитокиновый статус беременных с метаболическими нарушениями. *Медицинская иммунология*. 2017; 19 (3): 301–306. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-301-306.
7. Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Мусина Н.Н., Шахманова Н.С., Васильева О.А., Новицкий В.В. Значение определения маркеров воспаления у беременных с анемическим синдромом и ожирением. *Медицинская иммунология*. 2018; 20 (5): 639–646. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-639-646.
8. Суплютов С.Н., Ананьева О.В., Пашкина И.В. Прогностическое значение исследования уровня растворимых рецепторов трансферрина при латентном дефиците железа. *Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2014; 16 (4): 89–90.
9. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Матвеева И.И. Анемический синдром и основные метаболиты феррокинетики

- (ферритин, растворимый рецептор трансферрина, прогепсидин, гепсидин-25 и эндогенный эритропоэтин). *Медицинский алфавит*. 2015; 2 (8): 16–19.
10. Репина М.А., Бобров С.А. Анемический синдром у беременных: вопросы патогенеза, диагноза и лечения. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2010; 59 (2): 3–11.
11. Рукавицын О.А. Анемия хронических заболеваний: отдельные аспекты патогенеза и пути коррекции. *Онкогематология*. 2016; 11 (1): 37–46.

Вклад авторов

Зима А.П. – разработка концепции и дизайна, окончательное утверждение для публикации рукописи. Прохоренко Т.С. – проведение экспериментальной работы, анализ и интерпретация данных. Саприна Т.В. – анализ и интерпретация данных. Мусина Н.Н. – проведение экспериментальной работы, обработка данных. Новицкий В.В. – обоснование рукописи или проверка критически важного интеллектуального содержания. Байков А.Н. – интерпретация результатов, участие в написании текста рукописи.

Сведения об авторах

Зима Анастасия Павловна, д-р мед. наук, профессор, руководитель централизованной клинко-диагностической лаборатории, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-9034-7264.

Прохоренко Татьяна Сергеевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск; зав. клинической лабораторией, Томский региональный центр крови, г. Томск. ORCID 0000-0002-8016-4755.

Саприна Татьяна Владимировна, д-р мед. наук, доцент, зав. эндокринологической клиникой, кафедра эндокринологии и диабетологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9011-8720.

Мусина Надежда Нурлановна, аспирант, кафедра эндокринологии и диабетологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-7148-6739.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-9577-8370.

Байков Александр Николаевич, д-р мед. наук, профессор, руководитель центральной научно-исследовательской лаборатории, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-1030-2769.

(✉) Прохоренко Татьяна Сергеевна, e-mail: mmikld.ssmu@gmail.com

Поступила в редакцию 02.08.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Ассоциация полиморфизма гена рецептора серотонина 2с с депрессией и показателями качества жизни у пациентов перед операцией коронарного шунтирования

Иноземцева А.А., Помешкина С.А., Аргунова Ю.А., Барбараш О.Л.

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ)
Россия, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить связи генетического полиморфизма rs6318 гена *HTR2C* с уровнем депрессии и качеством жизни у пациентов перед коронарным шунтированием (КШ).

Материалы и методы. Обследованы 116 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) перед КШ (возраст 60 [57; 65] лет). В предоперационном периоде проводилась оценка депрессии с помощью шкалы Бека, качества жизни с применением опросника SF-36, а также проводился забор крови с последующим генотипированием полиморфизма rs6318 гена *HTR2C* методом полимеразно-цепной реакции. Статистическая обработка осуществлялась с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Во всех случаях нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$.

Результаты. При анализе связи различных генотипов гена *HTR2C* с уровнем депрессии значимых различий не найдено, однако установлены определенные тенденции ($p = 0,1$). Так, при попарном сравнении различных генотипов обнаружено, что у носителей генотипа CC балл по шкале Бека был выше и составил 12 [8; 19], тогда как у носителей генотипов CG ($p = 0,07$) и GG ($p = 0,08$) он был ниже и составил 3,5 [2; 5] и 8 [0; 25] соответственно. Показатели качества жизни у носителей генотипов CC, CG и GG значимо не различались, однако значение медианы практически по всем показателям опросника (GH, PF, RE, VT) было ниже у носителей генотипа CC. У носителей генотипа CC боль ограничивала их повседневную деятельность больше, чем у носителей генотипа GG ($p = 0,04$). У гомозигот по аллелю C уровень психического здоровья было также ниже, чем у гетерозигот (56 [40; 64] против 82 [72; 92], $p = 0,04$).

Заключение. В настоящем исследовании обнаружены статистически значимые связи различных генотипов полиморфизма rs6318 гена *HTR2C* у пациентов с ИБС с показателями качества жизни.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, коронарное шунтирование, депрессия, качество жизни.

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

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках фундаментальной темы № 0546-2015-0012 «Мультифокальный атеросклероз и коморбидные состояния. Особенности диагностики, управления рисками в условиях крупного промышленного региона Сибири», № госрегистрации АААА-А16-116011910161-2 от 19.01.2016, утверждена решением Ученого совета НИИ КПССЗ № 12 от 18.12.2015.

Соответствие принципам этики. Всеми пациентами было подписано добровольное информированное согласие. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 20 от 25.01.2011).

Для цитирования: Иноземцева А.А., Помешкина С.А., Аргунова Ю.А., Барбараш О.Л. Ассоциация полиморфизма гена рецептора серотонина 2с с депрессией и показателями качества жизни у пациентов перед операцией коронарного шунтирования. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 34–40. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-34-40>.

✉ Аргунова Юлия Александровна, e-mail: argunova-u@mail.ru.

Association of serotonin 2c receptor gene polymorphism with depression and quality of life indicators in patients before coronary artery bypass grafting

Inozemtseva A.A., Pomeshkina S.A., Argunova Yu.A., Barbarash O.L.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
6, Sosnovy Bulv., Kemerovo, 650002, Russian Federation

ABSTRACT

The aim was to study the association of the rs6318 polymorphism of the *HTR2C* gene with the level of depression and quality of life in patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG).

Materials and methods. A total of 116 patients with coronary artery disease (CAD) (age 60 [57; 65] years) were examined before CABG. Depression was assessed in all patients in the preoperative period using the Beck Depression Inventory (BDI). In addition, the quality of life was measured in all patients using the SF-36 questionnaire. Blood samples were collected for the subsequent polymerase chain reaction-based genotyping to detect the rs6318 polymorphism of the *HTR2C* gene. Statistical analysis was performed using the STATISTICA 10.0 software package (StatSoft Inc., USA). The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results. No significant differences were found in the associations between different genotypes of the *HTR2C* gene and depression levels. However, certain trends have been established ($p = 0.1$). Thus, the pairwise comparison of different genotypes reported that carriers of the CC genotype had higher BDI scores (12 [8; 19]), whereas carriers of the CG genotype ($p = 0.07$) and GG genotype ($p = 0.08$) had lower BDI scores (3.5 [2; 5] and 8 [0; 25], respectively). The quality of life among carriers of the CC, CG and GG genotypes did not differ significantly. Nevertheless, the median values of almost all indicators (GH, PF, RE, VT) were lower in carriers of the CC genotype. Carriers of the CC genotype suffered more from pain limiting their daily activities than carriers of the GG genotype ($p = 0.04$). Homozygous C allele carriers demonstrated poorer mental health than heterozygous carriers (56 [40; 64] vs 82 [72; 92], $p = 0.04$).

Conclusions. Reliable associations of different genotypes of the rs6318 polymorphism of the *HTR2C* gene with the quality of life parameters have been found in patients with coronary artery disease.

Key words: coronary artery disease, coronary artery bypass grafting, depression, quality of life.

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

Source of financing. The study was performed within the basic research project 0546-2015-0012 “Polyvascular disease and comorbidities. Diagnosis and risk management in a large industrial region of Siberia” (No. AAAA-A16-116011910161-2 of January 19, 2016).

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent. The study protocol and design were approved by the local Ethics Committee of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (Protocol No. 20 of January 25, 2011).

For citation: Inozemtseva A.A., Pomeshkina S.A., Argunova Yu.A., Barbarash O.L. Association of serotonin 2c receptor gene polymorphism with depression and quality of life indicators in patients before coronary artery bypass grafting. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 34–40. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-34-40>.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность операции коронарного шунтирования (КШ) в лечении пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) давно доказана и не вызывает сомнений [1]. Однако, несмотря на рост технологичности хирургической методики КШ, совершенство-

вание анестезиологического пособия и медикаментозного сопровождения в пред- и постоперационном периодах доля инвалидизации и дезадаптации после КШ остается весьма высокой [2]. Следует помнить, что операция КШ априори не является инвалидирующей процедурой, а направлена на повышение качества жизни (КЖ). Такой диссонанс связан

со множеством причин. Это и отсутствие четких реабилитационных программ на всех этапах реабилитации, и низкая доступность амбулаторно-поликлинического этапа реабилитации [3], а также неготовность самих пациентов участвовать в таких программах реабилитации. Одной из причин такого нежелания может быть наличие депрессии и тревожности у пациентов до и после операции КШ. Кроме того, и сама операция на сердце является мощным стрессогенным фактором для пациента [4]. По данным ряда исследователей, распространенность депрессии и высокой тревожности у пациентов перед оперативным вмешательством на сердце составляет 30–40% [5].

За последние десятилетия выявлено, что личностные характеристики во многом зависят от генетических факторов [6]. С учетом того, что патогенетические механизмы развития депрессии связаны в первую очередь с серотонинергической системой [7], на сегодняшний день активно изучаются гены, связанные с этой системой. А именно большое внимание уделяется гену рецептора серотонина 2с *HTR2C*, расположенному на участке Xq24 и отвечающему за социальное поведение и когниции.

HT2C-рецепторы находятся в наибольшем количестве в полосатом теле, в хориоидальном сплетении, коре головного мозга, гиппокампе, черной субстанции. Показано, что рецепторы 2C контролируют выброс других нейромедиаторов, в частности норадреналина и дофамина. HT2C-рецепторы участвуют в регуляции настроения, тревоги, сексуальных функций, сна, аппетита и сердечно-сосудистой системы [8].

Наиболее изученным полиморфизмом гена *HTR2C* является Cys23Ser (rs6318). При замене гуанина на цитозин происходит изменение в последовательности аминокислот – цистеин заменяется на серин. Считается, что рецепторы носителей генотипа CC обладают связывающей силой в два раза меньше, чем рецепторы гомозигот GG. В связи с этим исследователи полагают, что носители CC в большей степени подвержены развитию депрессивных расстройств [9, 10].

В ряде исследований найдена связь данного полиморфизма с суицидальным поведением [11], алкоголизмом, биполярными психическими расстройствами, шизофренией [12], большими депрессивными расстройствами [13]. Однако имеющиеся литературные данные о вкладе данного полиморфизма в развитие тревожно-депрессивных расстройств у соматических больных достаточно ограничены.

Целью настоящего исследования явилось изучение наличия связей генетического полиморфизма

rs6318 *HTR2C* с уровнем депрессии и качеством жизни у пациентов, готовящихся к операции КШ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 116 пациентов со стабильной ИБС, готовящихся к операции КШ в условиях искусственного кровообращения с полной реваскуляризацией миокарда. Из них 95 (82%) мужчин и 21 (18%) женщина. Медиана возраста составила 60 [57; 65] лет. Критериями исключения являлись: наличие тяжелой соматической патологии (острой или хронической почечной, печеночной недостаточности, хронических заболеваний легких, заболеваний щитовидной железы, аутоиммунных заболеваний); нежелание участия в генотипировании.

Всем пациентам за 2–7 сут до предстоящего оперативного вмешательства была проведена оценка депрессии с помощью шкалы Бека, а также оценка качества жизни с применением опросника SF-36. Оценивались восемь показателей опросника: физическое функционирование (PF), ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием (RP), интенсивность боли (BP), общее состояние здоровья (GH), жизненная активность (VT), социальное функционирование (SF), ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием (RE) и психическое здоровье (MH). На 3–5-е сут до предстоящего КШ проводился забор крови с последующим генотипированием полиморфизма rs6318 *HTR2C*. Выделение ДНК осуществлялось методом фенол-хлороформной экстракции по Маниатис. Концентрацию полученной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США). Генотипирование проводили методом полимеразно-цепной реакции в 96-луночном формате с учетом результатов в режиме реального времени с использованием Taqman-зондов. Равновесие Харди – Вайнберга было соблюдено.

Клинико-anamnestическая характеристика пациентов представлена в табл. 1. Следует отметить, что половина пациентов имели в анамнезе инфаркт миокарда и артериальную гипертензию, четверть пациентов страдали сахарным диабетом.

Всеми пациентами в течение 7 сут до операции принималась стандартная четырехкомпонентная терапия ИБС (антиагреганты, бета-блокаторы, статины, ингибиторы АПФ или блокаторы ангиотензиновых рецепторов). Статистический анализ проводился с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Распределение данных отличалось от нормального. Данные представлены в виде абсолютных значений и их долей в процентах n (%), а также медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_1; Q_3]$.

Таблица 1

Клинико-anamnestическая характеристика пациентов, готовящихся к коронарному шунтированию	
Показатель	Значение
Возраст, лет, <i>Me</i> [Q_1 ; Q_3]	60 [57; 65]
ИМТ, кг/м ² , <i>Me</i> [Q_1 ; Q_3]	28,5 [26,5; 30,7]
EuroScore 2, %, <i>Me</i> [Q_1 ; Q_3]	1,68 [1,27; 1,98]
Длительность ИБС, лет, <i>Me</i> [Q_1 ; Q_3]	4 [1; 8]
Наличие АГ, <i>n</i> (%)	95 (47)
Длительность АГ, лет, <i>Me</i> [Q_1 ; Q_3]	10 [5; 15]
ФК стенокардии перед операцией, <i>n</i> (%):	
– 0;	6 (5)
– I;	6 (5)
– II;	79 (68)
– III	25 (22)
ФК ХСН, <i>n</i> (%):	
– I;	12 (10)
– II;	95 (82)
– III	9 (8)
Инфаркт миокарда в анамнезе, <i>n</i> (%)	64 (55)
ОНМК в анамнезе, <i>n</i> (%)	6 (5)
СД в анамнезе, <i>n</i> (%)	29 (25)
ФВ ЛЖ, %, <i>Me</i> [Q_1 ; Q_3]	60 [51; 65]

Примечание. АГ – артериальная гипертензия, ФК – функциональный класс, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ИМТ – индекс массы тела, СД – сахарный диабет.

Межгрупповые различия оценивались с применением процедуры множественных сравнений критерия Краскела – Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе проводилась оценка распространенности депрессии в изучаемой группе. Большинство пациентов (64%) не имели депрессии (0–9 баллов), 20% имели легкую депрессию (10–15 баллов), 9% – умеренную (16–19 баллов) и 7% – выраженную (20–29 баллов) согласно шкале Бека. Тяжелая депрессия (30–63 балла) в исследуемой группе не наблюдалась. Распределение пациентов в зависимости от генотипа полиморфизма rs6318 представлено в табл. 2.

Таблица 2

Уровень депрессии по шкале Бека у носителей различных генотипов полиморфизма rs6318 гена <i>HTR2C</i> , <i>n</i> (%)			
Степень депрессии	Генотип		
	GG	CG	CC
Нет	68 (59)	2 (2)	3 (3)
Легкая	22 (19)	0 (0)	2 (1)
Умеренная	10 (8)	0 (0)	1 (1)
Выраженная	7 (6)	0 (0)	1 (1)
Тяжелая	0 (0)	0 (0)	0 (0)

При анализе связи различных генотипов гена *HTR2C* с уровнем депрессии по шкале Бека значимых различий не найдено, однако установлены определенные тенденции ($p = 0,1$). Так, при попарном сравнении различных генотипов обнаружено, что у носителей генотипа *CC* балл по шкале Бека был выше и составил 12 [8; 19], тогда как у носителей генотипов *CG* ($p = 0,07$) и *GG* ($p = 0,08$) он был ниже и составил 3,5 [2; 5] и 8 [0; 25] соответственно. На следующем этапе проведена оценка наличия связей изменения качества жизни с различными генотипами гена *HTR2C*. Значения PF, RP, GH, VT, SF и RE у носителей генотипов *CC*, *CG* и *GG* статистически значимо не различались (табл. 3).

Обращает на себя внимание, что практически по всем показателям опросника (GH, PF, RE, VT) средний балл у носителей генотипа *CC* был ниже, что говорит о худшем состоянии физического и психического здоровья, а отсутствие статистической значимости, вероятно, связано с малой выборкой.

Таблица 3

Средний балл показателей опросника SF-36 в зависимости от различных генотипов полиморфизма rs6318, <i>Me</i> [Q_1 ; Q_3]				
Показатель	Генотип			<i>p</i>
	GG	CG	CC	
SF	50 [38; 50]	56,5 [50; 63]	50 [38; 63]	0,09
GH	50 [40; 62]	68,5 [55; 82]	40 [35; 52]	0,34
PF	55 [35; 80]	62,5 [30; 95]	50 [30; 60]	0,56
RP	0 [0; 50]	25 [0; 50]	25 [0; 50]	0,99
RE	34 [0; 67]	83,5 [67; 100]	0 [0; 34]	0,42
VT	55 [40; 70]	67,5 [55; 80]	45 [30; 55]	0,36

Найдено, что у носителей генотипа *CC* боль (BP) ограничивала их повседневную деятельность больше, чем у носителей генотипа *GG* ($p = 0,04$). Средний балл составил 41 [31; 62] и был значимо ниже, чем у гомозигот по аллелю G 51 [41; 74]. Также у гомозигот по аллелю C уровень психического здоровья было ниже. Так, у пациентов с этим генотипом балл в разделе МН был значимо ниже, чем у гетерозигот ($p = 0,04$) 56 [40; 64] против 82 [72; 92] (рис.).

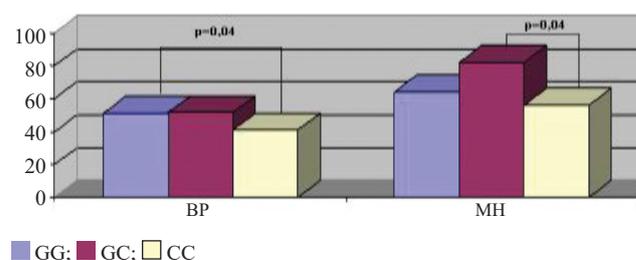


Рисунок. Распределение баллов шкал психического здоровья Mental Health (МН) и интенсивности боли Bodily Pain (BP) в зависимости от генотипов полиморфизма rs6318 гена *HTR2C*

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день влияние депрессии и тревожности на развитие и неблагоприятное течение ИБС доказано. Еще во Фрамингемском исследовании было найдено, что наличие депрессии коррелирует с развитием ИБС [14].

За последнее десятилетие как в пилотных, так и в масштабных исследованиях найдено, что не только депрессия, но и высокий уровень тревожности влияют на неблагоприятное течение ИБС. Так, в исследовании, проведенном в НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, отмечено, что у пациентов ($n = 807$) с ИБС и признаками мультифокального атеросклероза уровень депрессии и тревожности выше, чем у пациентов с изолированным поражением коронарных артерий [15]. В российском многоцентровом исследовании КООРДИНАТА, проведенном в 2007–2009 гг. в 37 городах России, обнаружено, что высокий уровень тревожности у пациентов с артериальной гипертензией и ИБС повышал риск смерти в течение 1,5 лет на 45% [16].

Больные с ИБС и подвергшиеся КШ, – это особая категория пациентов. С одной стороны, такие пациенты пережили массивное хирургическое вмешательство на сердце с искусственным кровообращением, с другой стороны, данное вмешательство было направлено на улучшение их качества жизни в последующем, а отнюдь не на инвалидизацию. Учитывая такую особенность, данная категория пациентов давно привлекает внимание исследователей с позиции изучения депрессии и тревожности и их влияния на течение послеоперационного периода, а также на ближайший и отдаленный прогнозы. Найдено, что наличие тревожности в дооперационном периоде значительно повышает вероятность смерти, а также развития фибрилляции предсердий, инсульта, инфаркта миокарда и почечной недостаточности в послеоперационном госпитальном периоде [17, 18].

Как было отмечено выше, серотонинергическая система играет важную роль в регуляции социального поведения. Учитывая, что полиморфные локусы генов детерминируют активность продукта, который кодируют, различные полиморфные варианты генов, ответственных за обмен серотонина, в том числе гена *HTR2C*, могут обуславливать развитие депрессии и высокой тревожности [19].

Полиморфизм rs6318 гена *HTR2C* находится в позиции, затрагивающей кодирующий участок гена, в связи с чем может влиять на экспрессию. Существует гипотеза, что у лиц с генотипом *CC* синтезируется белок, имеющий сниженную аффинность к серотонину [20].

В исследовании М.В. Алфимовой и соавт., проведенном у 337 больных шизофренией и 333 психически здоровых людей, уровень тревожности у носителей аллеля *C* был выше, чем у носителей аллеля *G* полиморфизма rs6318 гена *HTR2C*, причем как в группе больных шизофренией, так и в группе психически здоровых лиц [12]. В исследовании Л.А. Левчук и соавт. сравнивали распределение генотипов полиморфизма rs6318 у 22 мужчин с депрессией и 29 соматически и психически здоровых мужчин. Найдено, что генотип *GG* у мужчин с депрессией встречался значительно реже, чем у соматически здоровых мужчин [10].

В настоящем исследовании не обнаружено связи какого-либо генотипа с депрессией. Однако следует отметить, что у лиц с генотипом *CC* регистрировался более высокий уровень депрессии согласно шкале Бека. Отсутствие статистически значимых ассоциаций какого-либо генотипа с наличием депрессии, возможно, объясняется тем фактом, что у большинства исследуемых больных (64%) депрессия не отмечалась.

Показатели качества жизни являются более тонким маркером наличия тревожно-депрессивных расстройств и позволяют выделить категорию пациентов, потенциально опасных с точки зрения развития депрессии в послеоперационном периоде, а также менее комплаентных к медикаментозной терапии и реабилитационным мероприятиям.

У носителей генотипа *CC* средний балл практически по всем показателям опросника SF-36 был ниже, чем у носителей других генотипов. При этом статистически значимо он был ниже для раздела психического здоровья и оценки боли. Схожие данные относительно болевого синдрома получены в исследовании В.Е. Голимбета и соавт., проведенном у 167 пациентов с ИБС, в котором отмечено, что у носителей аллеля *C* полиморфизма rs6318 гена *HTR2C* чаще наблюдались болевая форма ИБС и враждебность, т.е. факторы, предрасполагающие к развитию депрессии [21].

Таким образом, существует тесная связь генетических полиморфизмов с развитием депрессии. Влияние генов на развитие шизофрении, суицидального поведения и больших депрессивных расстройств широко изучается как в мире, так и в России. Однако связь генов с субклинической депрессией и высоким уровнем тревожности у пациентов с соматической патологией и, в частности, с ИБС изучена мало.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют предположить наличие ассоциации генетического полиморфизма rs6318 гена *HTR2C* с низким качеством жизни у па-

циентов, ожидающих операции КШ, что является неблагоприятным прогностическим признаком для пациентов в послеоперационном периоде. Данный полиморфизм может использоваться для комплексного скрининга пациентов, склонных к депрессии с целью применения лечебно-профилактических мер, направленных на снижение уровня тревожности и депрессии, – занятия в «Школах здоровья», с психологом, консультативно-образовательные беседы с врачом-кардиологом.

ЛИТЕРАТУРА

- Hillis L.D., Smith P.K., Anderson J.L., Bittl J.A., Bridges C.R., Byrne J.G., Cigarroa J.E., Disesa V.J., Hiratzka L.F., Hutter A.M. Jr., Jessen M.E., Keeley E.C., Lahey S.J., Lange R.A., London M.J., Mack M.J., Patel M.R., Puskas J.D., Sabik J.F., Selnes O., Shahian D.M., Trost J.C., Winniford M.D. 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2011; 124: 652–735. DOI: 10.1161/cir.0b013e31823c074e.
- Помешкина С.А., Кондрикова Н.В., Крупянко Е.В., Каган Е.С., Барбараш О.Л. Анализ подходов к оценке стойкой утраты трудоспособности у пациентов, подвергшихся коронарному шунтированию. *Кардиология*. 2013; 53 (7): 62–66.
- Аронов Д.М., Бубнова М.Г. Проблемы внедрения новой системы кардиореабилитации в России. *Российский кардиологический журнал*. 2013; 4 (102): 14–22. DOI: 10.15829/1560-4071-2013-4-14-22.
- Бокерия Л.А., Алшибая М.М., Бенделиани Н.Г., Иванов С.Ф., Крымов К.В. Влияние многофакторного подхода к лечению больных ишемической болезнью сердца с различной степенью тяжести хронической сердечной недостаточности на симптомы депрессии после прямой реваскуляризации миокарда (результаты 12-месячного рандомизированного исследования). *Клиническая физиология кровообращения*. 2012; 1: 22–28.
- Ravven S., Bader C., Azar A., Rudolph J.L. Depressive symptoms after CABG surgery: a meta-analysis. *Harv Rev Psychiatry*. 2013; 21 (2): 59–69. DOI: 10.1097/HRP.0b013e31828a3612.
- Van den Berg S.M., de Moor M.H., McGue M., Pettersson E., Terracciano A. on behalf of 79 authors. Harmonization of neuroticism and extraversion phenotypes across inventories and cohorts in the genetics of personality consortium: an application of item response theory. *Behav. Genet*. 2014; 44 (4): 295–313. DOI: 10.1007/s10519-014-9654-x.
- Kiser D., Steemers B., Branchi I., Homberg J.R. The reciprocal interaction between serotonin and social behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2012; 36 (2): 786–798. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.12.009.
- Heisler L.K., Zhou L., Bajwa P., Hsu J., Tecott L.H. Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxietylike behavior. *Genes, Brain and Behavior*. 2007; 6 (5): 491–496. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2007.00316.x.
- Бохан Н.А. Иванова С.А., Левчук Л.А. Серотониновая система в модуляции депрессивного и агрессивного поведения. Томск: Иван Фёдоров, 2013: 102.
- Левчук Л.А., Лосенков И.С., Вялова Н.М., Шмиголь М.В., Лебедева Е.В., Симуткин Г.Г., Иванова С.А. Ассоциация полиморфизма гена рецептора серотонина 2C (*HTR2C*) с депрессивными расстройствами. *Фундаментальные исследования*. 2013; 1–2: 299–303.
- Videtic A., Peternelj T.T., Zupanc T., Balazic J., Komel R. Promoter and functional polymorphisms of *HTR2C* and suicide victims. *Genes Brain Behav*. 2009; 8 (5): 541–545. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2009.00505.x.
- Алфимова М.В., Голимбет В.Е., Коровайцева Г.И., Абрамова Л.И., Каледа В.Г. Ассоциация полиморфизма *Cys23Ser* гена рецептора серотонина 2c с социальным поведением у больных психозом и здоровых. *Генетика*. 2015; 51 (2): 242–247. DOI: 10.7868/S0016675815010026.
- Massat I., Lerer B., Souery D., Blackwood D., Muir W., Kaneva R., Nöthen M.M., Oruc L., Papadimitriou G.N., Dikeos D., Serretti A., Bellivier F., Golmard J.L., Milanova V., Del-Favero J., Van Broeckhoven C., Mendlewicz J. *HTR2C* (*Cys23Ser*) polymorphism influences early onset in bipolar patients in a large European multicenter association study. *Mol. Psychiatry*. 2007; 12 (9): 797–798. DOI: 10.1038/sj.mp.4002018.
- Eaker E.D., Sullivan L.M., Kelly-Hayes M., D’Agostino R.B.Sr., Benjamin E.J. Tension and anxiety and the prediction of the 10-year incidence of coronary heart disease, atrial fibrillation, and total mortality: The Framingham Offspring Study. *Psychosom. Med*. 2005; 67 (5): 692–710. DOI: 10.1097/01.psy.0000174050.87193.96.
- Сумин А.Н., Моськин М.Г., Безденежных А.В., Корок Е.В., Щеглова А.В. Влияние наличия мультифокального атеросклероза на качество жизни больных с ИБС. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2014; 1: 36–41. DOI: 10.17802/2306-1278-2014-1-36-41.
- Чазов Е.И., Оганов Р.Г., Погосова Г.В., Шальнова С.А., Ромасенко Л.В., Деев А.Д. Клинико-эпидемиологическая программа изучения депрессии в кардиологической практике: у больных артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца (КООРДИНАТА): результаты многоцентрового исследования. *Кардиология*. 2007; 47 (3): 28–37.
- Tully P.J., Pedersen S.S., Winefield H.R., Baker R.A., Turnbull D.A., Denollet J. Cardiac morbidity risk and depression and anxiety: a disorder, symptom and trait analysis among cardiac surgery patients. *Psychol. Health Med*. 2011; 16 (3): 333–345. DOI: 10.1080/13548506.2011.553960.
- Williams J.B., Alexander K.P., Morin J.F., Langlois Y., Noiseux N., Perrault L.P., Smolderen K., Arnold S.V., Eisenberg M.J., Pilote L., Monette J., Bergman H., Smith P.K., Afילו J. Preoperative anxiety as a predictor of mortality and major morbidity in patients aged >70 years undergoing cardiac surgery. *Am. J. Cardiol*. 2013; 111: 137–142. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.08.060.
- Левчук Л.А., Шмиголь М.В., Иванова С.А. Серотонинергическая система в патогенезе и терапии депрессивных расстройств (обзор литературы). *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2012; 2 (71): 75–79.

20. Lappalainen J.H., Long J.C., Virkkunen M., Ozaki N., Goldman D., Linnoila M. HTR2C Cys23Ser polymorphism in relation to CSF monoamine metabolite concentrations and DSM-III-R psychiatric diagnoses. *Biol. Psychiatry*. 1999; 46: 821–826. DOI: 10.1016/s0006-3223(98)00361-8.
21. Голимбет В.Е., Волель Б.А., Ениколопов С.Н., Коровайцева Г.И., Копылов Ф.Ю. Взаимодействие личностного, болевого и генетического факторов при ишемической болезни сердца. *Кардиология*. 2016; 7 (56): 10–13. DOI: 10.18565/cardio.2016.7.10-13.

Сведения об авторах

Иноземцева Анастасия Анатольевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория реабилитации, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0002-6868-4205.

Помешкина Светлана Александровна, д-р мед. наук, зав. лабораторией реабилитации, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0003-3333-216X.

Аргунова Юлия Александровна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория реабилитации, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0002-8079-5397.

Барбараш Ольга Леонидовна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0002-4642-3610.

(✉) **Аргунова Юлия Александровна**, e-mail: argunova-u@mail.ru.

Поступила в редакцию 25.04.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Экспериментальная модель сахарного диабета 2-го типа у крыс, вызванная диетой с высоким содержанием жиров и стрептозотоцином в низкой дозе

Кайдаш О.А.¹, Иванов В.В.¹, Венгеровский А.И.¹, Буйко Е.Е.¹, Щепеткин И.А.^{1,3}

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

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

³ *Montana State University
United States, 59715, Montana, Bozeman, 960 Technology Blvd.*

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – разработать с помощью диеты с высоким содержанием жиров и однократной инъекции стрептозотоцина в низкой дозе патогенетически обоснованную модель сахарного диабета 2-го типа у крыс с выраженной периферической инсулинорезистентностью и относительным дефицитом инсулина.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на 16 аутбредных самцах крыс. Сахарный диабет 2-го типа моделировали кормлением экспериментальных животных высокожировой диетой (55% калорий за счет жиров) в течение 28 сут с последующей однократной интраперитонеальной инъекцией стрептозотоцина в дозе 35 мг/кг. Концентрацию глюкозы и инсулина в сыворотке крови крыс измеряли до введения стрептозотоцина и по окончании эксперимента. Для оценки инсулинорезистентности проводили глюкозотолерантный и инсулинотолерантный тесты. В сыворотке крови определяли содержание общего белка, альбуминов, общего и прямого билирубина, мочевины, мочевой кислоты, общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности и низкой плотности, активности аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы.

Результаты. Диета с высоким содержанием жиров в сочетании с однократной инъекцией стрептозотоцина приводила у экспериментальных животных к нарушению липидного и белкового обменов и развитию инсулинорезистентности. Уровень базального инсулина не изменялся на фоне выраженной гликемии.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при кормлении крыс диетой с высоким содержанием жиров и однократном введении стрептозотоцина в низкой дозе (35 мг/кг) воспроизводятся патологические процессы, характерные для сахарного диабета 2-го типа. Созданная модель может использоваться для изучения патогенеза сахарного диабета 2-го типа, а также для исследования действия потенциальных гипогликемических средств.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, высокожировая диета, стрептозотоцин, инсулинорезистентность, гипергликемия.

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-1052.2019.7.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (протокол № 7733/1 от 09.09.2019).

✉ *Кайдаш Ольга Александровна, e-mail: kaidash_2011@mail.ru.*

Для цитирования: Кайдаш О.А., Иванов В.В., Венгеровский А.И., Буйко Е.Е., Щепеткин И.А. Экспериментальная модель сахарного диабета 2-го типа у крыс, вызванная диетой с высоким содержанием жиров и стрептозотоцином в низкой дозе. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 41–47. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-41-47>.

The experimental model of type 2 diabetes mellitus caused by a high-fat diet with low-dose streptozotocin in rats

Kaydash O.A.¹, Ivanov V.V.¹, Vengerovsky A.I.¹, Buyko E.E.¹, Schepetkin I.A.^{1,3}

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

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

³ Montana State University
960, Technology Blvd., Bozeman, 59715, United States of America

ABSTRACT

Aim. To develop a pathogenetically reasonable model of type 2 diabetes with marked peripheral insulin resistance and relative insulin deficiency in rats using a high-fat diet and a single injection of streptozotocin in the low dose.

Materials and methods. Experiments were conducted on 16 outbred male rats. Type 2 diabetes model in experimental animals was achieved by feeding them with high-fat diet (55% of energy from fat) for 28 days followed by a single injection of streptozotocin (35 mg/kg). The serum glucose and insulin concentrations in rats were measured before streptozotocin administration and at the end of the experiment. To estimate insulin resistance, insulin tolerance test and glucose tolerance test were performed. Total protein, albumin, total and direct bilirubin, urea, uric acid, total cholesterol, high-density lipoproteins and low-density lipoproteins, and activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were measured in the blood serum.

Results. A high-fat diet with a single injection of streptozotocin resulted in lipid and protein metabolism disorders and peripheral tissues insulin resistance in experimental animals. Basal insulin levels did not change against the backdrop of high glucose level.

Conclusions. These results indicate that feeding rats with a high-fat diet (55% of calories from fats) and a single administration of streptozotocin at a low dose (35 mg/kg) reproduce general pathological processes of type 2 diabetes. This model can be used to study the pathogenesis of type 2 diabetes as well as to investigate the effect of potential hypoglycemic agents.

Key words: type 2 diabetes, a high-fat diet, streptozotocin, insulin resistance, hyperglycemia.

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

Source of financing. This work was supported by the grant from the President of the Russian Federation for young Candidates of Sciences MK-1052.2019.7.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the Ethics Committee of Siberian State Medical University (Protocol No. 7733/1 of September 9, 2019).

For citation: Kaydash O.A., Ivanov V.V., Vengerovsky A.I., Buyko E.E., Schepetkin I.A. The experimental model of type 2 diabetes mellitus caused by a high-fat diet with low-dose streptozotocin in rats. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 41–47. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-41-47>.

ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость сахарным диабетом 2-го типа (СД2) и ожирением приобрела характер эпидемии. Согласно данным Международной федерации диабета, во всем мире от СД страдает около 422 млн человек (2017 г.) [1]. По статистике Госрегистра за 2015 г. в России СД2 болеют около 4,5 млн человек [2]. Ключевыми звеньями патогенеза СД2 являются инсулинорезистентность (ИР) и нарушение функции β -клеток поджелудочной железы, что препятствует регулируемому влиянию инсулина на метаболизм глюкозы, белков и липидов. Развитие СД протекает в несколько этапов и переход от состояния предиабета к явному диабету у людей развивается в течение нескольких лет. Для разработки эффективных методов лечения СД2 и ожирения необходимо создание клинически релевантных экспериментальных моделей этих заболеваний, которые позволят в короткие сроки воспроизводить патогенетические этапы формирования СД2.

Известны генетические модели спонтанного СД и модели, основанные на повреждении островков поджелудочной железы химическими агентами [3]. Одним из подходов для моделирования СД2 у грызунов является введение диабетогена стрептозотоцина на фоне диеты с высоким содержанием жиров или углеводов. Стрептозотокцин избирательно накапливается в β -клетках поджелудочной железы с помощью переносчика глюкозы GLUT2. Перенос метильной группы от стрептозотоцина в молекулу ДНК вызывает ее фрагментацию и некроз β -клеток. Выраженность этого процесса зависит от пути введения, дозы, частоты и временного интервала между инъекциями стрептозотоцина, что позволяет моделировать раннюю или позднюю стадии явного СД [4, 5].

Диета, обогащенная жирами и углеводами, способствует развитию ожирения, гиперинсулинемии, инсулинорезистентности и (или) непереносимости глюкозы [6]. Соотношение жиров, белков и углеводов в рационе экспериментальных животных и продолжительность кормления влияют на массу тела, базальный уровень глюкозы, инсулина, триглицеридов, холестерина и жирных кислот в плазме крови. Для моделирования диабета наиболее часто используют диету с высоким содержанием жира, но с нормальным количеством углеводов. Для получения энергии преимущественно за счет жиров к стандартному рациону добавляют жиры животного (топленое масло, свиное сало) или растительного (оливковое, кокосовое, соевое масла) происхождения. Кратковременный прием обогащенной жирами пищи, как правило, вызывают резистентность к инсулину и (или) непереносимость глюкозы, более длительный

прием способствует приросту жировой массы, что соответствует состоянию предиабета [7].

Цель настоящего исследования – разработать у крыс с помощью диеты с высоким содержанием жиров и однократной инъекции стрептозотоцина в низкой дозе патогенетически обоснованную модель СД2 с выраженной периферической ИР и относительным дефицитом инсулина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 16 аутбредных самцах крыс массой 280–340 г, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей ФГБУ НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга. Животные находились в стандартных условиях содержания в виварии на естественном световом режиме при свободном доступе к воде и пище.

Стандартный корм «ПроКорм» (БиоПро, г. Новосибирск) для лабораторных крыс представлял собой гранулы с минеральными и витаминными добавками, содержал 6% жира, 59% углеводов, 19% белков, 3% витаминно-минеральной смеси и 13% воды. В 100 г корма с высоким содержанием жира содержалось 26 г кокосового масла, 2 г холестерина и 72 г стандартного корма для лабораторных животных, при этом 55% энергии обеспечивали жиры [7, 8].

Животные были разделены на две группы: 1-я группа – контрольные животные, получавшие стандартный лабораторный корм, 2-я группа – животные с экспериментальным СД2, вызванном кормлением в течение 28 сут высокожировой диетой и однократной инъекцией стрептозотоцина. Этим животным на 29-е сут эксперимента после 12-часового голодания вводили однократно внутрибрюшинно свежеприготовленный раствор стрептозотоцина (35 мг/кг в 0,1 М цитратном буфере с pH 4,5). На 44-е сут от начала эксперимента у животных обеих групп проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ): вводили внутрь 2 г/кг 20%-го раствора глюкозы и через 15, 30, 60 и 120 мин измеряли гликемию натощак. На 47-е сут от начала эксперимента проводили инсулинотолерантный тест (ИТТ): подкожно вводили инсулин (НовоРапид Пенфил, Ново Нордикс А/С, Дания) в дозе 0,75 ЕД/кг. Рассчитывали площадь под кривой «концентрация глюкозы – время» (AUC). Массу тела животных определяли при формировании групп перед введением стрептозотоцина и после окончания эксперимента, количество потребляемой воды и пищи учитывали за 1 сут до окончания эксперимента.

После завершения эксперимента крыс умерщвляли асфиксией в атмосфере углекислого газа. В сыворотке крови с использованием анализатора

ARCHITECT с4000 (США) определяли содержание глюкозы, общего белка, альбуминов, общего и прямого билирубина, мочевины, мочевой кислоты, активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), спектрофотометрически измеряли содержание общего холестерина (ХС) (наборы фирмы Randox, Великобритания), холестерина в липопротеинах высокой (ХС-ЛВП) и низкой (ХС-ЛНП) плотности прямым методом (наборы фирмы Chronolab, Испания). Вычисляли индекс атерогенности по формуле: общий холестерин – холестерин липопротеинов высокой плотности / холестерин липопротеинов высокой плотности. Количество инсулина оценивали иммуноферментным методом с помощью ИФА-набора ALPCO Diagnostics (США). Для характеристики инсулинорезистентности рассчитывали показатель НОМА-IR (содержание инсулина, пмоль/л, × содержание глюкозы, ммоль/л) / 155) [https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/download.php] и константу скорости утилизации глюкозы на основании проведенного ИТТ (КИТТ) [9].

Полученные результаты обрабатывали с помощью методов однофакторного дисперсионного анализа при использовании пакета SPSS Statistica 12.0. Количественные показатели представляли в виде медианы, 25- и 75-го перцентилей $Me [Q_1; Q_3]$. При сравнении двух независимых выборок использовали критерий Манна – Уитни. Критический уровень статистической значимости принят $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Масса тела животных контрольной группы возрастала на протяжении всего эксперимента (табл. 1). У животных 2-й группы с моделью СД2, получавших высокожировую диету до инъекции стрептозотоцина, масса тела увеличивалась более значительно, а концентрация инсулина в сыворотке крови повышалась на 20%, индекс НОМА-IR, характеризующий развитие толерантности к глюкозе, на – 23%. Компенсаторное повышение секреции инсулина препятствует развитию гипергликемии в сыворотке крови экспериментальных животных 2-й группы (см. табл. 1). Набор массы тела, гиперинсулинемия, ИР и отсутствие гипергликемии подтверждают развитие стадии предиабета у животных с моделью СД2. Для перехода от предиабета к явному СД2 необходима частичная утрата функциональной массы β -клеток, поэтому на 29-е сут эксперимента животным вводили однократно внутривентриально стрептозотоцин (35 мг/кг).

На 50-е сут эксперимента (через 21 сут после введения стрептозотоцина) масса тела животных группы СД2 снижалась на 10,7% по сравнению массой

контрольных крыс. Суточное потребление воды животными 2-й группы повышалось в 3,9 раза. Количество потребляемого корма в обеих группах не различалось (см. табл. 1), но энергоёмкость пищи была значительно выше у животных 2-й группы.

Таблица 1

Влияние высокожировой диеты (55% калорийности – жиры) и стрептозотоцина (однократно, 35 мг/кг) на массу тела, потребление пищи и воды, содержание в сыворотке крови глюкозы и инсулина у крыс, $Me [Q_1; Q_3]$		
Показатель	Экспериментальная группа	
	Контроль, $n = 8$	Диета + стрептозотоцин, $n = 8$
Глюкоза, ммоль/л	5,2 [4,6; 5,6]	5,6 [5,2; 5,9]
Инсулин, пг/мл	229,1 [212,7; 234,0]	280,1 [260,5; 284,3]*
НОМА-IR	1,3 [1,1; 1,4]	1,7 [1,6; 1,8]*
Масса тела, г	0-е сут	311,0 [305,0; 320,0]
	29-е сут	424,0 [398,0; 439,0]
	50-е сут	465 [446; 475]
Потребление корма, г/сут	31,2 [30,0; 36,0]	36,7 [31,9; 39,1]
Потребление воды, мл/сут	49,0 [39,4; 54,9]	189,5 [147,9; 205,4]*

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

Через 15 сут после введения стрептозотоцина проведение ГТТ выявило значительное нарушение чувствительности к глюкозе по сравнению с чувствительностью в контрольной группе. У крыс с экспериментальным СД2 исходный уровень глюкозы в крови был значительно повышен после ночного голодания и во все интервалы времени после введения глюкозы (рис. 1). При экспериментальном СД2 площадь под кривой при проведении ГТТ увеличивалась в 4,4 раза по сравнению с контролем.

По результатам ИТТ, характеризующего чувствительность тканей к экзогенному инсулину, концентрация глюкозы в крови животных контрольной группы после введения инсулина (0,75 ЕД/кг) максимально уменьшалась через 30 мин (2,3 [1,9; 2,8] ммоль/л), в крови животных с моделью СД2 – спустя 60 мин (11,3 [9,4; 12,7] ммоль/л), что свидетельствует о медленной утилизации глюкозы периферическими тканями из-за развития инсулинорезистентности (рис. 2). Это подтверждается увеличением площади под кривой, рассчитанной на основании ИТТ, у животных с экспериментальным СД2 (в 4,8 раза) по сравнению с контрольной группой. Показатель КИТТ у животных контрольной группы составлял 2,7 [1,9; 3,1]% глюкозы/мин. При экспериментальном СД2 скорость утилизации глюкозы снижалась на 53% ($K_{ИТТ} = 1,4 [1,0; 1,7]$ % глюкозы/мин) (рис. 3).

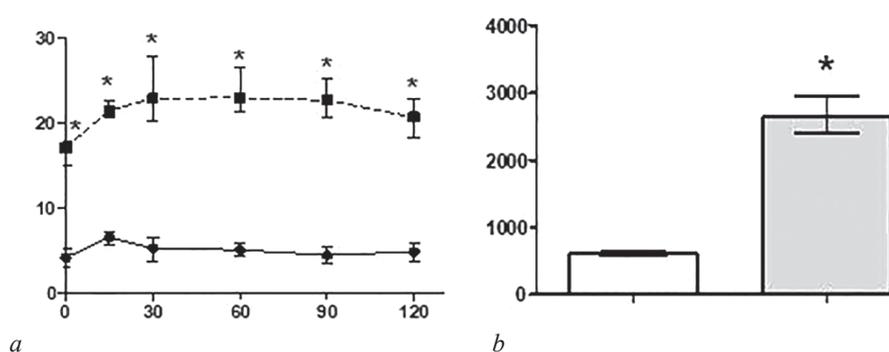


Рис. 1. Результаты теста на толерантность к глюкозе у самцов крыс линии Wistar, получавших высокожировую диету (55% калорийности – жиры) и однократную внутрибрюшинную инъекцию стрептозотоцина (35 мг/кг), 15-е сут после введения: *a* – динамика концентрации глюкозы в крови у крыс контрольной (сплошная линия, $n = 8$) и экспериментальной (пунктирная линия, $n = 8$) групп после внутрибрюшинного введения глюкозы (2 г/кг). Ось абсцисс – время после внутрибрюшинного введения глюкозы, мин; ось ординат – концентрация глюкозы в крови, ммоль/л; *b* – площадь под кривой «концентрация глюкозы – время» при глюкозотолерантном тесте в контроле (светлый столбик) и при модели СД2 (темный столбик), мин × ммоль/л. *достоверность различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$

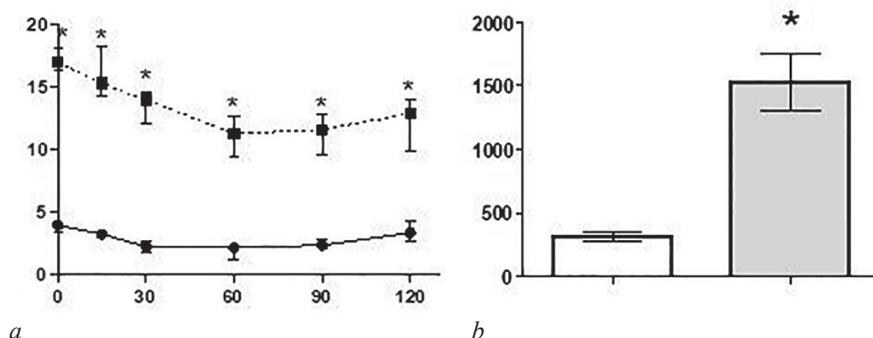


Рис. 2. Результаты теста на толерантность к инсулину у самцов крыс линии Wistar, получавших высокожировую диету (55% калорийности – жиры) и однократную внутрибрюшинную инъекцию стрептозотоцина (35 мг/кг), 18-е сут: *a* – динамика концентрации глюкозы в крови у крыс контрольной группы (сплошная линия, $n = 8$) и при модели СД2 (пунктирная линия, $n = 8$) после подкожного введения инсулина (0,75 ЕД/кг). Ось абсцисс – время после подкожного введения инсулина, мин; ось ординат – концентрация глюкозы в крови, ммоль/л; *b* – площадь под кривой «концентрация глюкозы – время» при инсулинотолерантном тесте в контроле (светлый столбик) и при модели СД2 (темный столбик), мин × ммоль/л. *достоверность различий в сравнении с контрольной группой, $p < 0,05$

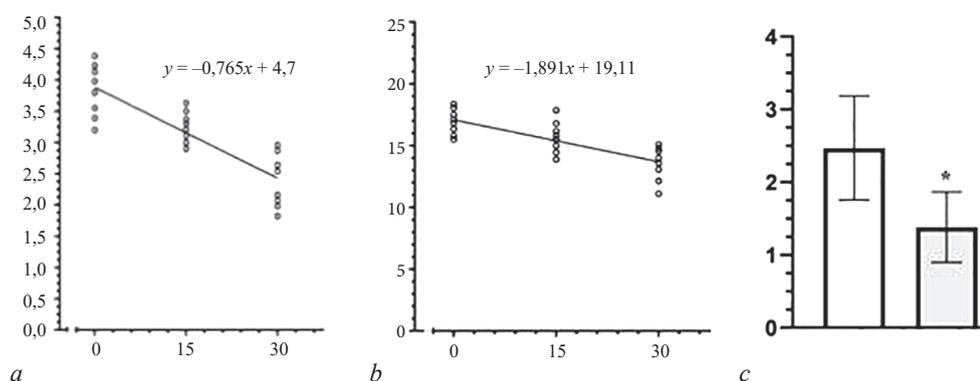


Рис. 3. Результаты теста на толерантность к инсулину у самцов крыс линии Wistar, получавших высокожировую диету (55% калорийности – жиры) и однократную внутрибрюшинную инъекцию стрептозотоцина (35 мг/кг), 18-е сут после введения: *a* и *b* – динамика концентрации глюкозы в крови у крыс контрольной группы (*a*, $n = 8$) и при модели СД2 (*b*, $n = 8$) после подкожного введения инсулина (0,75 ЕД/кг). Ось абсцисс – время после подкожного введения инсулина, мин; ось ординат – концентрация глюкозы в крови, ммоль/л; *c* – константа скорости утилизации глюкозы Китт при инсулинотолерантном тесте в контроле (светлый столбик) и при модели СД2 (темный столбик), % глюкозы/мин. *достоверность различий в сравнении с контрольной группой, $p < 0,05$

Известно, что патогенез СД2 характеризуется сочетанием резистентности тканей к инсулину и недостаточной функцией β -клеток поджелудочной железы [8]. Нарушение углеводного гомеостаза у животных с экспериментальным СД2 подтверждается ростом в 3 раза концентрации глюкозы в сыворотке крови (табл. 2).

Таблица 2

Влияние высокожировой диеты (55% калорийности – жиры) и стрептозотоцина (однократно, 35 мг/кг) на биохимические параметры сыворотки крови крыс, $Me [Q_1; Q_3]$		
Показатель	Контроль, $n = 8$	Модель СД2, $n = 8$
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	53,0 [49,0; 57,5]	97,0 [93,0; 109,0]*
Аспаратаминотрансфераза, Ед/л	113,0 [108,0; 134,5]	134,0 [121,5; 146,0]
Билирубин общий, мкмоль/л	2,6 [2,4; 2,9]	3,2 [2,5; 4,2]
Билирубин прямой, мкмоль/л	1,6 [1,4; 1,7]	1,8 [1,5; 3,1]
Общий белок, г/л	76,0 [72,0; 79,0]	72,5 [71,0; 75,5]
Альбумины, г/л	36,5 [35,0; 37,0]	32,0 [31,5; 33,0]*
Мочевина, ммоль/л	5,5 [5,0; 5,7]	15,8 [14,5; 17,8]*
Мочевая кислота, мкмоль/л	165,0 [155; 182,5]	266,0 [236,0; 282,0] *
Общий холестерин, ммоль/л	1,8 [1,6; 2,6]	13,6 [8,3; 17,3]*
Холестерин липопротеинов низкой плотности, ммоль/л	0,6 [0,4; 0,7]	5,6 [3,8; 7,6]*
Холестерин липопротеинов высокой плотности, ммоль/л	1,0 [0,8; 1,2]	1,0 [0,8; 1,2]
Индекс атерогенности	1,0 [0,6; 1,5]	14,0 [8,9; 16,6]*
Свободные жирные кислоты, мМ	0,7 [0,6; 0,8]	1,4 [1,3; 1,8]*
Триглицериды, ммоль/л	1,2 [0,7; 1,4]	5,1 [2,9; 7,0]*
Глюкоза, ммоль/л	5,1 [4,8; 5,3]	16,9 [15,9; 17,6]*
Инсулин, пг/мл	328,8 [229,1; 520,4]	355,9 [279,1; 521,2]
НОМА-IR	1,9 [1,2; 4,5]	5,4 [3,9; 8,4]*

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

Содержание инсулина в сыворотке крови животных контрольной группы и при модели СД2 не отличалось, но индекс НОМА-IR был в 2,8 раза выше у животных с экспериментальным СД2 (см. табл. 2). Известно, что стрептозотоцин в низких дозах вызывает частичную гибель β -клеток поджелудочной железы, при этом компенсаторно увеличиваются их масса и секреция инсулина [8]. Высокий уровень глюкозы в сыворотке крови животных с СД2 в наших экспериментах при том же уровне инсулина, что и в контроле, свидетельствует о невозможности компенсировать ИР повышенной секрецией инсулина

выжившими клетками. Такие нарушения характерны для поздней стадии СД2.

При СД2 нарушается не только углеводный, но и липидный и белковый обмен. В сыворотке крови животных с экспериментальным СД2 в 7,5 раза возрастало содержание ХС в 9,3 раза повышалось количество ХС-ЛНП, содержание ХС-ЛВП не изменялось, а индекс атерогенности увеличивался (см. табл. 2). Нарушение обмена липидов сопровождается развитием дислипидемии – одной из наиболее частых причин сердечно-сосудистых осложнений СД [10]. У животных с моделью СД2 в 2 раза увеличивалось содержание циркулирующих свободных жирных кислот и триглицеридов вследствие вызванной ИР стимуляции липолиза в жировой ткани. Свободные жирные кислоты включаются в триглицериды в эктопических тканях, что еще больше усугубляет ИР. Содержание мочевины и мочевой кислоты в сыворотке крови крыс с экспериментальным СД2 увеличивалось в 2,8 и 1,6 раза по сравнению с данными группы контроля. Эти метаболические нарушения обусловлены активацией катаболизма белков, главным образом в мышцах и печени. У животных с экспериментальным СД2 появлялись симптомы нарушений функций печени: в сыворотке крови содержание альбуминов уменьшалось, активность печеночного фермента АЛТ повышалась; при этом активность АСТ и концентрация билирубина не отличались от показателей контроля (см. табл. 2).

Таким образом, на данной модели прослеживаются основные проявления нарушения углеводного, липидного и белкового обмена, характерные для патогенеза СД2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при кормлении крыс диетой с высоким содержанием жиров (55% калорий – жиры) и однократном введении панкреотоксина стрептозотоцина в низкой дозе (35 мг/кг) воспроизводятся патологические процессы, характерные для СД2. У животных с моделью СД2 не изменяется базальный уровень инсулина, но выражена гипергликемия. Это указывает на развитие инсулинорезистентности периферических тканей. Метаболические изменения коррелируют с результатами, полученными при проведении ИТТ и ГТТ, и более высоким индексом НОМА-IR. Созданная модель может использоваться для изучения патогенеза СД2, а также для исследования действия потенциальных гипогликемических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cho N.H., Shaw J.E., Karuranga S., Huang Y., Da R.F.J., Ohlrogge A.W., Malanda B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates

- of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018; 138: 271–281. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А. Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным Федерального регистра сахарного диабета, статус 2017 г. *Сахарный диабет*. 2018; 21 (3): 144–159. DOI: 10.14341/DM9686.
 3. Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51 (2): 216–226. DOI 10.1007/s00125-007-0886-7.
 4. Guo X.X., Wang Y., Wang K., Ji B.P., Zhou F. Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection. *Journal of Zhejiang University-Science B*. 2018; 19 (7): 559–569. DOI: 10.1631/jzus. B1700254.
 5. Premilovac D., Gasperini R.J., Sawyer S., West A., Keske M.A., Taylor B.V., Foa L. A new method for targeted and sustained induction of type 2 diabetes in rodents. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 14158. DOI: 10.1038/s41598-017-14114-4.
 6. Kapilevich L.V., Zakharova A.N., Dyakova E.Yu., Kironenko T.A., Milovanova K.G., Kalinnikova J.G., Chibalin A.V. Mice experimental model of diabetes mellitus type ii based on high fat diet. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (3): 53–61. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-3-53–61.
 7. Skovso S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*. 2014; 5 (4): 349–358. DOI: 10.1111/jdi.12235.
 8. Gheibi S., Kashfi K., Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomed Pharmacotherapy*. 2017; 95: 605–613. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.098.
 9. Monzillo L.U., Hamdy O. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutrition Reviews*. 2003; 61 (12): 397–412. DOI: 10.1301/nr.2003.dec.397-412.
 10. Kumar Sharma A., Bharti S., Ojha S., Bhatia J., Kumar N., Ray R., Kumari S, Singh Arya D. Up-regulation of PPAR γ , heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance, β -cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*. 2011; 106 (11): 1713–1723. DOI: 10.1017/S000711451100225X.

Вклад авторов

Кайдаш О.А. – разработка концепции и дизайна, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста. Иванов В.В. – окончательное утверждение для публикации рукописи. Венгеровский А.И. – проверка интеллектуального содержания, утверждение для публикации рукописи. Буйко Е.Е. – анализ полученных данных, написание текста. Щепеткин И.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания, утверждение рукописи для публикации.

Сведения об авторах

Кайдаш Ольга Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-8761-7537.

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

Венгеровский Александр Исаакович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фармакологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-5094-3742.

Буйко Евгений Евгеньевич, аспирант, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6714-1938.

Щепеткин Игорь Александрович, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отдел микробиологии и иммунологии, Университет штата Монтана, г. Бозман, США; ст. науч. сотрудник, Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-2139-8110.

(✉) **Кайдаш Ольга Александровна**, e-mail: kaidash_2011@mail.ru.

Поступила в редакцию 02.03.2020

Подписана в печать 25.12.2019

Частота встречаемости антигенов нейтрофилов человека и риск аллоиммунизации у доноров и больных гематологическими заболеваниями

Кробинец И.И., Минеева Н.В., Богданова И.О., Чететкин А.В.

Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии (РосНИИГТ)
Россия, 191024, г. Санкт-Петербург, 2-я Советская ул., 16

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Антигены нейтрофилов человека (Human neutrophil antigens, HNA) локализованы на гликопротеинах, расположенных на поверхностной мембране нейтрофилов. Иммунизация к HNA во время беременности или вследствие трансфузий компонентов крови может привести к выработке аллоантител. Одним из факторов развития аллоиммунизации является частота встречаемости HNA. В связи с этим представляется важным изучить особенности распределения аллелей и генотипов HNA у доноров и больных гематологическими заболеваниями г. Санкт-Петербурга для прогнозирования риска аллоиммунизации.

Цель. Оценить риск HNA аллоиммунизации у доноров и больных гематологическими заболеваниями г. Санкт-Петербурга на основании изучения частот встречаемости аллелей и генотипов HNA.

Материалы и методы. Материалом исследования служили образцы периферической крови 303 доноров г. Санкт-Петербурга и 302 больных гематологическими заболеваниями, получавших терапию в Российском научно-исследовательском институте гематологии и трансфузиологии. Геномная ДНК была выделена из цельной крови методом многоступенчатой очистки с использованием реактива цетилтриметиламмония бромид. Типирование HNA проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров. Сравнения частот встречаемости генотипов HNA у доноров, больных гематологическими заболеваниями, и представителей других популяций проводили с помощью критерия согласия Пирсона χ^2 .

Результаты. Частота встречаемости аллеля HNA-1bd составила 0,584–0,588, а HNA-1a – 0,376–0,384. Частота встречаемости аллеля HNA-1bc составила 0,032–0,036, и данный аллель был представлен в генотипах HNA-1a/bc/bd (0,023–0,036)00, HNA-1a/bc (0,020–0,043) и HNA-1bc/bd (0,007–0,010). Генотипы HNA-1bc/bc и HNA-1null выявлены не были. Аллель «а» систем HNA-3, -4, -5 встречался у большинства исследуемых в каждой группе (0,795–0,804; 0,887–0,898; 0,699–0,708 соответственно). На основании полученных частот встречаемости аллелей и генотипов рассчитали вероятность аллоиммунизации к HNA. Наибольшая величина расчетного риска аллоиммунизации при трансфузиях компонентов крови отмечена при отсутствии в генотипе аллелей HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b, HNA-4b и составляет 0,250; 0,233; 0,231 и 0,163 соответственно, что подтверждает результаты аналогичных исследований.

Заключение. Статистически значимых различий в частоте встречаемости аллелей и генотипов HNA-1, -3, -4, -5 у доноров г. Санкт-Петербурга и больных гематологическими заболеваниями не установлено. Наибольшая величина расчетного риска аллоиммунизации при трансфузиях компонентов крови, полученная на основании частот встречаемости аллелей и генотипов, отмечена при отсутствии в генотипе аллелей HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b, HNA-4b. Полученные данные согласуются с результатами исследований распределения аллелей и генотипов систем HNA в популяции европейцев и значимо отличаются от популяций Восточной и Юго-Восточной Азии, Африки и Южной Америки. Предложенный метод типирования HNA может быть использован для создания клеточной панели, типированной по антигенам нейтрофилов, с целью определения специфичности аллоантител у доноров, и для диагностики аллоиммунных конфликтов в педиатрии, трансфузиологии и трансплантологии.

Ключевые слова: антигены нейтрофилов, генотипирование, аллель-специфичная полимеразная цепная реакция.

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 пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании и согласие на забор крови. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (протокол № 56 от 26.12.2018).

Для цитирования: Кробинец И.И., Минева Н.В., Богданова И.О., Четкин А.В. Частота встречаемости антигенов нейтрофилов человека и риск аллоиммунизации у доноров и больных гематологическими заболеваниями. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 48–54. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2020-2-48-54](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-48-54).

Human neutrophil antigen allele frequencies and assessment of HNA alloimmunisation risk in donors and hematological patients

Krobinets I.I., Mineeva N.V., Bogdanova I.O., Chechetkin A.V.

*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology
16, 2-a Sovetskaya Str., St-Petersburg, 191024, Russian Federation*

ABSTRACT

Relevance. Human neutrophil antigens (HNAs) are localized on glycoproteins which are positioned on the surface membrane of human neutrophils. Alloantibodies against HNA are implicated in a number of clinical conditions, including immune-mediated neutropenia and transfusion reactions. Genotyping for HNA systems is important in the diagnosis of disorders involving alloimmunization to HNA.

Aim. To assess the risk of HNA alloimmunization in donors and patients with hematological diseases in St. Petersburg based on the study of HNA allele and genotype frequencies.

Materials and methods. DNA samples of 303 blood donors and 302 hematological patients were obtained and typed for HNA-1, -3, -4, -5. Polymerase chain reactions with homemade sequence-specific primers were used for typing. Genomic DNA was isolated from whole blood by a multistage purification method using the CTAB reagent. The results were detected in real time using the EVAGreen intercalating dye. Pearson's chi-squared test was used to compare the HNA genotype frequencies in donors, patients with hematological diseases and in other populations.

Results. In the study, the frequency of HNA-1bd allele was 0.584–0.588, of HNA-1a – 0.376–0.384, of HNA-1bc – 0.032–0.036. HNA-1bc allele was represented in the genotypes HNA-1a/bc/bd (0.023–0.036), HNA-1a/bc (0.020–0.043) and HNA-1bc/bd (0.007–0.010). The genotypes HNA-1bc/bc and HNA-1null were not identified. Allele “a” of HNA-3, -4, -5 systems was found in the majority of studied individuals (0.795–0.804; 0.887–0.898; 0.699–0.708). The highest calculated risk of HNA alloimmunization was noted in the absence of HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b, and HNA-4b alleles in the genotype and was 0.250, 0.233, 0.231, and 0.163, respectively.

Conclusions. Our data are consistent with the results of studies on the HNA allele and genotype frequencies in populations of Europeans and are significantly different from those of East and Southeast Asia, Africa and South America. The frequencies of HNA-1, -3, -4, -5 alleles and genotypes among donors in St. Petersburg and patients with hematological diseases did not have statistically significant differences. It was shown that the highest calculated risk of alloimmunization was observed in the absence of HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b, and HNA-4b alleles in the genotype. These data are consistent with the results of similar studies on populations of white Europeans conducted by other authors.

Key words: donor, neutrophil antigens, genotyping.

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

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

Conformity with the principles of ethics. All participants signed an informed consent to participate in the study and have blood samples collected. The study was approved by the local Ethics Committee of Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology (Protocol No. 56 of December 26, 2018).

For citation: Krobinec I.I., Mineeva N.V., Bogdanova I.O., Chechetkin A.V. Human neutrophil antigen allele frequencies and assessment of HNA alloimmunisation risk in donors and hematological patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 48–54. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-48-54>.

ВВЕДЕНИЕ

Антигены нейтрофилов человека (Human neutrophil antigens, HNA) локализованы на гликопротеинах, расположенных на поверхностной мембране нейтрофилов. Иммунизация к HNA во время беременности или вследствие трансфузий компонентов крови может привести к выработке аллоантител к антигенам нейтрофилов. Антитела к HNA могут стать причиной развития таких клинических состояний, как аллоиммунная нейтропения новорожденных (АНН), аутоиммунная нейтропения, острое трансфузионно-обусловленное повреждение легких (ОТОПЛ), а также фебрильные трансфузионные реакции, иммунная нейтропения после трансплантации костного мозга и лекарственно-зависимая иммунная нейтропения [1, 2]. Кроме того, по данным литературы, полиморфизм HNA является фактором риска не только вышеперечисленных состояний, но и других заболеваний, включая бактериальные инфекции (периодонтит), хронические воспалительные заболевания (васкулит, системная красная волчанка, ревматоидный артрит), а также восприимчивости к малярии [3]. Сведения о распределении HNA у доноров в Российской Федерации отсутствуют.

К настоящему времени описано пять систем HNA (HNA-1, -2, -3, -4, -5) [1].

Система HNA-1 включает антигены HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c и HNA-1d, расположенные на Fc-γ рецепторе IIIb (FcγRIIIb, CD16b). Экспрессия антигена 1b всегда сопровождается экспрессией антигена 1d или 1c. FcγRIIIb представляет собой гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный (ГФИ) гликопротеин, экспрессируемый на поверхности нейтрофилов и кодируемый геном *FCGR3B* [4].

Антиген HNA-2a расположен на ГФИ-заякоренном белке CD177, кодируемом геном *CD177* [5]. HNA-2a встречается у большинства индивидуумов; отсутствие HNA-2a обусловлено транскрипционным дефектом гена *CD177* [6].

HNA-3a и HNA-3b расположены на подобном холиновому транспортеру белке 2 (CTL 2), кодируемом геном *SLC44A2* [7].

Антигены систем HNA-4 и HNA-5 локализованы на интегринах субъединицах αM (CD11b) и αL (CD11a) и кодируются генами *ITGAM* и *ITGAL* соответственно [8].

Наличие каждого аллеля системы HNA-1 определяется комбинацией из шести однонуклеотидных замен (SNP) в гене *FCGR3B*, расположенных близко друг к другу. Системы HNA-3, -4, -5 включают два аллеля, различия между которыми обусловлены заменой одного нуклеотида в последовательности ДНК кодирующих их генов [1].

Частота встречаемости HNA является одним из факторов развития иммунного ответа [9]. В связи с этим представляется важным изучение распределения аллелей и генотипов HNA в популяции. Для изучения частоты встречаемости HNA используют серологические и молекулярно-генетические методы типирования. Однако серологическое типирование антигенов нейтрофилов может быть затруднено из-за отсутствия некоторых типизирующих реагентов, высокой стоимости и непродолжительного срока жизни нейтрофилов. Методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) являются наиболее оптимальными для типирования HNA-1, -3, -4, -5 [10], однако часто не используются в связи с отсутствием регламентирующих документов и тест-систем для типирования HNA от отечественных производителей.

Цель исследования – оценить риск HNA аллоиммунизации у доноров и больных гематологическими заболеваниями г. Санкт-Петербурга на основании изучения частот встречаемости аллелей и генотипов HNA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили образцы периферической крови 303 доноров г. Санкт-Петербурга и 302 больных гематологическими заболеваниями, получавших терапию в Российском научно-исследовательском институте гематологии и трансфузиологии. Типирование HNA проводили методом аллель-специфичной ПЦР с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров. Геномная ДНК была выделена из цельной крови методом многоступенчатой очистки с использованием реактива цетилтриметиламмония бромид. Детекцию результатов осуществляли в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя EVAGreen.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы Statistica 7.

Сравнения частот встречаемости аллелей и генотипов HNA у доноров, больных гематологическими заболеваниями, и представителей других популяций, а также проверку соответствия наблюдаемых распределений равновесию Харди – Вайнберга проводили с помощью критерия согласия Пирсона χ^2 . Уровнем статистической значимости различий считали $p < 0,05$.

Критическое значение χ^2 для аллелей систем HNA-3, -4, -5 при уровне значимости отклонения 0,05 составляет 3,84. Критическое значение χ^2 для аллелей системы HNA-1 при уровне значимости отклонения 0,05 составляет 5,991.

Для оценки вероятности аллоиммунизации к антигенам HNA использовали следующие формулы:

– вероятность аллоиммунизации к аллелю «а» = $(aa + ab) \times bb$,
 – вероятность аллоиммунизации к аллелю «b» = $(bb + ab) \times aa$,
 где aa, ab, bb – частоты соответствующих генотипов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Олигонуклеотидные праймеры для типирования HNA методом аллель-специфичной ПЦР были разработаны с помощью программ Primer 3.0 и Primer-BLAST.

Последовательности олигонуклеотидных праймеров для типирования антигенов систем HNA-1, -3, -4, -5 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Последовательность олигонуклеотидных праймеров для типирования HNA-1, -3, -4, -5			
Антиген	Ген	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')
HNA-1a	<i>FCGR3B</i>	CCTCAATGGTACAGGGTGCTC	GCCTGGCTTGAGATGAGGTT
HNA-1b/c	<i>FCGR3B</i>	CCTCAATGGTACAGCGTGCTT	CACTGTCGTTGACTGTGGCAT
HNA-1b/d	<i>FCGR3B</i>	CCTCAATGGTACAGCGTGCTT	ACTGTCGTTGACTGTGGCAG
HNA-3a	<i>SLC44A2</i>	CTACCTCACGTACCTGAATGCT	GCAGGGCAGTCACCATCTC
HNA-3b	<i>SLC44A2</i>	CTACCTCACGTACCTGAATGCT	GCAGGGCAGTCACCATCTT
HNA-4a	<i>ITGAM</i>	CTCATGCGAGCCCATCCG	ACAAGGAGGTCTGACGGTGA
HNA-4b	<i>ITGAM</i>	CTCATGCGAGCCCATCCA	ACAAGGAGGTCTGACGGTGA
HNA-5a	<i>ITGAL</i>	ATCATCCCCACAGATCCAG	AGCTGGACCCAGTAAGCATC
HNA-5b	<i>ITGAL</i>	ATCATCCCCACAGATCCAC	AGCTGGACCCAGTAAGCATC

Примечание. Нуклеотиды, комплементарные SNP, определяющие наличие антигена, выделены жирным шрифтом.

Для анализа специфичности праймеров использовали образцы ДНК 20 доноров, последовательности аллелей HNA-1, -3, -4, -5 которых были определены методом секвенирования. Соответствие результатов секвенирования и аллель-специфичной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени, а также методом гель-электрофореза в агарозном геле составило 100%. По результатам электрофоретического разделения неспецифические продукты ПЦР выявлены не были.

Условия проведения ПЦР в реальном времени для аллелей HNA-1, -3, -4, -5 были одинаковыми. Для анализа использовали реакционную (2,5×) смесь для проведения ПЦР в присутствии EVAGreen фирмы «Синтол» (г. Москва), в состав которой входят ПЦР (2,5×) буфер Б (6,25 ммоль $MgCl_2$, KCl,

ТрисHCl (pH 8,8)), SynTaq ДНК-полимераза, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20. Для проведения ПЦР в каждую пробирку добавляли смесь, содержащую 50–100 нг геномной ДНК, реакционную (1×) смесь фирмы «Синтол», по 0,2 мкмоль прямого и обратного праймеров. Конечный объем смеси доводили до 25 мкл бидистиллированной водой. Для проведения ПЦР использовали следующий протокол: 95° – 5 мин, 33 цикла: 95° – 20 с, 68° – 30 с.

Частоты встречаемости аллелей и генотипов HNA-1, -3, -4, -5 у доноров г. Санкт-Петербурга и больных гематологическими заболеваниями представлены в табл. 2. Отклонение наблюдаемого распределения генотипов от ожидаемого у больных гематологическими заболеваниями и доноров не было статистически значимым.

Таблица 2

Сравнение частот встречаемости генотипов и аллелей систем HNA у доноров и больных гематологическими заболеваниями							
Система	Генотип	Пациенты, n = 302	Доноры, n = 303	χ^2 p	Аллель	Пациенты, n = 302	Доноры, n = 303
HNA-1	a/a	0,142	0,142	$\chi^2 = 0,172$, $p = 0,918$	a	0,376	0,384
	a/bc/bd	0,023	0,036		bd	0,588	0,584
	a/bc	0,043	0,020		bc	0,036	0,032
	a/bd	0,411	0,442		–	–	–
	bc/bd	0,007	0,010		–	–	–
	bd/bd	0,374	0,350		–	–	–

Окончание табл. 2

Система	Генотип	Пациенты, n = 302	Доноры, n = 303	χ^2, p	Аллель	Пациенты, n = 302	Доноры, n = 303
HNA-3	a/a	0,623	0,650	$\chi^2 = 0,150,$ $p = 0,699$	a	0,795	0,804
	a/b	0,343	0,307		b	0,205	0,196
	b/b	0,033	0,043		–	–	–
HNA-4	a/a	0,788	0,802	$\chi^2 = 0,321,$ $p = 0,571$	a	0,887	0,898
	a/b	0,199	0,191		b	0,113	0,102
	b/b	0,013	0,007		–	–	–
HNA-5	a/a	0,500	0,488	$\chi^2 = 0,124,$ $p = 0,725$	a	0,699	0,708
	a/b	0,397	0,439		b	0,301	0,292
	b/b	0,103	0,073		–	–	–

Как видно из табл. 2, частоты встречаемости генотипов HNA-1, -3, -4, -5 у больных гематологическими заболеваниями, получавших терапию в Российском научно-исследовательском институте гематологии и трансфузиологии, не имели статистически значимых различий от таковых у доноров г. Санкт-Петербурга. В обследуемых нами группах частота встречаемости аллеля HNA-1bd была выше (0,584–0,588), чем HNA-1a (0,376–0,384). Частота встречаемости HNA-1bc составляла 0,032–0,036, и данный аллель был представлен в генотипах HNA-1a/bc/bd (0,023–0,036), HNA-1a/bc (0,020–0,043) и HNA-1bc/bd (0,007–0,010). Генотипы HNA-1bc/bc и HNA-1null выявлены не были. Аллель «а» систем HNA-3, -4, -5 встречался у большинства исследуемых в каждой группе (0,795–0,804; 0,887–0,898; 0,699–0,708). Распространенность HNA-5a составила 0,699–0,708.

Так как частоты встречаемости генотипов HNA-1, -3, -4, -5 у больных гематологическими заболеваниями и доноров г. Санкт-Петербурга не имели статистически значимых различий, оценку возможного риска аллоиммунизации против антигенов систем HNA рассчитывали на основании полученных данных о встречаемости аллелей и генотипов HNA в группе, объединяющей доноров и больных гематологическими заболеваниями (табл. 3).

Таблица 3

Оценка возможного риска аллоиммунизации по HNA-1, -3, -5 при трансфузиях компонентов крови

HNA 1a	HNA 1bd	HNA 1bc	HNA 3a	HNA 3b	HNA 4a	HNA 4b	HNA 5a	HNA 5b
0,233	0,143	0,064	0,037	0,231	0,01	0,163	0,080	0,250

Как видно из представленных данных, наибольшая величина расчетного риска аллоиммунизации при трансфузиях компонентов крови отмечена при отсутствии в генотипе аллелей HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b, HNA-4b и составляла 0,250; 0,233; 0,231 и 0,163 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные согласуются с результатами исследований распределения аллелей и геноти-

пов HNA в популяции европейцев [9] и значительно отличаются от других популяций. Так, в популяциях Юго-Восточной Азии, Китая и Японии частота встречаемости аллеля HNA-1a была статистически значимо выше и составляла 0,696; 0,667 и 0,623 соответственно ($p < 0,001$) [11]. Частота встречаемости HNA-3a составила 0,795–0,804, что значимо превышало таковую в популяции Японии (0,654) [12], и была статистически значимо ниже, чем в популяциях Замбии (0,974) и Бразилии (1,0) ($p < 0,001$) [13, 14]. Частота встречаемости HNA-4a составила 0,887–0,898, и этот показатель был значимо ниже, чем в популяциях Китая и Бразилии – 0,995 и 1,0 соответственно ($p < 0,001$) [14, 15]. Полученная частота встречаемости HNA-5a была статистически значимо выше, чем в популяции Замбии (0,5) [13], но статистически значимо ниже, чем в популяциях Китая (0,852), Японии (0,840) и Бразилии (0,855) ($p < 0,001$) [12, 14, 15].

На основании полученных частот встречаемости аллелей и генотипов рассчитали вероятность аллоиммунизации к HNA. Наибольшая величина расчетного риска аллоиммунизации при трансфузиях компонентов крови отмечена при отсутствии в генотипе аллелей HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b, HNA-4b и составляла 0,250; 0,233; 0,231 и 0,163 соответственно, что подтверждает результаты аналогичных исследований, проведенных другими авторами в популяции белых европейцев [10].

Полученные данные могут быть полезны для прогнозирования клинических состояний, связанных с аллоиммунизацией. Однако вероятность развития иммунного ответа в высокой степени зависит от иммуногенности антигена и других факторов, что может объяснять несоответствие расчетного риска аллоиммунизации и существующих данных о специфичности выявленных аллоантител к HNA. Так, например, при низком расчетном риске аллоиммунизации к HNA-3a (0,37) такие антитела приводят к развитию ОТОПЛ. Известно, что анти-HNA-3a аллоантитела, содержащиеся в донорской плазме, являются одной из причин развития ОТОПЛ тяжелого течения с летальным исходом [12].

Несмотря на высокий расчетный риск аллоиммунизации к HNA-3b, описаны редкие случаи АНН, вызванной аллоантителами анти-HNA-3b, и в литературе не встречаются данные о случаях ОТОПЛ, вызванного такими антителами. Наиболее частой причиной развития АНН в популяции белых европейцев являются аллоантитела к HNA-1a, -1b, -1c и -2a [16], однако в литературе описаны случаи АНН, вызванной аллоантителами к HNA-1d, -3a, -3b, -4a, -4b, -5a [17, 18].

В клинической практике трансфузии гранулоцитного концентрата осуществляют пациентам при значительном снижении абсолютного количества гранулоцитов в крови при наличии инфекции, неконтролируемой антибактериальной терапией, а также при сепсисе новорожденных. В случае переливания несовместимого по антигенам нейтрофилов гемокомпонента у пациента повышается риск развития аллоиммунизации и, как следствие, отмечается отсутствие клинического эффекта трансфузии [19]. Таким пациентам требуется индивидуальный подбор по антигенам систем HNA и HLA. Наличие базы типированных по HNA доноров будет способствовать профилактике аллоиммунизации. Создание клеточной панели, типированной по антигенам нейтрофилов, поможет решить проблему диагностики аллоиммунных конфликтов в педиатрии, трансфузиологии и трансплантологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило изучить особенности распределения аллелей и генотипов HNA у доноров г. Санкт-Петербурга и больных гематологическими заболеваниями и оценить возможный риск HNA аллоиммунизации. Статистически значимых различий в частоте встречаемости аллелей и генотипов HNA-1, -3, -4, -5 у доноров г. Санкт-Петербурга и больных гематологическими заболеваниями не установлено. Наибольшая величина расчетного риска аллоиммунизации при трансфузиях компонентов крови отмечена при отсутствии в генотипе аллелей HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b, HNA-4b, что подтверждает результаты аналогичных исследований, проведенных другими авторами в популяции белых европейцев. Полученные данные могут быть полезны для прогнозирования клинических состояний, связанных с аллоиммунизацией. Однако процесс иммунизации после трансфузии и (или) во время беременности связан не только с антигенной несовместимостью, но также зависит от иммуногенности антигена, генетических, эпигенетических факторов и факторов внешней среды, что может объяснять несоответствие расчетного риска аллоиммунизации и су-

ществующих данных о специфичности выявленных аллоантител к HNA.

Представленные данные могут быть полезны для профилактики аллоиммунизации, а также для популяционных исследований. Предложенный метод типирования HNA может быть использован для создания клеточной панели, типированной по антигенам нейтрофилов, с целью определения специфичности аллоантител у доноров, а также для диагностики аллоиммунных конфликтов в педиатрии, трансфузиологии и трансплантологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bux J. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang.* 2008; 94 (4): 277–285. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2007.01031.x.
2. Reil A., Keller-Stanislawski B., Gunay S., Bux J. Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang.* 2008; 95 (4): 313–317. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01092.x.
3. Adu B., Dodoo D., Adukpo S., Hedley P.L., Gerds T., Larsen S.O., Christiansen M., Theisen M. Fc γ receptor IIIb (Fc γ RIIIb) polymorphisms are associated with clinical malaria in Ghanaian children. *PLoS One.* 2012; 7 (9): 46197. DOI: 10.1371/journal.pone.0046197.
4. Reil A., Sachs U.J., Sihanidou T., Flesch B.K., Bux J. HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fc γ receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. *Transfusion.* 2013; 53 (10): 2145–2151. DOI: 10.1111/trf.12086.
5. Lalezari P., Murphy G.B., Allen F.H. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *Journal of Clinical Investigation.* 1971; 50 (5): 1108–1115. DOI: 10.1172/JCI106582.
6. Kissel K., Scheffler S., Kerowgan M., Bux J. Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. *Blood.* 2002; 99 (11): 4231–4233. DOI: 10.1182/blood.v99.11.4231.
7. Curtis B.R., Cox N.J., Sullivan M.J., Konkashbaev A., Bowers K., Hansen K. et al. The neutrophil alloantigen HNA-3a (5b) is located on choline transporter-like protein 2 and appears to be encoded by an R > Q154 amino acid substitution. *Blood.* 2010; 115 (10): 2073–2076. DOI: 10.1182/blood-2009-11-248336.
8. Harris E.S., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A. The leukocyte integrins. *Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275 (31): 23409–23412. DOI: 10.1074/jbc.R000004200.
9. Cardoso S.P., Chong W., Lucas G., Green A., Navarrete C. Determination of human neutrophil antigen-1, -3, -4 and -5 allele frequencies in English Caucasoid blood donors using a multiplex fluorescent DNA-based assay. *Vox Sang.* 2013; 105 (1): 65–72. DOI: 10.1111/vox.12016.
10. Clay M.E., Schuller R.M., Bachowski G.J. Granulocyte serology: current concepts and clinical significance. *Immunohematology.* 2010; 26 (1): 11–21.
11. Simtong P., Puapairoj C., Leelayuwat C. et al. Assessment of HNA alloimmunisation risk in Northeastern Thais, Burmese and Karen. *Transfusion Medicine.* 2018; 28 (1): 47–55. DOI: 10.1111/tme.12431.

12. Matsuhashi M., Tsuno N.H., Kawabata M., Mishima Y., Okochi N., Santoso S., Tozuka M., Takahashi K. The frequencies of human neutrophil alloantigens among the Japanese population. *Tissue Antigens*. 2012; 80 (4): 336–340. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2012.01930.x.
13. Nielsen K.R., Koelbaek M.D., Varming K. et al. Frequencies of HNA-1, HNA-3, HNA-4, and HNA-5 in the Danish and Zambian populations determined using a novel TaqMan real time polymerase chain reaction method. *Tissue Antigens*. 2012; 80: 249–253. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2012.01912.x.
14. Lopes L.B., Baleotti W. Jr., Suzuki R.B., Fabron A., Chiba A.K., Vieira-Filho J.P.B., Castro B.S., Kuniyoshi A.M., Bordin J.O. HNA-3 gene frequencies in Brazilians and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-3a/3b genotyping. *Transfusion*. 2014; 54 (6): 1619–1621. DOI: 10.1111/trf.12493.
15. Xia W., Bayat B., Sachs U. et al. The frequencies of human neutrophil alloantigens in the Chinese Han population of Guangzhou. *Transfusion*. 2011; 51 (6): 1271–1277. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02979.x.
16. Van den Tooren-de Groot R., Ottink M., Husikes E., van Rossum A., van der Voorn B., Slomp J., Porcelijn L. Management and outcomes of 35 cases with foetal/neonatal alloimmune neutropenia. *Acta Paediatrica*. 2014; 103 (11): e467–474. DOI: 10.1111/apa.12741.
17. Lopes L.B., Abbas S.A., Moritz E., Martins J.O., Chiba A.K., Langhi D.M. Jr, Bordin J.O. Antibodies to human neutrophil antigen HNA-3b implicated in cases of neonatal alloimmune neutropenia. *Transfusion*. 2018; 58 (5): 1264–1270. DOI: 10.1111/trf.14524.
18. Curtis B.R., Roman A.S., Sullivan M.J., Raven C.S., Larison J., Weitekamp L.A. Two cases of maternal alloimmunization against human neutrophil alloantigen-4b, one causing severe alloimmune neonatal neutropenia. *Transfusion*. 2016; 56 (1): 101–106. DOI: 10.1111/trf.13287.
19. Dankme M. B., Keashen M., Alavi J. B., Koch P. A., Eisenstaedt R. Granulocyte transfusions and outcome of alloimmunized patients with gram-negative sepsis. *Transfusion*. 1982; 22 (5): 374–378. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1982.22583017461.x.

Сведения об авторах

Кробинец Ирина Ивановна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, РосНИИГТ, г. Санкт-Петербург. ORCID 0000-0002-6404-2387.

Минеева Наталья Витальевна, д-р биол. наук, профессор, рук. лаборатории изосерологии, РосНИИГТ, г. Санкт-Петербург. ORCID 0000-0001-7137-8877.

Богданова Ирина Олеговна, лаборант-исследователь, РосНИИГТ, г. Санкт-Петербург.

Чечеткин Александр Викторович, д-р мед. наук, профессор, директор РосНИИГТ, г. Санкт-Петербург. ORCID 0000-0002-7569-0697.

(✉) **Кробинец Ирина Ивановна**, e-mail: transfusion_spb@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Нарушение целостности эндотелиального монослоя биопротезов клапанов сердца как триггер развития первичной тканевой несостоятельности

Мухамадияров Р.А.¹, Рутковская Н.В.², Кутихин А.Г.¹, Мильто И.В.^{3,4}, Сидорова О.Д.⁵, Барбараш Л.С.¹

¹ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ) Россия, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

² Федеральный медицинский биофизический центр (ФМБЦ) имени А.И. Бурназяна Россия, 123098, г. Москва, ул. Маршала Новикова, 23

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

⁴ Северский биофизический научный центр (СБН Центр) Россия, 636013, г. Северск, пер. Чекист, 7, корп. 2

⁵ Кемеровский государственный медицинский университет (КемГМУ) Россия, 650029, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а

РЕЗЮМЕ

Цель – морфологическое исследование поверхности и клеточного состава створок некальцинированных биопротезов клапанов сердца (БКС) с различной степенью их повреждения для определения возможных механизмов развития первичной тканевой несостоятельности (ПТН).

Материалы и методы. Исследовано шесть ксеноаортальных клапанов «КемКор» и «ПериКор», извлеченных из митральной позиции по причине развития ПТН. Структуру створок БКС и особенности ее изменения изучали гистологическим (окраска гематоксилин-эозином) и иммуногистохимическим методами. Иммуногистохимическое исследование БКС включало идентификацию маркеров: CD3 (Т-лимфоциты), CD20 (В-лимфоциты), CD31 и CD34 (эндотелиальные клетки), CD68 (моноциты/макрофаги), виментин (клетки мезенхимального ряда), α -гладкомышечный актин (гладкомышечные клетки).

Результаты. Степень нарушения структуры створок БКС при ПТН существенно различалась: определялись относительно сохранные образцы с интактным эндотелиальным монослоем на поверхности створки, образцы с минимальным или умеренным нарушением структуры эндотелиального слоя и образцы с выраженной деструкцией эндотелиального слоя створки БКС. В составе БКС были идентифицированы эндотелиальные клетки (монослой с сохраненной или нарушенной целостностью), макрофаги, гладкие миоциты и прочие клетки мезенхимального происхождения. Следует отметить, что нами не обнаружено Т- и В-лимфоцитов в створках БКС.

Заключение. Характерным признаком структуры БКС, эксплантированных по причине ПТН, является нарушение целостности эндотелиального монослоя в участках дезинтеграции экстрацеллюлярного матрикса. Кроме того, в сравнении с другими типами протезных дисфункций ПТН отличается отсутствием лимфоцитарной инфильтрации. На основании полученных данных можно сделать вывод о триггерной роли дезинтеграции эндотелиального монослоя в развитии ПТН.

Ключевые слова: биопротезы клапанов сердца, первичная тканевая несостоятельность, экстрацеллюлярный матрикс.

✉ Мухамадияров Ринат Авхадиевич, e-mail: rem57@rambler.ru.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (протокол № 8 от 14.05.2019).

Для цитирования: Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Кутихин А.Г., Мильто И.В., Сидорова О.Д., Барбараш Л.С. Нарушение целостности эндотелиального монослоя биопротезов клапанов сердца как триггер развития первичной тканевой несостоятельности. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 55–62. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-55-62>.

Endothelial monolayer disruption in bioprosthetic heart valve as a trigger of primary tissue failure

Mukhamadiyarov R.A.¹, Rutkovskaya N.V.², Kutikhin A.G.¹, Milto I.V.^{3,4}, Sidorova O.D.⁵, Barbarash L.S.¹

¹ *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation*

² *A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center
23, Marshal Novikova Str., Moscow, 123098, Russian Federation*

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

⁴ *Seversk Biophysical Research Centre
7, Chekist Lane, Seversk, 636013, Russian Federation*

⁵ *Kemerovo State Medical University
22a, Voroshilova Str., Kemerovo, 650029, Russian Federation*

ABSTRACT

Aim. To study the surface and cellular composition of non-calcified bioprosthetic heart valve (BHV) leaflets with varying degrees of structural deterioration to determine the possible mechanisms of primary tissue failure development.

Materials and methods. An examination of six bioprosthetic heart valves (KemCor and PeriCor) extracted from mitral position due to the structural valve deterioration was performed. The structure of BHV leaflets was studied by hematoxylin – eosin staining and immunohistochemistry assay (with the following indicators – CD3, T lymphocytes; CD20, B lymphocytes; CD31, mature endothelial cells; CD34, endothelial progenitor cells; CD68, monocytes/macrophages; vimentin, mesenchymal cells; α -smooth muscle actin, vascular smooth muscle cells).

Results. The degree of disruption of BHV leaflets in primary tissue failure differed significantly: relatively intact samples with the intact endothelial monolayer, areas with impairment of the surface layers (minimal and moderate damage) and areas with the spread of destruction into the extracellular matrix of the leaflet (expressed degeneration) were determined. Endothelial cells (monolayer with preserved or impaired integrity), macrophages, smooth muscle cells and other mesenchymal lineage cells were identified in BHV. T- and B-lymphocytes were not detected in the BHV leaflets.

Conclusions. A characteristic feature of structurally deteriorated BHVs is impairment of endothelial monolayer integrity in areas of degraded extracellular matrix. In contrast to other types of bioprosthetic dysfunctions, structural valve deterioration was characterized by the absence of lymphocyte infiltration. Therefore, we suppose that endothelial monolayer injury is a trigger of structural BHV deterioration.

Key words: bioprosthetic heart valves, structural valve deterioration, extracellular matrix.

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

Source of financing. The study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No. 0546-2019-0002 “Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors”.

Conformity with the principles of ethics. The research protocol was approved by the local Ethics Committee of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (Protocol No. 8, of May 14, 2019). Prior to enrollment in the study, all patients signed an informed consent.

For citation: Mukhamadiyarov R.A., Rutkovskaya N.V., Kutikhin A.G., Milto I.V., Sidorova O.D., Barbarash L.S. Endothelial monolayer disruption in bioprosthetic heart valve as a trigger of primary tissue failure. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 55–62. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-55-62>.

ВВЕДЕНИЕ

Общепризнанным недостатком биопротезов клапанов сердца (БКС) является ограниченность срока их функционирования, обусловленная развитием структурной недостаточности имплантированного ксеноматериала – первичной тканевой несостоятельности (ПТН) под влиянием различных факторов, ассоциированных с особенностями имплантатов и (или) организма реципиента [1, 2]. Наиболее распространенными вариантами дисфункций БКС, требующими проведения операции по замене протеза, являются тканевая кальцификация (50%) и протезный эндокардит (27%). В значительно меньшем числе случаев (15,1%) реоперации выполняли по поводу развития первичной тканевой несостоятельности [3].

В ряде работ продемонстрировано активное участие клеток реципиента в формировании как кальций-ассоциированных повреждений имплантированного ксеногенного материала, так и дегенеративных изменений структуры БКС, обусловленных воздействием инфекционных агентов [4, 5]. Кроме того, идентификация различных типов клеток в составе функционально сохранных БКС [6, 7] позволяет предполагать перманентное ремоделирование ксеноткани после ее имплантации в организм, подразумевающее параллельное течение процессов ее дезинтеграции и репарации [7]. С одной стороны, это дает основание рассматривать кальцификацию в ка-

честве финального этапа деструкции БКС, неизбежно возникающей с течением времени, а с другой – не исключает реализацию принципиально иного сценария развития асептических структурных дисфункций, имплантированных БКС в зависимости от типа ремоделирования.

Цель настоящей работы состояла в морфологическом исследовании поверхности и клеточного состава створок некальцинированных БКС с различной степенью повреждения ксеноткани для определения возможных механизмов развития первичной тканевой несостоятельности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано шесть ксеноаортальных БКС моделей: «КемКор» ($n = 2$) и «ПериКор» ($n = 4$) (ЗАО «Неокор», г. Кемерово), консервированных диглицидиловым эфиром этиленгликоля и извлеченных из митральной позиции при повторных хирургических вмешательствах в связи с развитием структурной несостоятельности тканей БКС без отложения минеральных включений по данным компьютерной томографии. Учитывая различия условий функционирования имплантированных клапанов, обусловленные влиянием гемодинамических нагрузок разной силы [1, 8], в исследование были включены лишь БКС, удаленные из митральной позиции. Когорту реоперированных больных составили 5 женщин и 1 мужчина. Средний возраст пациентов на момент

выполнения повторных операций – $63,5 \pm 4,8$ года при средней продолжительности функционирования БКС $7,3 \pm 3,1$ года.

Для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследований БКС целиком помещали в 4%-й раствор параформальдегида на 48 ч. После фиксации из створок вырезали фрагменты для последующей гистологической проводки и заливки в парафиновую смесь Histomix (БиоВитрум, Россия). Из парафиновых блоков на полуавтоматическом ротационном микротоме (МЗП-01 Техном, Россия) готовили срезы (5 мкм), которые монтировали на предметные стекла с поли-L-лизинным покрытием (Thermo Scientific, США). Срезы БКС окрашивали гематоксилин-эозином, а также проводили ИГХ-исследование. Верификация отсутствия кальция в эксплантированных БКС осуществлялась окраской ализариновым красным.

ИГХ-типирование клеток выполняли с использованием следующих маркеров: CD3 (Т-лимфоциты), CD20 (В-лимфоциты), CD31, CD34 (гемопозитические клетки-предшественники), CD68 (моноциты/макрофаги), виментин (клетки мезенхимального ряда), α -гладкомышечный актин (гладкомышечные клетки). В работе применяли моноклональные мышиные (CD3, CD20, CD34, CD68, виментин) и кроличьи (CD31, α -гладкомышечный актин) антитела фирм-производителей Novocastra Laboratories (Великобритания), Thermo Scientific (США) и Spring Bioscience, реагирующие с антигенами человека.

Для выявления описанных выше маркеров проводили высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0,01 М, pH 6,0) – α -гладкомышечный актин, CD68, CD31, CD34, CD3; в трис-ЭДТА буфере (pH 9,0) – виментин; без демаскировки – CD20. Блокирование эндогенной пероксидазы, разведение первичных антител и время их экспозиции определяли согласно протоколам производителей первичных антител. Для обнаружения результатов ИГХ-реакции использовали полимерную визуализирующую систему Novolink Polymer Detection System (Novocastra, Великобритания). Иммуноферментную реакцию останавливали, промывая срезы в фосфатном буфере (pH 7,4), после чего докрасивали гематоксилином Майера и заключали в монтирующую среду. Параллельно с выявлением антигенов при каждом ИГХ окрашивании проводили постановку положительного и отрицательного контролей. Отрицательный контроль осуществляли путем нанесения на срезы 50 мкл раствора для разведения антител (Ab Diluent, США). Положительный контроль CD3, CD20 и CD68 маркеров прово-

дили на срезах небной миндалины человека, CD31, CD34, виментина и α -гладкомышечного актина – на срезах лучевой артерии человека. Исследования препаратов и фотосъемку выполняли на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с помощью цифровой камеры Canon G5 (Canon, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Степень нарушения структуры створок БКС значительно различалась, что позволило условно выделить следующие группы: образцы с интактным эндотелиальным слоем на поверхности створки БКС, образцы с минимальным или умеренным нарушением структуры эндотелиального слоя створок БКС и образцы с выраженной деструкцией эндотелиального покрова створок БКС, которая распространяется внутрь створки и сопровождается разрушением ее экстрацеллюлярного матрикса.

В образцах с интактным эндотелиальным слоем на предсердной и желудочковой поверхностях створок БКС наблюдали монослой клеток, морфологически соответствующих эндотелиоцитам. На желудочковой поверхности (выводной отдел) монослой представлен уплощенными клетками с вытянутыми ядрами (рис. 1, *a*). На предсердной поверхности клетки имели округлые ядра и более выраженную цитоплазму (рис. 1, *b*). Слой эндотелиоцитов на желудочковой поверхности представляется более тонким, чем на предсердной. При ИГХ-исследовании створок БКС выявлено CD31-положительное окрашивание плоских клеток на обеих поверхностях, подтверждающее их эндотелиальный фенотип (рис. 1, *c*). Отсутствие положительного окрашивания на CD34, в свою очередь, свидетельствовало о зрелости эндотелиальных клеток (рис. 1, *d*).

Строма БКС была представлена компактными, плотно упакованными пучками коллагеновых волокон, сохранившими интактную извитость и тинкториальные свойства (рис. 1, *a, b*). При этом в поверхностных слоях створок наблюдали более плотное, а в глубоких – рыхлое расположение волокон. В некоторых участках присутствовали небольшие полости с прозрачным содержимым (рис. 1, *a, b*).

В образцах с минимальным или умеренным повреждением створок БКС наблюдали нарушение целостности эндотелиального слоя с наличием участков, содержащих морфологически различные клетки, образующие многослойные или однослойные структуры (рис. 2). В части исследуемых образцов также отмечена клеточная инфильтрация нижележащих соединительнотканых структур створки БКС (рис. 2, *b*). При этом строма створок БКС харак-

теризовалась умеренной неоднородностью: в поверхностных слоях – разрыхлением и истончением пучков коллагеновых волокон с расширением межфибриллярных пространств и формированием ячеистых сетей, в глубоких – относительной интактно-стью экстрацеллюлярного матрикса (рис. 2, *a, b*).

В зонах дезорганизации волокнистых структур выявляли присутствие CD68-положительных клеток, относящихся к системе мононуклеарных фагоцитов (рис. 2, *c, d*). Среди них, кроме типичных макрофагов, идентифицировали отдельные многоядерные клетки (клетки Пирогова – Лангханса).

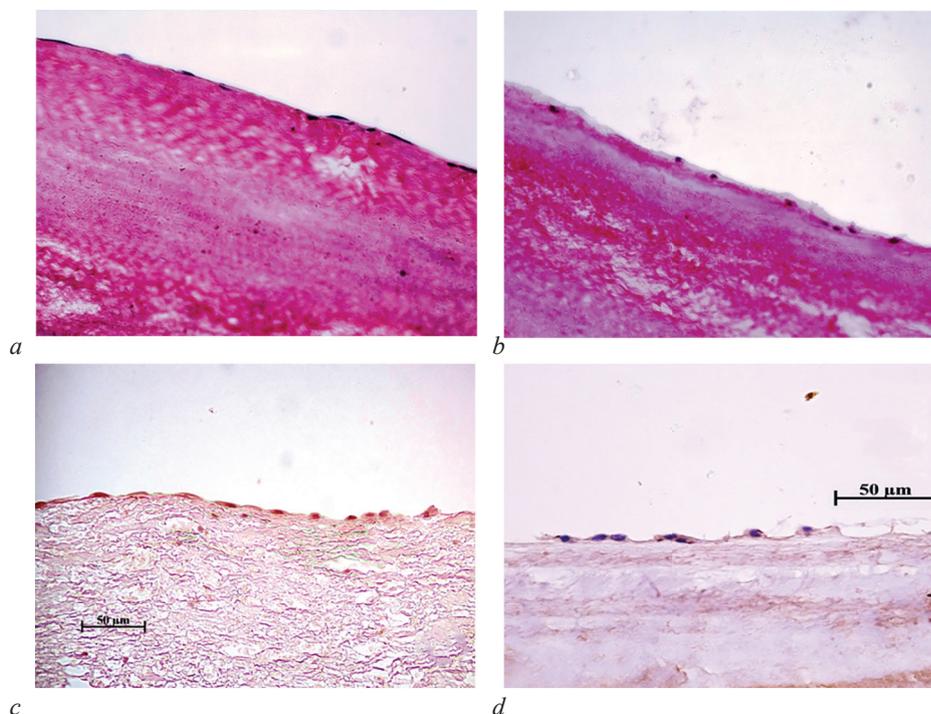


Рис. 1. Строение створок биопротезов клапанов сердца в участках с минимальным повреждением их структуры, $\times 200$: *a* – эндотелий желудочковой поверхности, *b* – эндотелий предсердной поверхности (окраска гематоксилин-эозином), *c* – ИГХ на CD31, *d* – ИГХ на CD34

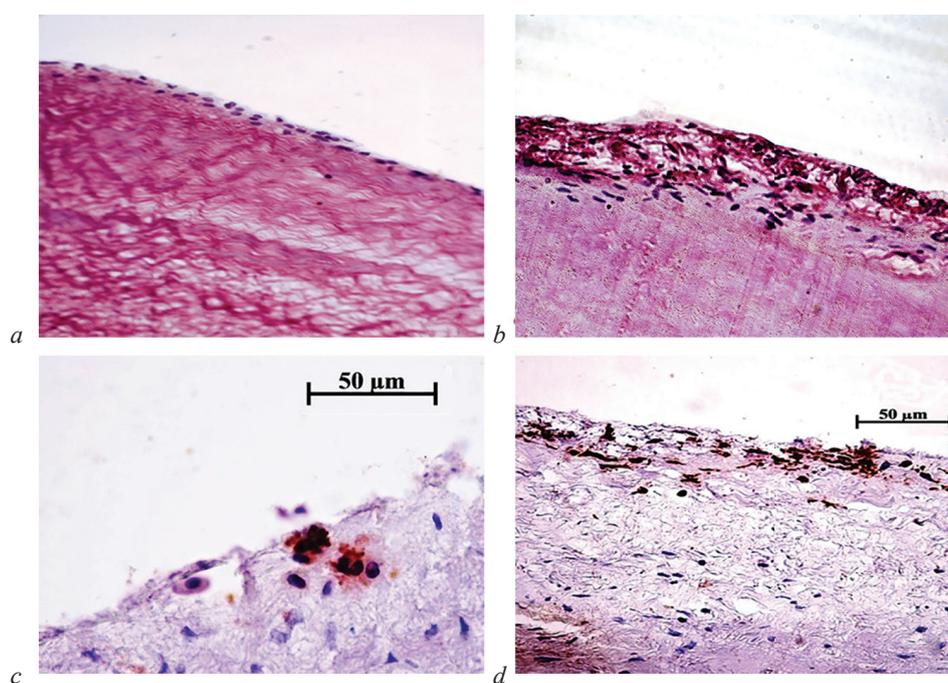


Рис. 2. Строение створок биопротезов клапанов сердца с умеренным их повреждением: *a, b* – окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$, *c* – ИГХ на CD68, $\times 400$, *d* – ИГХ на виментин, $\times 200$

В поверхностных слоях экстрацеллюлярного матрикса, преимущественно в участках нарушения эндотелиального монослоя, также были обнаружены виментин-положительные клетки, располагающиеся поодиночке или в виде групп, что указывало на их принадлежность к клеткам линии механоцитов (см. рис. 2, *d*).

В образцах с выраженной деструкцией поверхности створок БКС отмечали отсутствие монослоя эндотелиоцитов, что ассоциировалось с глубокой дезорганизацией их соединительнотканной основы (рис. 3). Расслоение пучков коллагеновых волокон сочеталось с их фрагментацией и формированием многочис-

ленных полостей (рис. 3, *a*). При этом вся толщина створки была инфильтрирована клетками. В зонах наибольшей деструкции выявляли как CD68-положительные, так и α -гладкомышечный актин-позитивные клетки. CD68-положительные клетки группировались преимущественно вокруг полостей, примыкая к остаткам коллагеновых волокон (рис. 3, *b, c*). В толще створок БКС среди разрушенных соединительнотканых структур также обнаруживали единичные гладкомышечные клетки (рис. 3, *d*).

Следует отметить, что во всех трех группах образцов не наблюдали положительного ИГХ-окрашивания на Т- и В-лимфоциты.

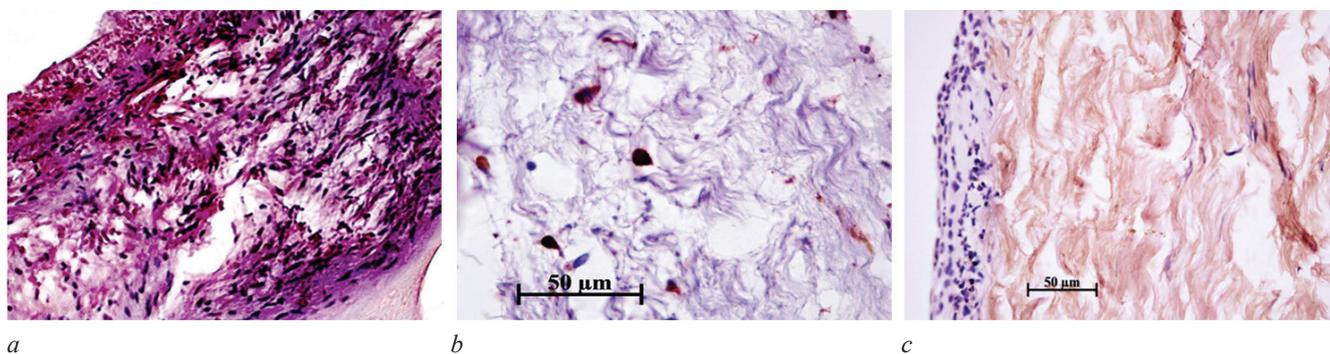


Рис. 3. Строение створок биопротезов клапанов сердца с выраженной деструкцией их поверхности и стромы: *a* – окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$, *b* – ИГХ на CD68, $\times 400$, *c* – ИГХ на α -гладкомышечный актин, $\times 200$

ОБСУЖДЕНИЕ

Ценность представленных морфологических данных для понимания механизмов развития дегенеративных изменений имплантированных БКС в организме реципиента прежде всего состоит в отсутствии ее инфицирования и кальцификации. Таким образом, уже на этапе формирования групп исследования были исключены те дисфункции БКС, в возникновении которых важную роль играют особенности иммунологического и метаболического статуса пациентов, приводящие как к снижению микробной резистентности биоматериала, так и к его выраженной минерализации [1]. Результаты исследования позволяют предполагать, что различные степени повреждения экстрацеллюлярного матрикса можно рассматривать как последовательные стадии процесса деструкции створок БКС.

На начальном этапе развития тканевой несостоятельности, т.е. в образцах с интактной структурой, обе поверхности покрыты непрерывным слоем зрелого эндотелия (CD31+). При этом морфологические характеристики эндотелиальных клеток имели некоторые различия. Со стороны оттока для эндотелиоцитов были характерны уплощенная форма, тонкий слой цитоплазмы и вытянутые ядра с преобладанием

гетерохроматина. Со стороны притока эндотелиальные клетки были выше, чем на предсердной поверхности, имели круглые ядра, в которых преобладал эухроматин. Такие различия в структуре эндотелиоцитов, вероятно, обусловлены влиянием гемодинамических факторов и могут свидетельствовать и о разной метаболической активности этих клеток.

Высокая степень сохранности экстрацеллюлярного матрикса, являющегося совместно с клетками стромы створок, в свою очередь, позволяет предполагать возможную защитную функцию эндотелия в отношении повреждения БКС агрессивными факторами крови [5, 6]. Вместе с тем присутствие в этих образцах участков с расслоением коллагеновых волокон свидетельствовало о начале деструктивных процессов, вероятно, вызванных продолжительными циклическими деформациями, испытываемыми имплантируемыми БКС [9, 10].

Образцы с минимальной и умеренной деструкцией створок рассматриваются нами в качестве следующего этапа развития ПТН без минерализации ксеноматериала. Можно предположить, что дезинтеграция эндотелиального слоя может являться триггером развития гемодинамически значимых повреждений структуры БКС. Причинами данного процесса

могут быть механическое разрушение эндотелиоцитов и обнажение экстрацеллюлярного матрикса створок, экспрессия эндотелиальными клетками молекул адгезии, способствующих привлечению моноцитов с последующей их миграцией вглубь створок БКС. Представленная дисфункция эндотелия может быть спровоцирована различными патологическими процессами [11], а также низким напряжением сдвига (shear stress) вследствие турбулентного кровотока в области отсутствия эндотелия [12]. После дифференцировки моноцитов в макрофаги происходит секреция матриксных металлопротеиназ, что приводит к прогрессированию деструктивных процессов в створках БКС и образованию патофизиологического «порочного круга» [12, 13]. По всей видимости, на процесс дифференцировки клеток оказывают влияние микроокружение и глубина их инвазии в створки БКС. Например, фибробласты локализируются преимущественно вблизи поверхности створок, а гладкомышечные клетки, как правило, присутствуют в более глубоких слоях створок.

Следует отметить, что на данной стадии развития ПТН не исключено параллельное течение процессов репарации экстрацеллюлярного матрикса. Так, идентификация клеток линии механоцитов – фибробласты (виментин-позитивные клетки) свидетельствует о возможности синтеза основных компонентов экстрацеллюлярного матрикса створки, направленной на замещение дегенеративно измененной ксеноткани [6]. Однако прогрессирующие деструктивные процессы указывают на преобладание процессов разрушения над репарационными в ксеногенном материале створок. Низкая скорость регенерации может быть обусловлена не только недостаточным количеством фибробластов, но и, вероятно, их неспособностью полноценно функционировать в атипичных условиях микроокружения [14, 15]. В частности, в неблагоприятных условиях может происходить изменение функциональных свойств гладкомышечных клеток и фибробластов, в частности, развитие их деструктивного потенциала [16–18]. Подтверждением данного предположения является локализация данных клеток в непосредственной близости от крупных полостей.

Отсутствие Т- и В-лимфоцитов в исследованных образцах, с одной стороны, может свидетельствовать о незначительной роли воспаления в развитии описанного варианта структурных дисфункций при ПТН БКС, а с другой – предполагать, что кальцификация химически модифицированной ксеноткани в организме реципиента может быть реализована лишь при условии активации иммунного воспаления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структура БКС, эксплантационных по причине ПТН, характеризуется нарушением целостности или полным отсутствием эндотелиального монослоя в участках дезинтеграции экстрацеллюлярного матрикса, а также отсутствием лимфоцитов. Таким образом, можно предположить, что именно дезинтеграция слоя эндотелиоцитов является триггером развития ПТН. Иными словами, оптимальная конструкция БКС должна обеспечивать адгезию и жизнеспособность эндотелиальных клеток на поверхностях створок с целью обеспечения целостности экстрацеллюлярного матрикса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barbarash O., Rutkovskaya N., Hryachkova O., Gruzdeva O., Uchasova E., Ponasenko A., Kondyukova N., Odarenko Y., Barbarash L. Impact of recipient-related factors on structural dysfunction of xenoaortic bioprosthetic heart valves. *Patient Prefer Adherence*. 2015; 9: 389–399. DOI: 10.2147/PPA.S76001.
2. Барбараш Л.С., Рогулина Н.В., Рутковская Н.В., Овчаренко Е.А. Механизмы развития дисфункций биологических протезов клапанов сердца. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2018; 7 (2): 10–24. DOI: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-10-24.
3. Рутковская Н.В., Стасев А.Н., Одаренко Ю.Н. Биопротезирование клапанов сердца: реалии, проблемы, пути решения. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2013; 6 (6): 70–77.
4. Nair V., Law K.B., Li A.Y., Phillips K.R., David T.E., Butany J. Characterizing the inflammatory reaction in explanted medtronic freestyle stentless porcine aortic bioprosthesis over a 6-year period. *Cardiovasc. Pathol*. 2012; 21 (3): 158–168. DOI: 10.1016/j.carpath.2011.05.003.
5. Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Сидорова О.Д., Барбараш Л.С. Исследование клеточного состава кальцинированных биопротезов клапанов сердца. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 662–668. DOI: 10.15690/vramn560.
6. Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Мильто И.В., Сидорова О.Д., Кудрявцева Ю.А., Барбараш Л.С. Исследование структуры функционально сохраненного ксеноперикардального биопротеза после продолжительного периода имплантации. *Архив патологии*. 2017; 79 (5): 25–33. DOI: 10.17116/patol201779525-33.
7. Мухамадияров Р.А., Рутковская Н.В., Мильто И.В., Васюков И.В., Барбараш Л.С. Патогенетические параллели между развитием кальцификации нативных клапанов аорты и ксеногенных биопротезов клапанов сердца. *Гены и клетки*. 2016; 11 (3): 72–79.
8. Tillquist M.N., Maddox T.M. Cardiac crossroads: deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement. *Patient Prefer Adherence*. 2011; 5: 91–99. DOI: 10.2147/PPA.S16420.
9. Soares J.S., Feaver K.R., Zhang W., Kamensky D., Aggarwal A., Sacks M.S. Biomechanical behavior of bioprosthetic heart

- valve heterograft tissues: characterization, simulation, and performance. *Cardiovasc. Eng. Technol.* 2016; 7 (4): 309–351. DOI: 10.1007/s13239-016-0276-8
10. Овчаренко Е.А., Клышников К.Ю., Саврасов Г.В., Глушкова Т.В., Барбараш Л.С. Исследование гидродинамической функции малоинвазивного биопротеза клапана аорты. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2016; 5 (2): 39–45. DOI: 10.17802/2306-1278-2016-2-39-45.
 11. Brown B.A., Williams H., George S.J. Evidence for the involvement of matrix-degrading metalloproteinases (mmps) in atherosclerosis. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017; 147: 197–237. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.01.004.
 12. Neo K.S., Fujiwara K., Abe J. Shear stress and atherosclerosis. *Mol. Cells.* 2014; 37 (6): 435–440. DOI: 10.14348/molcells.2014.0078.
 13. Manji R.A., Hara H., Cooper D.K. Characterization of the cellular infiltrate in bioprosthetic heart valves explanted from patients with structural valve deterioration. *Xenotransplantation.* 2015; 22 (5): 406–407. DOI: 10.1111/xen.12187.
 14. Beziere N., Fuchs K., Maurer A., Reischl G., Brück J., Ghoreschi K., Fehrenbacher B., Berrio D.C., Schenke-Layland K., Kohlhofer U., Quintanilla-Martinez L., Gawaz M., Kneilling M., Pichler B. Imaging fibrosis in inflammatory diseases: targeting the exposed extracellular matrix. *Theranostics.* 2019; 9 (10): 2868–2881. DOI: 10.7150/thno.28892.
 15. Wu Y., Grande-Allen K.J., West J.L. Adhesive peptide sequences regulate valve interstitial cell adhesion, phenotype and extracellular matrix deposition. *Cell Mol. Bioeng.* 2016; 9 (4): 479–495. DOI: 10.1007/s12195-016-0451-x.
 16. Amin M., Pushpakumar S., Muradashvili N., Kundu S., Tyagi S.C., Sen U. Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases. *Front Biosci. (Landmark Ed.).* 2016; 1 (21): 89–118. DOI: 10.2741/4378.
 17. Ohukainen P., Ruskoaho H., Rysac J. Cellular mechanisms of valvular thickening in early and intermediate calcific aortic valve disease. *Curr Cardiol. Rev.* 2018; 14 (4): 264–271. DOI: 10.2174/1573403X14666180820151325.
 18. Yang L., Gao L., Nickel T., Yang J., Zhou J., Gilbertsen A., Geng Z., Johnson C., Young B., Henke C., Gourley G.R., Zhang J. Lactate promotes synthetic phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 2017; 121 (11): 1251–1262. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311819.

Вклад авторов

Мухамадияров Р.А. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных. Рутковская Н.В. – анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи. Кутихин А.Г. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Мильто И.В. – анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи. Сидорова О.Д. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Барбараш Л.С. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Мухамадияров Ринат Авхадиевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел клинической и экспериментальной кардиологии, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0002-5558-3229.

Рутковская Наталья Витальевна, д-р мед. наук, рук. кардиологического центра, ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, г. Москва. ORCID 0000-0002-8829-0481.

Кутихин Антон Геннадиевич, канд. мед. наук, зав. лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза, отдел клинической и экспериментальной кардиологии, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0001-8679-4857.

Мильто Иван Васильевич, д-р биол. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск; рук. отдела молекулярной и клеточной радиобиологии, СБН Центр, г. Северск. ORCID 0000-0002-9764-4392.

Сидорова Ольга Дмитриевна, канд. мед. наук, доцент, зав. кафедрой патологической анатомии и гистологии, КемГМУ, г. Кемерово. ORCID 0000-0003-2731-6294.

Барбараш Леонид Семенович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, гл. науч. сотрудник, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0001-6981-9661.

(✉) Мухамадияров Ринат Авхадиевич, e-mail: rem57@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.04.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Морфофункциональные характеристики за грудинной жировой ткани и их связь с артериальной жесткостью у пациентов с коронарным атеросклерозом, подвергшихся операции аортокоронарного шунтирования

Нарыжная Н.В.¹, Кошельская О.А.¹, Харитонов О.А.¹, Жигалева Н.И.²,
Журавлева О.А.¹, Евтушенко В.В.¹, Андреев С.Л.¹, Евтушенко А.В.³, Бощенко А.А.¹

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

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

³ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ)
Россия, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

РЕЗЮМЕ

Цель – исследование морфофункциональных характеристик адипоцитов за грудинной жировой ткани (ЗЖТ) в сравнении с другими типами жировой ткани (ЖТ), а также изучение их связи с показателями артериальной жесткости у пациентов с коронарным атеросклерозом, подвергшихся операции аортокоронарного шунтирования (АКШ).

Материалы и методы. В настоящее пилотное исследование включены 17 пациентов (12 мужчин и 5 женщин) в возрасте 40–70 лет со стабильной ишемической болезнью сердца и документированным коронарным атеросклерозом, которым была проведена операция АКШ и которые подписали информированное согласие на участие в исследовании. Материалом для исследования явились экспланты эпикардиальной, подкожной и за грудинной жировой ткани (ЗЖТ), их забор осуществлялся в ходе операции. Для изучения состояния регионарной артериальной жесткости использовали осциллометрическую ангиографию (TensioMed, Венгрия). Определяли уровень адипонектина, лептина, инсулина в супернатантах адипоцитов.

Результаты. Обнаружено, что адипоциты ЗЖТ имели меньшие размеры, чем адипоциты подкожной ЖТ, и были сопоставимы по размеру с эпикардиальными адипоцитами. Выброс адипонектина адипоцитами ЗЖТ не имел различий с таковым в подкожной и эпикардиальной ЖТ, однако адипоциты ЗЖТ вырабатывали существенно меньше лептина и инсулина. Впервые продемонстрирована взаимосвязь выработки адипоцитами ЗЖТ лептина и инсулина с показателями регионарной артериальной жесткости: прямая корреляционная связь – между секрецией лептина адипоцитами ЗЖТ и аортальным индексом аугментации и обратная – между секрецией инсулина адипоцитами ЗЖТ и скоростью пульсовой волны. Линейных корреляций между размерами адипоцитов ЗЖТ, наличием адипоцитов >100 мкм ЗЖТ и выработкой адипоцитами ЗЖТ лептина, инсулина, а также параметрами регионарной артериальной жесткости выявлено не было.

Заключение. Продемонстрировано наличие у ЗЖТ секреторной активности, интенсивность которой не имеет линейных ассоциаций с размером адипоцитов и их гипертрофией. Полученные нами данные впервые указывают на взаимосвязь адипокинов, вырабатываемых ЗЖТ, с процессами нарушения эластических свойств магистральных артерий у пациентов с коронарным атеросклерозом.

Ключевые слова: эпикардиальная, за грудинная и подкожная жировая ткань, артериальная жесткость, адипоциты, адипокины, коронарный атеросклероз.

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

✉ Кошельская Ольга Анатольевна, e-mail: koshel@live.ru.

Источник финансирования. Статья подготовлена в рамках темы фундаментальных исследований № АААА-А15-115123110026-3.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 146 от 16.06.2016).

Для цитирования: Нарыжная Н.В., Кошельская О.А., Харитонов О.А., Жигалева Н.И., Журавлева О.А., Евтушенко В.В., Андреев С.Л., Евтушенко А.В., Бощенко А.А. Морфофункциональные характеристики за грудиной жировой ткани и их связь с артериальной жесткостью у пациентов с коронарным атеросклерозом, подвергшихся операции аортокоронарного шунтирования. *Бюллетень сибирской медицины.* 2020; 19 (2): 63–71. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-63-71>.

Morphological and functional characteristics of retrosternal adipose tissue and their relation to arterial stiffness parameters in patients after coronary artery bypass grafting

Naryzhnaya N.V.¹, Koshelskaya O.A.¹, Kharitonova O. A.¹, Zhigaleva N.Y.², Zhuravleva O.A.¹, Evtushenko V.V.¹, Andreev S.L.¹, Evtushenko A.V.³, Boshchenko A.A.¹

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science 111a, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation

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

³ Kuzbass Cardiology Center 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

ABSTRACT

Background. The attention of many researchers is focused on studying the role of adipokines secreted by subcutaneous, visceral, epicardial, and perivascular adipose tissues in the pathogenesis of diseases of the cardiovascular system. At the same time, adipose tissue of retrosternal localization remains out of research focus. This pool of fat cells is formed at the site of the thymic involution and has a significant volume. However, their functional activity and participation in the development of cardiovascular pathology remain unexplored.

Aim. To study the morphological characteristics of adipocytes of the retrosternal adipose tissue (RSAT) and their production of adipokines in comparison with epicardial (EAT) and subcutaneous adipose tissue (SCAT) and to investigate their relationships with arterial stiffness parameters in patients who underwent coronary artery bypass grafting.

Materials and methods. The study included 17 patients (12 men/5 women aged 40–70 years) with the diagnosed coronary artery disease (CAD) who underwent coronary artery bypass grafting (CABG). Each patient underwent measurement of carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) and aortic augmentation index (AIx) with the oscillometric device. Isolated adipocytes were obtained enzymatically from explants of SCAT, EAT and RSAT during coronary artery bypass grafting. The adipocytes were analyzed under the microscope at 200x magnification. The release of adiponectin, leptin and insulin was studied in the adipocyte supernatant after 1 hour incubation using ELISA.

Results. It was found that adipocytes of the RSAT are smaller than adipocytes of SCAT: 83.96 ± 2.21 vs 98.62 ± 2.67 μm ($p = 0.00002$), respectively, and comparable in size to adipocytes of EAT: 86.65 ± 1.33 μm . The release of adiponectin by adipocytes of the RSAT turned out to be comparable to the production of this adipokine in SCAT and EAT, however, adipocytes of the RSAT produce less leptin than SCAT and EAT: 0.26 (0.19 ; 0.27) ng/l vs 0.37 (0.28 ; 0.55) ($p = 0.01$) and vs 0.32 (0.28 ; 0.44) ($p = 0.006$) ng/ml , respectively. Furthermore, RSAT produce less insulin than SCAT and EAT: 1.56 (1.03 ; 2.08) vs 1.70 (0.99 ; 2.18) ng/ml , ($p = 0.0022$) and 1.76 (1.16 ; 2.40) ng/ml ($p = 0.006$), respectively.

A positive correlation was found between the secretion of leptin by adipocytes of the RSAT and the AIx ($r_s = 0.52$, $p = 0.046$). An inverse relationship was found between insulin secretion by retrosternal adipocytes and PWV

($r_s = -0.55$, $p = 0.035$). There was no relationship between the size of the retrosternal adipocyte or hypertrophy of the thymic adipocytes (more than 100 μm) and the production of leptin and insulin and arterial stiffness parameters.

Conclusions. The data of our pilot study show that adipocyte hypertrophy of the retrosternal AT is not a significant marker of adipokine production disturbance. The observed relationships suggest that an increase in leptin production and reduced insulin secretion by retrosternal AT may contribute to the formation of adipokine-related arterial stiffness. Based on the data obtained, it can be assumed that adipokines produced by the retrosternal AT can participate in the formation of arterial stiffness in patients with coronary artery disease.

Key words: epicardial, retrosternal and subcutaneous adipose tissue, arterial stiffness, adipocyte, adipokines, coronary artery disease.

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

Source of financing. The article was prepared as part of the basic research topic No. AAAA-A15-115123110026-3.

Conformity with the principles of ethics. The study was performed in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association “Ethical Principles for Conducting Scientific Medical Research with Human Participation” as amended in 2000 and the “Rules of Clinical Practice in the Russian Federation” approved by the Order No. 266 of the Ministry of Health of the Russian Federation of June 19, 2003. The research was approved by the local Ethics Committee of the Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Center (Protocol No.146 of June 16, 2016). All individuals included in the study signed an informed consent.

For citation: Naryzhnaya N.V., Koshelskaya O.A., Kharitonova O.A., Zhigaleva N.Y., Zhuravleva O.A., Evtushenko V.V., Andreev S.L., Evtushenko A.V., Boshchenko A.A. Morphological and functional characteristics of retrosternal adipose tissue and their relation to arterial stiffness parameters in patients after coronary artery bypass graftin. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 63–71. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-63-71>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время внимание большого числа исследователей направлено на изучение роли адипокинов, выделяемых висцеральной жировой тканью и ее эктопическими депо, в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы [1–3]. В многочисленных научных работах показана патологическая роль эпикардального ожирения, тогда как жировая ткань загрудинной локализации остается вне фокуса исследований. Этот пул жировых клеток имеет значительный объем и образуется, главным образом, в силу возрастной инволюции ключевого органа иммунной системы тимуса, когда происходит почти полное его замещение жировой тканью [4]. Морфологические характеристики адипоцитов загрудинной жировой ткани (ЗЖТ), их функциональная активность и возможное участие в развитии сердечно-сосудистой патологии до настоящего времени не изучены. Вместе с тем именно структурно-функциональные особенности жировых депо являются наиболее важным патологическим фактором формирования высокого кардиометаболического риска.

Как известно, и ожирение, и артериальная жесткость являются независимыми предикторами сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности [5]. В публикациях последних лет сообщается

о тесной связи эпикардального жирового депо с возрастанием артериальной жесткости, что предположительно связывается с дисфункцией адипоцитов и нарушением выработки ими адипокинов [6], тогда как в отношении ЗЖТ каких-либо сведений на этот счет не существует.

Целью настоящей работы является исследование морфофункциональных характеристик адипоцитов ЗЖТ в сравнении с другими типами жировой ткани (эпикардальной и подкожной), а также изучение их потенциальной связи с показателями артериальной жесткости у пациентов с коронарным атеросклерозом, подвергшихся операции аортокоронарного шунтирования (АКШ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящее пилотное исследование включены 17 пациентов (12 мужчин и 5 женщин) в возрасте 40–70 лет со стабильной ишемической болезнью сердца и документированным коронарным атеросклерозом, у которых имелись показания для проведения операции АКШ.

Исследование проведено 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. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 146 от 16.06.2016). Все лица, включенные в исследование, подписали информированное согласие на участие.

Все пациенты находились на регулярной медикаментозной терапии, приближающейся к оптимальной. Доля курильщиков и пациентов с метаболическими нарушениями, которые соответствовали критериям метаболического синдрома [7], была высокой. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Критериями исключения являлись острые атеросклеротические осложнения в течение последних 6 мес, любое воспалительное заболевание, хроническая болезнь почек выше СЗб; онкологические, гематологические и иммунные заболевания.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование, n = 17	
Показатель	Значение
Мужчины/женщины	12/5
Возраст, лет	63 (59; 66)
Пациенты с инфарктом миокарда в анамнезе, n (%)	6 (35,3)
Пациенты с артериальной гипертонией, n (%)	15 (88,2)
Пациенты с сахарным диабетом 2-го типа, n (%)	4 (23,5)
Длительность артериальной гипертонии, лет, Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	15 (10; 20)
Длительность ишемической болезни сердца, лет, Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	2 (1,75; 5,5)
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст., Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	135 (127; 142)
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст., Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	77,5 (69,5; 84,5)
Пациенты-курильщики, n (%)	11 (64,7)
Индекс массы тела, кг/м ² , Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	29,4 (28,1; 31,2)
Пациенты с ожирением, n (%)	8 (47)

Всем пациентам выполняли селективную коронароангиографию на ангиографическом комплексе Cardioscop-V и компьютерной системе Digitron-3NAC (Siemens, Германия) в отделении рентгенохирургических методов диагностики и лечения (руководитель – канд. мед. наук А.Е. Баев). Проводили антропометрические измерения с оценкой общего ожирения по уровню индекса массы тела (ИМТ) и абдоминального ожирения – по величине окружности талии.

Для изучения состояния регионарной артериальной жесткости использовали осциллометрическую артериографию (TensioMed, Венгрия). Оценивали скорость распространения пульсовой волны и аортальный индекс аугментации.

Материалом для исследования явились экспланты ЗЖТ, подкожной (ПЖТ) и эпикардиальной (ЭЖТ) массой 0,5–1 г. Забор эксплантов у пациентов осуществлялся в ходе операции АКШ. Образцы помещали в среду M199 и в течение 15 мин доставляли в лабораторию. Выделение клеток жировой ткани осуществляли энзиматически, стерильно в ламинарном шкафу II класса защиты БАВп-01-«Ламинар-с»-1,5 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) [8]. Ткань измельчали, инкубировали 35–40 мин при температуре 37 °С и постоянном мягком перемешивании (10 об./мин) в 5 мл стерильного раствора коллагеназы I типа (ПанЭко, Россия) 1 мг/мл в буфере Кребса – Рингера (2 mM D-глюкозы, 135 mM NaCl, 2,2 mM CaCl₂ × 2H₂O, 1,25 mM MgSO₄ × 7H₂O, 0,45 mM KH₂PO₄, 2,17 mM Na₂HPO₄, 25 mM HEPES, 3,5% BSA, 0,2 mM аденозина). Для нейтрализации коллагеназы добавляли буфер Кребса – Рингера в соотношении 1:1. Клеточную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр (FalconCell strainer, диаметр пор 100 мкм), трехкратно промывали теплым буфером Кребса – Рингера. Количество и размер полученных адипоцитов подсчитывали в камере Горяева с использованием световой микроскопии Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) (рис. 1).

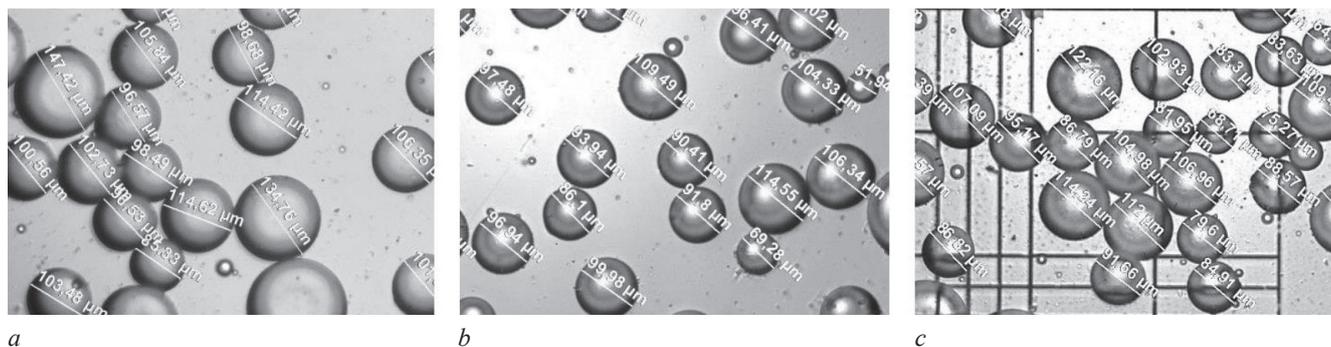


Рис. 1. Световая микроскопия изолированных адипоцитов подкожной (а), эпикардиальной (b) и за грудиной (c) жировой ткани. ×200

Адиipoциты >100 мкм относили к гипертрофированным. Для часового инкубирования адипоцитов в лунку стерильного 24-луночного планшета (Greiner, Германия) вносили адипоциты в количестве 20×10^5 и доводили объем содержимого лунки до 1 мл. Инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и постоянном перемешивании со скоростью 10 об./мин. Супернатанты адипоцитов собирали со дна лунок, замораживали и хранили в морозильной камере при температуре –70 °С.

Для определения адипонектина в супернатантах адипоцитов использовали набор Adiponectin ELISA (Mediagnost, Германия), для определения лептина – набор Leptin Sensitive ELISA (Mediagnost, Германия), инсулин определяли с помощью набора Insulin Test System (Monobind Inc., США).

Статистический анализ результатов исследования выполняли с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Проверку нормальности распределения выборочных данных производили по критерию Шапиро – Уилка. Для описания признаков с отличным от нормального распределения использовались медиана и межквартильный размах $Me (Q_{25}; Q_{75})$. Проверку значимости различий между количественными признаками при отсутствии нормальности распределения данных проводили по критерию Вилкоксона. В случае, когда данные имели нормальное распределение, гипотезу о равенстве

математических ожиданий парных измерений выполняли по t -критерию Стьюдента. Для оценки взаимосвязи признаков, не имеющих нормального распределения выборочных данных, использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r_s). Все статистические гипотезы принимались по достигнутому уровню значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфометрическое исследование показало отсутствие различий размера адипоцитов ЗЖТ и ЭЖТ в исследуемой выборке пациентов, тогда как размер адипоцитов ЗЖТ оказался статистически значимо меньше такового для ПЖТ (табл. 2). Доля гипертрофированных адипоцитов, определяемых как процент клеток >100 мкм, в ЗЖТ была более чем в 2 раза меньше таковой для адипоцитов ПЖТ. Доля крупных адипоцитов ЭЖТ не отличалась от этого показателя для ЗЖТ, а доля мелких адипоцитов (<50 мкм) во всех трех тканях оказалась сопоставимой. Для ЗЖТ этот показатель составил 2,23 (1,08; 4,40)%, для ЭЖТ – 2,07 (0,83; 3,87)%, для ПЖТ – 1,92 (0,23; 4,68)%. Следовательно, адипоциты ЗЖТ имеют более мелкие размеры и в меньшей степени гипертрофированы, чем адипоциты ПЖТ, при этом адипоциты ЗЖТ сопоставимы по размеру с эпикардальными адипоцитами. Размер адипоцитов ЗЖТ не имел корреляционной связи с ИМТ.

Таблица 2

Размер адипоцитов подкожной, эпикардальной и за грудинной жировой ткани			
Показатель	Подкожная жировая ткань	Эпикардальная жировая ткань	За грудинная жировая ткань
Размер адипоцита, мкм, $M \pm SEM$	98,62 ± 2,67	86,65 ± 1,33	83,96 ± 2,21 $p_1 = 0,00002$ $p_2 = 0,23$
Доля гипертрофированных адипоцитов, %, $Me (Q_{25}; Q_{75})$	47,66 (31,78; 55,50)	17,59 (9,84; 25,53)	16,11 (11,73; 30,20) $p_1 = 0,000062$ $p_3 = 0,81$

Примечание. Гипертрофированными считали адипоциты >100 мкм, p_1 – сравнение ЗЖТ с ПЖТ, p_2 – сравнение ЗЖТ с ЭЖТ (t -критерий Стьюдента для парных измерений), p_3 – сравнение ЗЖТ с ЭЖТ (тест согласованных пар Вилкоксона).

Выброс адипонектина адипоцитами ЗЖТ оказался сопоставим с его выработкой адипоцитами ЭЖТ и ПЖТ (табл. 3). Обнаружено, что уровень лептина в среде инкубации адипоцитов ЗЖТ был на 30 и 20% ниже этого показателя для ПЖТ и ЭЖТ соответственно.

Поскольку значимых различий выработки адипонектина исследуемыми типами жировых клеток не было, индекс лептин/адипонектин для ЗЖТ оказался в 1,5 раза ниже, чем для ПЖТ и ЭЖТ. Выработка инсулина адипоцитами ЗЖТ превышала таковую для ПЖТ на 8% ($p = 0,022$) и для ЭЖТ – на 11% ($p = 0,006$).

В ходе корреляционного анализа нами впервые была обнаружена взаимосвязь секреции адипоцитами ЗЖТ лептина и инсулина с показателями регионарной артериальной жесткости: прямая корреляционная связь имела место между секрецией лептина адипоцитами ЗЖТ и аортальным индексом аугментации (рис. 2) и обратная – между секрецией инсулина адипоцитами ЗЖТ и скоростью пульсовой волны (рис. 3). Вместе с тем мы не выявили линейных взаимосвязей между размерами адипоцитов ЗЖТ и наличием их гипертрофии, с одной стороны, и выработкой лептина, инсулина и соотношением лептин/адипонектин – с другой.

Таблица 3

Продукция адипокинов адипоцитами подкожной, эпикардиальной и за грудинной жировой ткани, Me (Q_2 ; Q_75)			
Показатель	Подкожная жировая ткань	Эпикардиальная жировая ткань	За грудинная жировая ткань
Адипонектин, нг/мл	10,59 (8,31; 12,25)	7,93 (6,77; 10,11)	10,21 (8,77; 12,78)
Лептин, нг/мл	0,37 (0,28; 0,55)	0,32 (0,28; 0,44)	0,26 (0,19; 0,27) $p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,006$
Лептин/адипонектин	0,038 (0,028; 0,069)	0,033 (0,019; 0,044)	0,022 (0,019; 0,028) $p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,004$
Инсулин, нг/мл	1,70 (0,99; 2,18)	1,76 (1,16; 2,40)	1,56 (1,03; 2,08) $p_1 = 0,002$ $p_2 = 0,006$

Примечание. Тест согласованных пар Вилкоксона: сравнение ЗЖТ и ПЖТ (p_1), сравнение ЗЖТ и ЭЖТ (p_2).

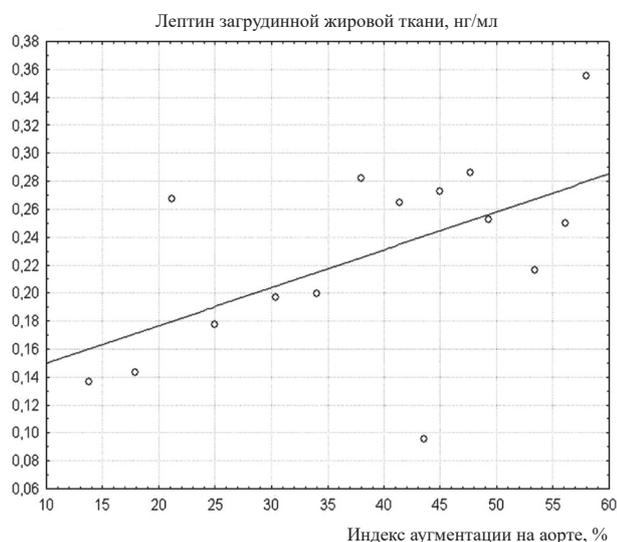


Рис. 2. Корреляционная связь между выработкой лептина адипоцитами ЗЖТ и аортальным индексом аугментации, $r_s = 0,52$; $p = 0,047$

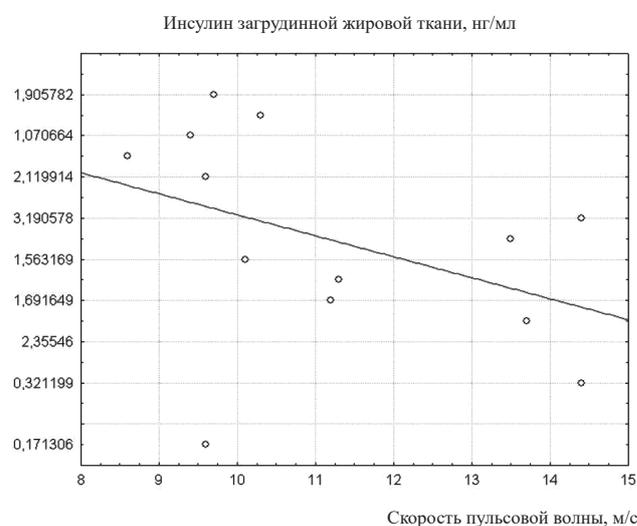


Рис. 3. Корреляционная связь между выработкой инсулина адипоцитами ЗЖТ и скоростью пульсовой волны, $r_s = -0,55$; $p = 0,035$

Многочисленные исследования подтверждают взаимосвязь накопления и дисфункции висцеральной жировой ткани с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [9–11]. Ключевыми факторами этой патологической цепи являются избыточная выработка жировой тканью провоспалительных адипокинов и активных форм кислорода [2, 3, 12, 13]. Установлена связь дисфункции адипоцитов малых жировых депо – периваскулярной и эпикардиальной локализации – с развитием атеросклероза [14–16], нарушением эластичности артерий [6], артериальной гипертензией [17], сердечной недостаточностью и аритмией [18]. Сообщается об ассоциации висцерального ожирения и повышенной продукции жировой тканью лептина с наличием системной гипертензии и возрастанием артериальной жесткости [19–21], тогда как за грудинное жировое депо, формирующе-

ся в результате возрастной инволюции тимуса, до настоящего времени остается вне фокуса подобных исследований.

В нашей работе впервые изучены морфологические характеристики адипоцитов ЗЖТ, выработка ими инсулина и адипокинов у пациентов с коронарным атеросклерозом, подвергшихся операции АКШ. По результатам нашего исследования, размер адипоцитов ЗЖТ соответствует таковому в ЭЖТ. Полученные нами данные не подтверждают ассоциации размеров адипоцита ЗЖТ с ИМТ или интенсивностью выработки ими адипокинов, что не позволяет рассматривать гипертрофию адипоцитов ПЖТ в качестве значимого маркера нарушения выработки ими адипокинов. Отсутствие связи размера жировых клеток с ИМТ ранее было показано для эпикардиальных адипоцитов и, возможно, является характерным

для малых жировых депо [22]. Вместе с тем в литературе приводятся единичные данные о корреляции размеров адипоцитов ЭЖТ с содержанием лептина и адипонектина в сыворотке крови [23] и отсутствует информация о соотношении размер/выработка адипокинов адипоцитами ЭЖТ. Таким образом, существующее на данный момент мнение о зависимости секреторной активности адипоцита от его гипертрофии для малых жировых депо нуждается в дополнительном фактическом обосновании.

Как показали результаты нашего исследования, интенсивность секреции адипонектина клетками ЗЖТ не отличается от таковой в ЭЖТ и ПЖТ, что позволяет рассматривать ЗЖТ как полноценный секреторный орган. Тем не менее выработка лептина и инсулина адипоцитами ЗЖТ, согласно полученным нами данным, оказалась значимо ниже, чем в ЭЖТ и ПЖТ. Нельзя исключить, что этот факт может быть связан с формированием ЗЖТ на месте прежде функционально активного иммунно-регуляторного органа – вилочковой железы, подвергшейся возрастной инволюции.

Следует отметить, что нами впервые обнаружена прямая корреляционная связь между выработкой лептина ЗЖТ и индексом аугментации на аорте и обратная связь между выработкой адипоцитами ЗЖТ инсулина и скоростью пульсовой волны. Рассматривая механизм влияния лептина на состояние артериальной жесткости, можно предполагать, что он реализуется через «профибротический» эффект лептина. Так, в экспериментальном исследовании на модели изолированных гладкомышечных клеток, выделенных из аорты крыс с ожирением, было обнаружено, что добавление лептина в инкубационную среду приводило к возрастанию экспрессии гена коллагена II, повышению клеточного содержания этого белка, а также фибронектина, трансформирующего фактора роста (TGF)- β и фактора роста соединительной ткани (CTGF) [24]. Кроме того, сообщается о способности лептина индуцировать гипертрофию гладкомышечных клеток сосудов, их остеогенную дифференциацию и экспрессию металлопротеиназ [25].

Полученные нами данные об обратной направленности взаимосвязи инсулина, вырабатываемого адипоцитами ЗЖТ, с артериальной жесткостью согласуются с литературными сведениями. Так, экспериментальные исследования показали снижение эластических свойств аорты у инсулинорезистентных крыс [26] и у крыс с диабетом [27]. Этот факт подтверждается результатами клинических исследований об обратной зависимости параметров артериальной жесткости (скорости пульсовой волны) от дозировок введенного инсулина у пациентов с

метаболическим синдромом и сахарным диабетом 2-го типа [28]. Среди механизмов, опосредующих воздействие инсулина на эластические свойства артериальной стенки, можно рассматривать его эффекты на внутриклеточный защитный механизм, включающий фосфорилирование Akt, ERK-1/2 и JNK-1/2-киназ с последующей активацией гипоксия-индуцируемого фактора 1 α (HIF-1 α) [29], а также супрессирующее влияние инсулина на синтазу оксида азота второго типа (eNOS) [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты настоящего пилотного исследования демонстрируют наличие у загрудинной жировой ткани секреторной активности, интенсивность которой не имеет линейных взаимосвязей с размером адипоцитов и их гипертрофией. Полученные нами данные впервые указывают на существование ассоциации между выработкой загрудинной жировой ткани адипокинов и процессами нарушения эластических свойств магистральных артерий у пациентов с коронарным атеросклерозом.

Ограничениями исследования являются его небольшой объем и отсутствие возможности отдельного изучения морфофункциональных особенностей ЗЖТ у мужчин, женщин, пациентов с сахарным диабетом и ожирением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sato F., Maeda N., Yamada T., Namazui H., Fukuda S., Natsukawa T., Nagao H., Murai J., Masuda S., Tanaka Y., Obata Y., Fujishima Y., Nishizawa H., Funahashi T., Shimomura I. Association of epicardial, visceral, and subcutaneous fat with cardiometabolic diseases. *Circ. J.* 2018; 82 (2): 502–508. DOI: 10.1253/circj.CJ-17-0820.
2. Kologrivova I.V., Vinnitskaya I.V., Koshelskaya O.A., Suslova T.E. Visceral obesity and cardiometabolic risk: features of hormonal and immune regulation. *Obesity and Metabolism.* 2017; 14 (3): 3–10. DOI: 10.14341/OMET201733-10.
3. Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Boshchenko A.A., Popov S.V., Ivanov V.V., Oeltgen P.R. Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? *Journal of Clinical and Translational Endocrinology.* 2018; 15: 1–5. DOI: 10.1016/j.jcte.2018.11.001.
4. Cavallotti C., D'Andrea V., Tonnarini G., Cavallotti C., Bruzone P. Age-related changes in the human thymus studied with scanning electron microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 2008; 71 (8): 573–578. DOI: 10.1002/jemt.20588.
5. Safar M.E., Czernichow S., Blacher J. Obesity, arterial stiffness, and cardiovascular risk. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17: S109–111. DOI: 10.1681/ASN.2005121321.
6. Al-Talabany S., Mordi I., Graeme Houston J., Colhoun H.M., Weir-McCall J.R., Matthew S.Z., Looker H.C., Levin D., Belch J.J.F., Dove F., Khan F., Lang C.C. Epicardial adipose tissue is related to arterial stiffness and inflammation in patients

- with cardiovascular disease and type 2 diabetes. *MC Cardiovasc. Disord.* 2018; 18 (1): 31. DOI: 10.1186/s12872-018-0770-z.
7. Akhmedzhanov N.M., Dedov I.I., Zvenigorodskaya L.A. et al. Russian experts' consensus on metabolic syndrome problem in the Russian Federation: definition, diagnostic criteria, primary prevention, and treatment. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2010; 9 (5): 4–11.
 8. Thalmann S., Juge-Aubry C.E., Meier C.A. Explant cultures of white adipose tissue. In: adipose tissue protocols. *Methods in Molecular Biology.* Humana Press. 2008; 456: 195–199. DOI: 10.1007/978-1-59745-245-8_14.
 9. Hiuge-Shimizu A., Kishida K., Funahashi T. et al. Coexistence of visceral fat and multiple risk factor accumulations is strongly associated with coronary artery disease in Japanese (The VACATION-J Study). *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.* 2012; 19 (7): 657–663. DOI: 10.5551/jat.13037.
 10. Abazid R., Kattea M., Sayed S. et al. Visceral adipose tissue influences on coronary artery calcification at young and middle-age groups using computed tomography angiography. *Avicenna Journal of Medicine.* 2015; 5 (3): 83–88. DOI: 10.4103/2231-0770.160242.
 11. Tanaka T., Kishi S., Ninomiya K., Tomii D., Koseki K., Sato Y., Okuno T., Sato K., Koike H., Yahagi K., Komiyama K., Aoki J., Tanabe K. Impact of abdominal fat distribution, visceral fat, and subcutaneous fat on coronary plaque scores assessed by 320-row computed tomography coronary angiography. *Atherosclerosis.* 2019; 287: 155–161. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.910.
 12. Ronti T., Lupattelli G., Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology.* 2006; 64 (4): 355–365. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2006.02474.-x.
 13. Ostanko V.L., Kalacheva T.P., Kalyuzhina E.V., Livshits I.K., Shalovay A.A., Chernogoryuk G.E., Bepalova I.D., Yunusov R.S., Lukashova L.V., Pomogaeva A.P., Teplyakov A.T., Kalyuzhin V.V. Biological markers in risk stratification and progression of cardiovascular disease: present and future. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2018; 17 (4): 264–280. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-264-280.
 14. Uchasova E.G., Gruzdeva O.V., Dyleva Y.A., Akbasheva O.E. Epicardial adipose tissue: pathophysiology and role in the development of cardiovascular diseases. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2018; 17 (4): 254–263. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-254-263.
 15. Neeland I.J., Ross R., Després J.P., Matsuzawa Y., Yamashita S., Shai I., Seidell J., Magni P., Santos R.D., Arsenault B., Cuevas A., Hu F.B., Griffin B., Zamboni A., Barter P., Fruchart J.C., Eckel R.H. International atherosclerosis society; International chair on cardiometabolic risk working group on visceral obesity. Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019; 7 (9): 715–725. DOI: 10.1016/S2213-8587(19)30084-1.
 16. Gullaksen S., Funck K.L., Laugesen E., Hansen T.K., Dey D., Poulsen P.L. Volumes of coronary plaque disease in relation to body mass index, waist circumference, truncal fat mass and epicardial adipose tissue in patients with type 2 diabetes mellitus and controls. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2019; 16 (4): 328–336. DOI: 10.1177/1479164119825761.
 17. Austys D., Dobrovolskij A., Jablonskienė V., Dobrovolskij V., Valevičienė N., Stukas R. Epicardial adipose tissue accumulation and essential hypertension in non-obese adults. *Medicina (Kaunas).* 2019; 55 (8): e456. DOI: 10.3390/medicina55080456.
 18. Ferrara D., Montecucco F., Dallegrì F., Carbone F. Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases. *J. Cell Physiol.* 2019; 234 (12): 21630–21641. DOI: 10.1002/jcp.28821.
 19. Kohara K., Ochi M., Okada Y., Yamashita T., Ohara M., Kato T., Nagai T., Tabara Y., Igase M., Miki T. Clinical characteristics of high plasma adiponectin and high plasma leptin as risk factors for arterial stiffness and related end-organ damage. *Atherosclerosis.* 2014; 235 (2): 424–429. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.940.
 20. Mac Ananey O., McLoughlin B., Leonard A., Maher L., Gaffney P., Boran G., Maher V. Inverse relationship between physical activity, adiposity, and arterial stiffness in healthy middle-aged subjects. *J. Phys. Act Health.* 2015; 12 (12): 1576–1581. DOI: 10.1123/jpah.2014-0395.
 21. Zachariah J.P., Hwang S., Hamburg N.M., Benjamin E.J., Larson M.G., Levy D., Vita J.A., Sullivan L.M., Mitchell G.F., Vasan R.S. Circulating adipokines and vascular function: cross-sectional associations in a community-based cohort. *Hypertension.* 2016; 67 (2): 294–300. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05949.
 22. Aitken-Buck H.M., Babakr A.A., Coffey S., Jones P.P., Tse R.D., Lamberts R.R. Epicardial adipocyte size does not correlate with body mass index. *Cardiovasc. Pathol.* 2019; 43: 107144. DOI: 10.1016/j.carpath.2019.07.003.
 23. Bambace C., Telesca M., Zoico E., Sepe A., Olioso D., Rossi A., Corzato F., Di Francesco V., Mazzucco A., Santini F., Zamboni M. Adiponectin gene expression and adipocyte diameter: a comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men. *Cardiovasc. Pathol.* 2011; 20 (5): e153–156. DOI: 10.1016/j.carpath.2010.07.005.
 24. Martínez-Martínez E., Miana M., Jurado-López R., Bartolomé M.V., Souza Neto F.V., Salices M., López-Andrés N., Cachofeiro V. The potential role of leptin in the vascular remodeling associated with obesity. *Int. J. Obes (Lond.).* 2014; 38 (12): 1565–1572. DOI: 10.1038/ijo.2014.37.
 25. Trovati M., Doronzo G., Barale C., Vaccheris C., Russo I., Cavalot F. Leptin and vascular smooth muscle cells. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20 (4): 625–634. DOI: 10.2174/13816128113199990022.
 26. Sista A.K., O'Connell M.K., Hinohara T., Oommen S.S., Fenster B.E., Glassford A.J., Schwartz E.A., Taylor C.A., Reaven G.M., Tsao P.S. Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker fa/fa rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 289 (2): H845–851. DOI: 10.1152/ajpheart.00134.2005.
 27. Sun H., Zhong M., Miao Y., Ma X., Gong H.P., Tan H.W., Zhang Y., Zhang W. Impaired elastic properties of the aorta in fat-fed, streptozotocin-treated rats. Vascular remodeling in diabetic arteries. *Cardiology.* 2009; 114 (2): 107–113. DOI: 10.1159/000219211.
 28. Gordin D., Saraheimo M., Tuomikangas J., Soro-Paavonen A., Forsblom C., Paavonen K., Steckel-Hamann B., Harjutsalo V., Nicolaou L., Pavo I., Koivisto V., Groop P.H. Insulin expo-

- sure mitigates the increase of arterial stiffness in patients with type 2 diabetes and albuminuria: an exploratory analysis. *Acta Diabetol.* 2019; 56 (11): 1169–1175. DOI: 10.1007/s00592-019-01351-4.
29. Doronzo G., Russo I., Mattiello L., Riganti C., Anfossi G., Trovati M. Insulin activates hypoxia-inducible factor-1alpha in human and rat vascular smooth muscle cells via phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways: impairment in insulin resistance owing to defects in insulin signalling. *Diabetologia.* 2006; 49 (5): 1049–1063. DOI: 10.1007/s00125-006-0156-0.
30. Mahmoud A.M., Ali M.M., Miranda E.R., Mey J.T., Blackburn B.K., Haus J.M., Phillips S.A. Nox2 contributes to hyperinsulinemia-induced redox imbalance and impaired vascular function. *Redox Biol.* 2017; 13: 288–300. DOI: 10.1016/j.redox.2017.06.001.

Вклад авторов

Нарыжная Н.В. – разработка концепции и дизайна, набор экспериментального материала, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Кошельская О.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Харитоновна О.А. – набор клинического материала, анализ и интерпретация данных. Жигалева Н.И. – набор экспериментального материала, анализ и интерпретация данных. Журавлева О.А. – анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания рукописи. Евтушенко В.В. – набор клинического материала, обоснование рукописи. Андреев С.Л. – набор клинического материала, обоснование рукописи. Евтушенко А.В. – разработка концепции и дизайна, набор клинического материала. Бощенко А.А. – разработка концепции и дизайна, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Нарыжная Наталья Владимировна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-2264-1928.

Кошельская Ольга Анатольевна, д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6679-1269.

Харитоновна Ольга Анатольевна, лаборант-исследователь, отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-2818-5882.

Жигалева Надежда Игоревна, студентка, СибГМУ, г. Томск.

Журавлева Ольга Александровна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-0106-6813.

Евтушенко Владимир Валериевич, канд. мед. наук, врач сердечно-сосудистый хирург, кардиохирургическое отделение № 1, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-5537-0864.

Андреев Сергей Леонидович, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, кардиохирургическое отделение № 1, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-4049-8725.

Евтушенко Алексей Валериевич, д-р мед. наук, зав. лабораторией кардиоваскулярного биопротезирования, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0001-8475-4667.

Бощенко Алла Александровна, д-р мед. наук, зам. директора по научной работе, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-6009-0253.

✉ **Кошельская Ольга Анатольевна**, e-mail: koshel@live.ru.

Поступила в редакцию 11.11.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Молекулярные механизмы влияния N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии

Носарева О.Л., Орлов Д.С., Шахристова Е.В., Степовая Е.А.

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

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Нарушение регуляции апоптоза в эпителиальных опухолевых клетках линии P19 сопряжено с формированием окислительного стресса. В условиях гипоксии происходит изменение функционирования митохондрий, что может выступать дополнительным фактором, усугубляющим окислительный стресс в опухолевой клетке.

Цель – оценить влияние N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на реализацию и регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили культивированные в условиях гипоксии опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мыши). Для модуляции редокс-статуса использовали N-этилмалеимид в концентрации 5 мМ и протектор SH-групп – 1,4-дитиоэритритол в конечной концентрации 5 мМ. Методом проточной цитофлуориметрии определяли внутриклеточное содержание ионов кальция, трансмембранный потенциал митохондрий, количество аннексин V-, CD95- и CD120-положительных клеток. Концентрацию восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона, SH-групп протеинов, гидроксильного радикала и карбонильных производных белков измеряли методом спектрофотометрии.

Результаты. В условиях гипоксии изменение редокс-статуса системы глутатиона, сопровождающееся окислительной модификацией белков (глутатионилирование и карбонилирование), оказывает влияние на метаболизм опухолевой клетки в целом и, при применении протектора SH-групп белков – 1,4-дитиоэритритола, способствует формированию дополнительных механизмов ускользания от клеточной гибели, а в случае применения блокатора SH-групп протеинов – N-этилмалеимида – активации апоптоза.

Заключение. В условиях гипоксии изменение редокс-гомеостаза опухолевой клетки и модуляция окислительной модификации белков (глутатионилирование и карбонилирование) являются одним из перспективных подходов таргетной регуляции клеточной гибели.

Ключевые слова: редокс-статус, опухолевый рост, окислительный стресс, система глутатиона, апоптоз, гипоксия.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Носарева О.Л., Орлов Д.С., Шахристова Е.В., Степовая Е.А. Молекулярные механизмы влияния N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 72–77. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-72-77>.

Molecular mechanisms of the effects of N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol on regulation of apoptosis in P19 cells under hypoxia

Nosareva O.L., Orlov D.S., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A.

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

ABSTRACT

Relevance. Impairment of apoptosis regulation in P19 cells is correlated with generation of oxidative stress. Under hypoxia, changes in mitochondrial functions occur, which may exacerbate oxidative stress in the tumor cell.

The aim of the study was to evaluate the effects of N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol on implementation and regulation of apoptosis in P19 cells under hypoxia *in vitro*.

Materials and methods. P19 cells (mouse teratocarcinoma) cultured under hypoxia served as the material for the study. For redox status modulation, 5mM N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol in the final concentrations of 5 mM were used. The intracellular concentration of calcium ions, the transmembrane potential and the number of Annexin V, CD95 and CD120 positive cells were determined by flow cytometry. The levels of reduced, oxidized and protein-bound glutathione, protein SH groups, hydroxyl radical and protein carbonyl derivatives were measured by spectrophotometry.

Results. The alteration in the redox status of the glutathione system under hypoxia, accompanied by oxidative modification of proteins (glutathionylation and carbonylation), influences the metabolism in the tumor cell on the whole. Under the effects of 1,4-dithioerythritol, an SH group protector, this alteration promotes formation of additional mechanisms to escape apoptosis, whereas under the effects of N-ethylmaleimide, an SH group blocker, it, on the contrary, promotes apoptosis activation.

Conclusions. The changes in the redox homeostasis of the tumor cell and modulation of oxidative modification of proteins (glutathionylation and carbonylation) under hypoxia are one of the promising approaches to targeted regulation of cell death.

Key words: redox status, tumor growth, oxidative stress, glutathione system, apoptosis, hypoxia.

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

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

For citation: Nosareva O.L., Orlov D.S., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A. Molecular mechanisms of the effects of N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol on regulation of apoptosis in P19 cells under hypoxia. *Bulletin of Siberian Medicine*.2020; 19 (2): 72–77. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-72-77>.

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонный рост и высокая смертность от онкологических заболеваний ставят перед теоретической и практической медициной задачу поиска молекулярных мишеней активации гибели опухолевых клеток. Весомый вклад в изменение редокс-статуса клетки вносит функционирование митохондрий как основного источника генерации активных форм кислорода [1, 2]. Известно, что уровень продукции активных форм кислорода напрямую зависит от напряжения кислорода внутри клетки и деятельности ферментов цепи переноса электронов. В настоящее время активные формы кислорода рассматриваются важными сигнальными молекулами, которые могут

вызывать окисление нуклеиновых кислот, липидов и функциональных доменов белков [3]. Окислительная модификация этих макромолекул способствует возникновению нестабильности генома, неконтролируемой пролиферации, нарушению регуляции апоптоза, активации ангиогенеза, изменению направленности внутриклеточных метаболических путей опухолевых клеток [4–7]. Накопление окислительно-модифицированных белков в опухолевых клетках является одним из аспектов активации протеасом и наработки белков теплового шока, принимающих участие в регуляции клеточной гибели [8–10]. Особый интерес вызывает изучение триггерных механизмов апоптотической гибели опухолевых

клеток в условиях гипоксии, так как при этом опухолевая клетка приобретает не только дополнительную устойчивость к апоптотической гибели, но и к проводимой химиотерапии [11, 12].

С нашей точки зрения, глутатионилирование и карбонилирование белков являются одними из перспективных молекулярных механизмов для редокс-регуляции внутриклеточного сигналинга и процесса гибели опухолевых клеток в условиях гипоксии. Потенциальными внутриклеточными мишенями обратимой и необратимой модификации протеинов могут выступать ключевые белки-регуляторы клеточного цикла, ион-транспортирующие системы, факторы транскрипции [3, 13].

Цель исследования – оценить влияние N-этилмалеимида и 1,4-дителиозитрита на реализацию и регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследования были выбраны опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) из банка клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали монослойным способом в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37 °C в атмосфере 5%-го CO₂. Условия культивирования: питательная среда αMEM (БиолоТ, Россия), сыворотка эмбриональная бычья 10%-я (БиолоТ, Россия), L-глутамин 0,3 мг/мл (БиолоТ, Россия) и гентамицин 100 мкг/мл (Микроген, Россия). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,5%-го раствора трипанового синего (Serva, США). Для проведения эксперимента использовали культуру клеток, имеющей не более 5% погибших клеток.

С целью дополнительной продукции активных форм кислорода опухолевыми клетками проводили моделирование гипоксии в культуре опухолевых клеток линии P19 в инкубационной камере Hypoxia Incubator Chamber (STEMCELL, Канада), используя газовую смесь: 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂. Формирование условий гипоксии контролировали путем измерения концентрации растворенного кислорода, используя оксиметр Dissolved Oxygen Meter (HANNA HI 9146, Италия).

В качестве модуляторов редокс-статуса использовали блокатор SH-групп – N-этилмалеимид (NEM) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5 мМ [14] и протектор SH-групп – 1,4-дителиозитритол (DTE) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5 мМ [15].

После инкубации опухолевые клетки отмывали от питательной среды и лизировали путем ресуспендирования в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4)

с добавлением 1%-го тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) и охлаждения на льду с сохранением стандартной концентрации клеток для определения концентрации гидроксильного радикала и карбонильных производных белков. Содержание гидроксильного радикала оценивали по его способности (после предварительной опсонизации клеток зимозаном (Sigma-Aldrich, США)) разрушать модельный субстрат – 2-дезоксид-рибозу (Sigma-Aldrich, США) с образованием продукта реакции с максимумом поглощения при 532 нм [16]. Концентрацию карбонильных производных белков определяли по их реакции взаимодействия с 2,4-динитрофенилгидразином, продукт которой имеет максимум поглощения при длине волны 363 нм [17]. Результаты содержания гидроксильного радикала и карбонильных производных белков выражали в нмоль/мг белка.

Для определения содержания восстановленного, окисленного, белково-связанного глутатиона и SH-групп белков лизат клеток депротеинизировали с помощью 5%-го раствора сульфосалициловой кислоты. Концентрацию общего, окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона определяли методом, предложенным M.E. Anderson в модификации I. Rahman и соавт. [18]. Рассчитывали величину отношения GSH/GSSG как показатель изменения редокс-статуса клетки. Содержание SH-групп белков, а также белково-связанного глутатиона после предварительного его высвобождения из связи с белками с помощью 1%-го раствора боргидрида натрия, учитывали по реакции с 5,5-дителио-бис(2-нитробензойной) кислотой [19]. Результаты содержания фракций глутатиона, SH-групп белков и белково-связанного глутатиона выражали в нмоль/мг белка.

Содержание белка в клетках определяли по методу Бредфорда, основанном на взаимодействии аминокислотных остатков лизина и аргинина с красителем Кумасси голубым G-250 [20].

Учет экстинкции результатов проводили с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ-Спектр, Россия).

Оценку апоптотически измененных клеток проводили с помощью проточной цитометрии с использованием аннексина-V-FITC и пропидий йодида согласно инструкции фирмы-производителя (eBioscience, США). Подсчет количества аннексин-положительных клеток осуществляли к общему числу изучаемых клеток и выражали в процентах.

Количество CD95- и CD120-положительных клеток определяли с помощью набора моноклональных антител к соответствующим антигенам согласно протоколу производителя (R&D Systems, США). Результат выражали в условных единицах.

Оценку митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) клеток проводили с помощью набора Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (BD, США) по снижению спектрального свечения, используя 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианина иодид, который при деполяризации мембраны митохондрий неспособен проникать внутрь органелл и образовывать флуоресцирующие агрегаты. Количество клеток со сниженной флуоресценцией выражали в процентах.

Определение концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток проводили с помощью метода, основанном на их связывании липофильным зондом Fluo 3 AM с максимумом флуоресценции при 526 нм (Sigma-Aldrich, США) [21]. Результаты выражали в условных единицах, отражающих уровень свечения зонда на клетку.

Детекцию результатов проточной цитометрии проводили с помощью прибора FACSCanto II (BD, США) и с использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы SPSS 17.0. Проверка нормальности распределения количественных показателей осуществлялась с использованием критерия Шапиро – Уилка. Достоверность различий оценивалась с помощью непараметрических критериев Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни. Данные представляли в виде медианы верхнего и нижнего квартилей $Me (Q_1-Q_3)$. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нарушение регуляции апоптотической гибели опухолевых клеток на фоне снижения внутриклеточного напряжения кислорода сопряжено с изменением их редокс-статуса. В условиях гипоксии избыточная генерация активных форм кислорода связана с потерей электронов из дыхательной цепи митохондрий ввиду отсутствия конечного акцептора электронов и снижения активности IV комплекса – цитохромоксидазы. В связи с этим основной причиной формирования окислительного стресса в клетке является нарушение функционирования этих органелл [22]. Наиболее токсичной активной формой кислорода для макромолекул клетки является гидроксильный радикал. По мнению ряда авторов, именно $OH\cdot$ -радикал выступает самым мощным агентом, способствующим окислительной модификации белков [23, 24]. В ранее проведенном исследовании влияния гипоксии на метаболизм опухолевых клеток линии P19 нами было показано формирование окислительного стресса, сопряженное с изменением состояния систе-

мы глутатиона и активацией реализации апоптоза по сравнению опухолевыми клетками, культивированными при нормальной концентрации кислорода [25].

В условиях гипоксии при дополнительном внесении протектора SH-групп белков (DTE) в среду культивирования опухолевых клеток линии P19 нами было получено снижение концентрации $OH\cdot$ -радикала в 2,5 раза ($p < 0,05$), а также числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в 5,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с результатами, зарегистрированными в клетках при гипоксии (таблица). Наряду с этим в условиях гипоксии действие DTE сопровождалось значимым увеличением содержания GSH в 1,3 раза ($p < 0,05$) и концентрации свободных SH-групп белков в 1,5 раза ($p < 0,05$), снижением содержания белково-связанного глутатиона в 1,4 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимого значения концентрации карбонильных производных белков, GSSG и величины соотношения GSH/GSSG по сравнению с клетками, культивированными при гипоксии. При изучении реализации и регуляции апоптоза в условиях гипоксии и дополнительного добавления в среду культивирования опухолевых клеток линии P19 протектора SH-групп белков нами было получено значимое снижение числа аннексин-V-положительных клеток 2,0 раза ($p < 0,05$) и внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} в 1,1 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимых значений количества CD95- и CD120-положительных клеток по сравнению с гипоксией (см. таблицу). Таким образом, примененный нами 1,4-дитиозэритритол способствовал формированию дополнительной устойчивости опухолевых клеток линии P19 к триггерным механизмам запуска апоптоза в условиях гипоксии.

При модуляции редокс-статуса опухолевых клеток линии P19 с помощью блокатора SH-групп белков (NEM) в условиях гипоксии нами было получено значимое увеличение числа аннексин-V-положительных клеток в 9,1 раза ($p < 0,05$), CD95-положительных клеток – в 15,5 ($p < 0,05$) и CD120-положительных клеток – в 2,9 раза ($p < 0,05$), а также клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в 8,8 раза ($p < 0,05$) и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в 3,0 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимого значения содержания $OH\cdot$ -радикала по сравнению с результатами, зарегистрированными в клетках при гипоксии (см. таблицу). Действие NEM в опухолевых клетках линии P19 при гипоксии сопровождалось значимым снижением концентрации GSH в 3,4 раза ($p < 0,05$) и увеличением концентрации GSSG в 1,6 раза ($p < 0,05$), что привело к значимому снижению величины соотношения GSH/GSSG в 5,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с гипоксией.

Таблица

Влияние N-этилмалеимида и 1,4-дитиозеритрита на реализацию апоптоза, показатели системы глутатиона, содержание гидроксильного радикала и карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии, Me (Q_1-Q_3)			
Показатель	Гипоксия	Гипоксия + NEM	Гипоксия + DTE
Аннексин V-FITC+, %	10,75 (4,50–10,90)	98,05 (97,70–98,40) [#]	5,50 (4,70–6,70)
CD95, у.е.	1,0 (0,9–1,1)	15,5 (12,8–15,7) [#]	0,9 (0,8–1,2)
CD120, у.е.	1,4 (1,3–1,5)	4,1 (4,0–4,5) [#]	1,1 (1,0–1,2)
Клетки со сниженным ΔΨm, %	10,4 (10,4–10,6)	91,2 (90,8–92,0) [#]	2,0 (2,0–2,1) [#]
Концентрация гидроксильного радикала, нмоль/мг белка	27,21 (23,56–29,93)	29,94 (29,42–32,20)	10,70 (8,93–11,32) [#]
Содержание Ca ²⁺ в клетке, у.е.	10,24 (10,10–10,36)	30,23 (29,47–30,39) [#]	9,48 (9,43–9,49) [#]
GSH, нмоль/мг белка	4,47 (4,40–4,58)	1,30 (0,67–1,88) [#]	6,00 (5,97–6,32) [#]
GSSG, нмоль/мг белка	0,43 (0,39–0,45)	0,69 (0,50–0,72) [#]	0,72 (0,34–0,81)
GSH/GSSG	10,19 (9,88–11,35)	1,89 (0,93–4,22) [#]	8,37 (7,93–17,27)
Белково-связанный глутатион, нмоль/мг белка	2,08 (1,95–2,19)	2,96 (2,08–3,26)	1,48 (1,43–1,51) [#]
SH-группы белков, нмоль/мг белка	8,76 (7,83–10,55)	9,62 (9,40–10,28)	12,98 (12,75–13,36) [#]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	10,17 (8,92–10,39)	14,34 (14,27–17,63) [#]	7,54 (6,64–8,32)

Примечание. GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, NEM – N-этилмалеимид, DTE – 1,4-дитиозеритритол.

[#] достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой «гипоксия».

При этом действие блокатора SH-групп белков в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии сопровождалось значимым увеличением концентрации карбонильных производных протеинов в 1,4 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимых значений содержания свободных SH-групп белков и белково-связанного глутатиона по сравнению со значениями, полученными в опухолевых клетках при гипоксии (см. таблицу). Применение N-этилмалеимида оказывало влияние на метаболизм опухолевых клеток, в том числе на функционирование митохондрий, изменение содержания ионов Ca²⁺ и карбонилированных белков, что сопровождалось активацией запуска апоптотической гибели в условиях гипоксии.

Результаты проведенного исследования позволяют утверждать о влиянии редокс-статуса клетки, окислительной модификации белков в обеспечении функционирования опухолевых клеток, в том числе их митохондрий, при сниженном напряжении кислорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение редокс-статуса системы глутатиона, глутатионирование и карбонилирование протеинов влияют на метаболизм опухолевой клетки. Действие протектора SH-групп белков – 1,4-дитиозеритрита, способствует формированию дополнительных механизмов ускользания от клеточной гибели, а применение блокатора SH-групп протеинов – N-этилмалеимида, сопровождается активацией апоптоза опухолевых клеток линии P19. Принимая во внимание ведущую роль окислительно-восстановительного гомеостаза клетки в запуске апоптоза, проведенное нами исследование подтверждает необ-

ходимость изучения механизмов клеточной гибели и развития устойчивости опухолевых клеток к воздействию противоопухолевых препаратов, действие которых основано на изменении редокс-статуса клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sinha K., Das J., Pal P.B., Sil P.C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*. 2013; 87 (7): 1157–1180. DOI: 10.1007/s00204-013-1034-4.
2. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016; 1863 (12): 2977–2992. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
3. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Feldman N.B., Lutsenko S.V. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radical Research*. 2018; 52 (5): 507–543. DOI: 10.1080/10715762.2018.1457217.
4. Tew K.D., Manevich Y., Grek C., Xiong Y., Uys J., Townsend D.M. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 51 (2): 299–313. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.013.
5. Степовая Е.А., Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Закирова Е.В., Наумова А.И., Веснина О.Н., Орлов Д.С., Шахристова Е.В., Иванов В.В., Новицкий В.В. Роль окислительной модификации белков в редокс-зависимой регуляции апоптоза опухолевых клеток. *Молекулярная медицина*. 2015; 4: 60–64.
6. Patwardhan R.S., Sharma D., Checker R., Thoh M., Sandur S.K. Spatio-temporal changes in glutathione and thioredoxin redox couples during ionizing radiation-induced oxidative stress regulate tumor radio-resistance. *Free Radical Research*. 2015; 49 (10): 1218–1232. DOI: 10.3109/10715762.2015.1056180.
7. Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Ryazantseva N.V., Nosareva O.L., Yakushina V.D., Ivanov V.V., Novitskii V.V.

- Role of glutathione system redox potential in apoptosis dysregulation in MCF-7 breast adenocarcinoma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016; 160 (3): 364–367. DOI: 10.1007/s10517-016-3172-1.
8. Shashova E.E., Astakhova T.M., Plekhanova A.S., Bogomyagkova Y.V., Lyupina Y.V., Sumedi I.R., Slonimskaya E.M., Er-okhov P.A., Abramova E.B., Rodoman G.V., Kuznetsov N.A., Kondakova I.V., Sharova N.P., Choinzonov E.L. Changes in proteasome chymotrypsin-like activity during the development of human mammary and thyroid carcinomas. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 156 (2): 242–244.
 9. Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D., Shashova E.E., Choinzonov E.L., Ivanova E.V., Kolomiets L.A., Chernyshova A.L., Slonimskaya E.M., Usynin E.A., Afanasev S.G. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers. *Molecular Biology*. 2014; 48 (3): 384–389.
 10. Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Konovalova E.V., Orlov D.S., Naumova A.I., Didenko S.A., Vesnina O.N., Shakhristova E.V., Zima A.P., Novitskii V.V. Role of heat shock protein 27 in regulation of glutathione system and apoptosis of Jurkat tumor cells and blood lymphocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 158 (3): 377–379. DOI: 10.1007/s10517-015-2766-3.
 11. Marengo B., Nitti M., Furfaro A.L., Colla R., Ciucis C.D., Marinari U.M., Pronzato M.A., Traverso N., Domenicotti C. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016: 6235641. DOI: 10.1155/2016/6235641.
 12. Zhang T., Suo C., Zheng C., Zhang H. Hypoxia and metabolism in metastasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019; 1136: 87–95. DOI: 10.1007/978-3-030-12734-3_6.
 13. Степовая Е.А., Шахристовна Е.В., Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Чильчигашев Р.И., Егорова М.Ю. Система тиоредоксина в регуляции пролиферации клеток линии MCF-7 при модуляции редокс-статуса. *Сибирский онкологический журнал*. 2016; 15 (4): 50–55. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-4-50-55.
 14. Sahaf B., Neydari K., Herzenberg L.A. Lymphocyte surface thiol levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100 (7): 4001–4005. DOI: 10.1073/pnas.2628032100
 15. Brunelli L., Crow J.P., Beckman J.S. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995; 316 (1): 327–334. DOI: 10.1006/abbi.1995.1044
 16. Thom S.R., Elbuken M.E. Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*. 1991; 10 (6): 413–426. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90050-d
 17. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб.: Фолиант, 2000: 103.
 18. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth. *Journal of Radiation Research*. 2004; 45 (1): 33–39. DOI: 10.1269/jrr.45.33.
 19. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B., Leinbach E.D., Berlin R.D. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Cell Biology*. 1978; 76 (2): 439–447. DOI: 10.1083/jcb.76.2.439.
 20. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
 21. Merritt J.E., McCarthy S.A., Davies M.P., Moores K.E. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca²⁺ in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca²⁺. *The Biochemical Journal*. 1990; 269 (2): 513–519. DOI: 10.1042/bj2690513.
 22. Munro D., Treberg J.R. A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species. *The Journal of Experimental Biology*. 2017; 220 (Pt 7): 1170–1180. DOI: 10.1242/jeb.132142.
 23. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции. *Кислород и антиоксиданты*. 2009; 1: 3–64.
 24. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017: 284.
 25. Орлов Д.С., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Шахристовна Е.В., Иванов В.В. Редокс-зависимые механизмы дисрегуляции апоптоза опухолевых клеток при гипоксии. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2017; 37 (1): 21–26.

Сведения об авторах

Носарева Ольга Леонидовна, д-р мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7441-5554.

Орлов Дмитрий Сергеевич, ассистент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-7525-0176.

Шахристовна Евгения Викторовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-2938-1137.

Степовая Елена Алексеевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9339-6304.

✉ **Носарева Ольга Леонидовна**, e-mail: olnosareva@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.08.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Скрининг депрессии с оценкой социально-экономического статуса пациентов в первичной медицинской сети в крупном промышленном центре Восточной Сибири

Песковец Р.Д., Штарик С.Ю., Евсюков А.А.

Красноярский государственный медицинский университет (КрасГМУ) им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Россия, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценить взаимосвязь выраженности симптомов депрессии по Госпитальной шкале тревоги и депрессии HADS (The Hospital Anxiety and Depression Scale; подшкала HADS(d)) среди неорганизованного населения г. Красноярск в 2006 и 2012 гг. с социально-экономическими и демографическими факторами, а также сопоставить их распространенности за анализируемый период.

Материалы и методы. Обследованы две выборки, сформированные из неорганизованного населения, постоянно проживавшего на территории г. Красноярск в 2006 и 2012 гг. Оценка выраженности симптомов депрессии в обоих случаях проводилась согласно HADS(d).

Результаты. В обеих выборках отмечена связь частоты симптомов депрессии с возрастом. В 2012 г. выявлены социальные и экономические факторы депрессии: отсутствие высшего образования, вдовство, безработица и бедность семьи. Установлено значимое снижение частоты повышенной (39,1 против 16,4%) и клинической депрессии (14,6 против 4,5%) за период с 2006 по 2012 г.

Заключение. В 2012 г. частота уровня депрессии «выше нормы» по HADS(d) в трудоспособном возрасте во многом обусловлена влиянием социально-экономических факторов. Установлено снижение частоты повышенного и клинического уровня депрессии по HADS(d) среди взрослого населения г. Красноярск за период с 2006 по 2012 г.

Ключевые слова: распространенность депрессии, распространенность социально-экономических факторов, взаимосвязь депрессии и социально-экономических факторов, гендерные различия депрессии.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследования «Профилактика и лечение артериальной гипертонии», «ЭССЕ-РФ 2012» в г. Красноярске были одобрены локальным этическим комитетом (ЛЭК) КрасГМУ (протокол № 23 от 02.04.2006), независимыми этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» и ЛЭК КрасГМУ (протокол № 12 от 08.10.2012). Разрешение на обработку данных исследования авторами статьи получено ЛЭК ГМУ (протокол № 66 от 15.12.2015).

Для цитирования: Песковец Р.Д., Штарик С.Ю., Евсюков А.А. Скрининг депрессии с оценкой социально-экономического статуса пациентов в первичной медицинской сети в крупном промышленном центре Восточной Сибири. *Бюллетень сибирской медицины.* 2020; 19 (2): 78–84. <https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2020-2-78–84>.

Screening of depression with an assessment of the socioeconomic status of patients in the primary care network in the large industrial city of Eastern Siberia

Peskovets R.D., Shtarik S.Yu., Evsyukov A.A.

Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky
1, Partizana Zheleznyaka Str., 660022, Russian Federation

ABSTRACT

The aim was to compare the relationship between the severity of depression symptoms among the unorganized population of Krasnoyarsk in 2006 and 2012 with respect to socioeconomic and demographic factors; and to compare their prevalence for the analyzed period.

Materials and methods. Two sample groups were selected from the unorganized population that resided permanently in the territory of Krasnoyarsk in 2006 and 2012. Evaluation of the severity of depression in both cases was carried out according to the Hospital Anxiety and Depression Scale, Depression subscale (HADS-D).

Results. In both sample groups, the frequency of depression was associated with age. In 2012, social and economic factors of depression were revealed: lack of higher education, widowhood, unemployment and family poverty. A significant decrease in the frequency of increased (39.1% vs 16.4%) and clinical depression (14.6% vs 4.5%) was found for the period from 2006 to 2012.

Conclusions. In 2012, the frequency of the above-normal depression level according to HADS-D in working age population was largely determined by the influence of socioeconomic factors. A decrease in the frequency of increased and clinical levels of depression among the adult population of Krasnoyarsk over the period from 2006 to 2012 was established.

Key words: prevalence of depression, prevalence of socioeconomic factors, relationship between depression and socioeconomic factors, gender differences in depression

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

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

Conformity with the principles of ethics. The study "Prevention and Treatment of Hypertension" was approved by the Local Ethics Committee (LEC) of KrasSMU (Protocol No. 23, of April 4, 2006). The study "ESSE-RF 2012" was approved by the independent Ethics Committee of the National Medical Research Center of Preventive Medicine and LEC of KrasSMU (Protocol No. 12, of October 8, 2012). Permission to process the data of the study was received from LEC of KrasSMU (Protocol No. 66, of December 15, 2015).

For citation: Peskovets R.D., Shtarik S.Yu., Evsyukov A.A. Screening of depression with an assessment of the socioeconomic status of patients in the primary care network in the large industrial city of Eastern Siberia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 78–84. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-78-84>.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы все большее внимание отечественных и зарубежных исследователей привлекает проблема роста расстройств настроения в трудоспособном возрасте. Так, по оценкам Всемирной организации здравоохранения, к 2020 г. депрессия займет второе место среди основных причин нетрудоспособности, уступая первую позицию сердечно-сосудистым заболеваниям (ССЗ). Между тем в России сохраняется значительный разброс данных в отношении распространенности депрессии в общей медицинской сети, что связано с низким скринин-

гом симптомов депрессии на амбулаторном этапе, а также отсутствием унифицированного метода ее диагностики [1].

В этой связи под руководством академика А.Б. Смулевича была разработана методика выявления тревожных и депрессивных расстройств с использованием психометрических шкал; при этом отдавалось предпочтение субъективным опросникам, так как их заполнение не требует участия психиатра и специальных навыков для интерпретации полученных данных врачами общей практики [2]. Доказано, что используемая в нашем исследовании Госпитальная шкала тревоги и депрессии HADS (The

Hospital Anxiety and Depression Scale) обладает высокой валидностью в отношении диагностики депрессии как среди пациентов общемедицинской сети, так и в общей популяции, что было подтверждено рядом исследований; кроме того, данный опросник не занимает много времени и не вызывает затруднений у пациента при его заполнении [1, 3, 4].

В настоящее время депрессивным расстройствам отводится ключевая роль в развитии ССЗ; считается, что депрессия является «переходным мостиком» между социальными (уровень дохода, обеспеченность семьи и др.) и биологическими факторами риска (ФР) [5]. Хорошо известно, что низкий социальный статус ассоциирован с неблагоприятным профилем поведения (курение и злоупотребление алкоголем), пусковым фактором которого являются стресс и депрессия [6]. В то же время не существует единого мнения относительно влияния социальных факторов на течение депрессии в трудоспособном возрасте. Некоторые исследователи считают, что меньший риск депрессии среди работающих лиц в зрелом и пожилом возрасте связан, прежде всего, с их соматическим состоянием, однако существует и иная точка зрения, согласно которой первостепенное значение защиты от депрессии отводится фактору трудовой занятости [6, 7].

В исследовании О.В. Цыганковой отсутствие семьи, низкий уровень дохода, возраст и безработица проявили сильные связи с высокой частотой субдепрессии у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [8]. По данным А.В. Орлова, высокая частота депрессии среди взрослого населения г. Санкт-Петербурга, прежде всего, обусловлена низким уровнем дохода; наряду с этим другие исследования показали, что более высокий уровень депрессии связан с низким уровнем образования, а не благосостоянием семьи [5, 9]. В исследовании Е.В. Лебедевой (2018) нарушения социальной адаптации (управление доходами, семейные проблемы) проявили значимую связь с аффективными расстройствами среди пациентов с ИБС [10].

В г. Красноярске было проведено единственное крупное исследование, посвященное изучению распространенности депрессии; изучена связь депрессии с артериальной гипертензией. В то же время не проводились исследования, касающиеся связи депрессии с социально-экономическими факторами, что делает нашу работу актуальной в научном и прикладном направлении [11, 12].

Цель исследования – оценка связи симптомов депрессии с социально-экономическими и демографическими факторами, а также оценка встречаемости симптомов депрессии в двух независимых выборках,

сформированных из неорганизованного населения г. Красноярска в 2006 и 2012 гг. с использованием психометрического тестирования (шкалы HADS(d)).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе приводится анализ двух независимых выборок: первая была сформирована в 2006 г. в рамках региональной целевой программы «Профилактика и лечение артериальной гипертонии», осуществляемой в Красноярском крае с 2001 г., вторая – в 2012 г. в ходе многоцентрового исследования «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в регионах Российской Федерации-2012» («ЭССЕ РФ-2012»). Проект «ЭССЕ РФ-2012» является последним эпидемиологическим исследованием, в ходе которого изучалась частота ФР ССЗ, в том числе и симптомов депрессии, среди взрослого населения г. Красноярска. Между тем координаторами исследования в г. Красноярске Ю.И. Гриншейном и М.М. Петровой был сделан акцент на анализе только традиционных ФР, при этом попытки оценки данных ФР с депрессией до сих пор не предпринимались [12].

В анализе С.А. Шальной приводятся данные психометрического тестирования для 10 регионов – участников исследования, аналогичные сведения по г. Красноярску (частота повышенной / клинически выраженной депрессии по HADS(d), гендерные аспекты депрессии) отсутствуют [1]. Кроме того, похожих исследований после 2012 г. в случайных выборках г. Красноярска не проводилось. Полученные данные могут быть использованы с целью разработки мероприятий, направленных на своевременный скрининг и профилактику депрессии в общемедицинской сети.

В обоих случаях сформированы стратифицированные случайные выборки по методу Киша с учетом принципов кластерности и репрезентативности по полу и возрасту (25–64 лет) [12]. В 2006 г. методом случайной выборки в 10 поликлиниках г. Красноярска включили в исследование 322 человека: 105 мужчин (32,6%) и 217 женщин (67,4%), отклик на исследование составил 80,2%. Объем репрезентативной выборки определен на основе метода В.И. Паниотто (2003), согласно которому для совокупности более 100 тыс. человек размер выборки составляет 400 единиц [13]. В 2012 г. в четырех городских поликлиниках было обследовано 1 123 пациента, отклик на исследование составил 80%. Корректные данные по HADS(d) были получены от 1 120 респондентов: 408 мужчин (36,4%) и 712 женщин (63,6%).

В 2006 г. оценивались следующие социально-демографические факторы: возраст, отсутствие высшего образования, принадлежность к руководящему составу и наличие инвалидности; в 2012 г. – отсут-

ствие высшего образования, отсутствие семьи, вдовство, отсутствие работы, инвалидность, бедность семьи на субъективном восприятии. Сравнительная характеристика частоты некоторых изучаемых факторов в 2006 и 2012 гг. приведена в табл. 1.

Таблица 1

Сравнительная характеристика частоты изучаемых факторов в 2006 и 2012 гг., абс. (отн., %)			
Фактор	Количество пациентов, 2006 г.	Количество пациентов, 2012 г.	<i>p</i>
Пол: – женский; – мужской	217 (67,4) 105 (32,6)	714 (63,6) 409 (36,4)	0,208
Возраст: – ≥45 лет; – <45 лет	194 (60,2) 128 (39,8)	558 (49,8) 562 (50,2)	<0,001*
Высшее образование: – есть; – нет	93 (29,2) 226 (70,8)	602 (53,8) 518 (46,2)	<0,001*
Инвалидность: – есть; – нет	24 (7,5) 298 (92,5)	39 (3,5) 1 081 (96,5)	0,003*

Примечание. Здесь и в табл. 2 уровень образования определен у 319 пациентов: 105 мужчин и 214 женщин.

* значимые различия между группами (по критерию Манна – Уитни для уровня депрессии и согласно критерию χ^2 для прочих показателей) (здесь и в табл. 2, 3).

Выраженность симптомов депрессии оценивалась согласно подшкале депрессии HADS(d), надежность, чувствительность и специфичность которой в России были установлены в ходе исследования, проведенного на этапе подготовки к выполнению программы КОМПАС. Доказано, что при использовании данной методики с учетом оптимальных точек отграничения

риск пропустить депрессию невелик. При интерпретации результатов учитывался суммарный показатель по подшкале «депрессия (D)»: 0–7 баллов – отсутствие депрессии; 8–10 баллов – «субклинически выраженная депрессия»; 11 баллов и выше – «клинически выраженная депрессия»; 8+ – повышенный уровень депрессии – суммарный показатель субклинической и клинической депрессии [3, 5].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием прикладных программ SPSS v. 23 (StatSoft Inc., США) и электронных таблиц Microsoft Excel (2010). В исследовании применены непараметрические критерии: *U*-критерий Манна – Уитни и критерий Вилкоксона при попарных сравнениях и критерий Краскела – Уоллиса при множественных сравнениях. Количественные данные представлены в виде медианы нижнего и верхнего процентиля *Me* (Q_{25} – Q_{75}), качественные – в виде относительной частоты (%). Оценка сравнения качественных показателей проводилась с использованием критерия χ^2 Пирсона с учетом степеней свободы *df*. Критический уровень статистической значимости при проверке нулевой гипотезы принимался равным 0,05 и менее. В статье обсуждаются только статистически значимые связи.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты оценки выраженности симптомов депрессии в двух выборках приведены в табл. 2 и 3; при сравнении лиц в 2006 и 2012 г. было установлено значимое снижение доли лиц с повышенным уровнем депрессии ($\chi^2 = 76,4$; *df* = 1; *p* < 0,001) и клинической депрессией ($\chi^2 = 40,9$; *df* = 1; *p* < 0,001); при этом медиана среднего уровня депрессии в 2006 г. была значимо выше, чем в 2012 г. (*p* < 0,001).

Таблица 2

Взаимосвязь симптомов депрессии с полом, уровнем образования, возрастом, принадлежностью к руководящей должности и инвалидностью в 2006 г., <i>n</i> = 322			
Показатель	Уровень депрессии, <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75})	Количество и частота пациентов с различными уровнями депрессии, <i>n</i> (%)	
		HADS ≥ 8	HADS ≥ 11
Общая выборка	6,0 (3,75–10,0)	126 из 322 (39,1)	47 из 322 (14,6)
Мужчины	7,0 (3,5–10,0)	43 из 105 (41,0)	16 из 105 (15,2)
Женщины	6,0 (3,5–10)	83 из 217 (38,2)	31 из 217 (14,3)
Высшее образование:			
– есть;	6,0 (3,0–9,0)	32 из 93 (34,4)	12 из 93 (12,9)
– нет	7,0 (4,0–10,0)	93 из 226 (41,2)	34 из 226 (15,0)
Возраст:			
– ≥ 45 лет;	7,0 (5,0–10,0)*	90 из 194 (46,4)*	37 из 194 (19,1)*
– < 45 лет	5,0 (2,0–8,0)*	36 из 128 (28,1)*	10 из 128 (7,8)*
Руководящая должность:			
– да;	6,0 (3,75–9,0)	25 из 66 (37,9)	9 из 66 (13,6)
– нет	7,0 (3,25–10,0)	101 из 256 (39,5)	38 из 256 (14,8)
Инвалидность:			
– есть;	8,0 (5,3–11,5)*	13 из 24 (54,2)	6 из 24 (25,0)
– нет	6,0 (3,0–9,0)*	113 из 298 (37,9)	41 из 298 (13,8)

Взаимосвязь депрессии с полом, уровнем образования, возрастом, семейным статусом и занятостью в 2012 г., <i>n</i> = 1 120			
Показатель	Уровень депрессии, <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75})	Количество и частота пациентов с различными уровнями депрессии, <i>n</i> (%)	
		HADS \geq 8	HADS \geq 11
Общая выборка	4,0 (2,0–6,0)	184 из 1 120 (16,4)	50 из 1 120 (4,5)
Мужчины	3,0 (1,25–6,0)*	56 из 408 (13,7)	16 из 408 (3,9)
Женщины	4,0 (2,0–6,75)*	128 из 712 (18,0)	34 из 712 (4,8)
Высшее образование:			
– есть;	3,0 (1,0–6,0)*	83 из 602 (13,8)*	24 из 602 (4,0)
– нет	4,0 (2,0–7,0)*	101 из 518 (19,5)*	26 из 518 (5,0)
Возраст:			
– \geq 45 лет;	4,0 (2,0–6,0)*	102 из 558 (18,3)	33 из 558 (5,9)*
– < 45 лет	3,0 (2,0–6,0)*	82 из 562 (14,6)	17 из 562 (3,0)*
Семейный статус:			
– семья есть;	4,0 (1,8–6,0)	148 из 918 (16,1)	42 из 918 (4,6)
– семьи нет	4,0 (2,0–7,0)	36 из 202 (17,8)	8 из 202 (4,0)
Вдовство:			
– есть;	5,0 (2,0–8,0)*	23 из 86 (26,7)*	5 из 86 (5,8)
– нет	4,0 (2,0–6,0)*	160 из 1 032 (15,5)*	45 из 1 032 (4,4)
Инвалидность:			
– есть;	5,0 (1,0–7,0)	9 из 39 (23,1)	1 из 39 (2,6)
– нет	4,0 (2,0–6,0)	175 из 1 081 (16,2)	49 из 1 081 (4,5)
Отсутствие работы:			
– да;	5,0 (1,5–7,0)	12 из 57 (21,1)	7 из 57 (12,3)*
– нет	4,0 (2,0–6,0)	172 из 1 063 (16,2)	43 из 1 063 (4,0)*
Бедность семьи:			
– да;	4,0 (2,0–6,0)*	33 из 101 (32,7)*	12 из 101 (11,9)*
– нет	5,0 (2,5–8,0)*	151 из 1 019 (14,8)*	38 из 1 019 (3,7)*

В 2006 г. мужчины и женщины были статистически сопоставимы как по уровню ($p = 0,722$), так и по частоте повышенной ($\chi^2 = 0,2$; $df = 1$; $p = 0,641$) и клинической ($\chi^2 = 0,1$; $df = 1$; $p = 0,820$) депрессии. В 2012 г. среди женщин были отмечены незначимые тенденции к большей частоте повышенной ($\chi^2 = 3,4$; $df = 1$; $p = 0,065$) и клинической депрессии ($\chi^2 = 0,44$; $df = 1$; $p = 0,506$), в то же время мужчины характеризовались более низким уровнем депрессии ($p = 0,002$). В 2006 г. депрессия не проявляла значимой связи с социально-экономическими факторами, в 2012 г. частота симптомов депрессии имела выраженную зависимость от ФР. Так, в 2006 г. отсутствие высшего образования не влияло на частоту повышенной депрессии ($\chi^2 = 1,3$; $df = 1$; $p = 0,262$), однако в 2012 г. данный фактор ассоциировался с большей частотой повышенной депрессии ($\chi^2 = 6,6$; $df = 1$; $p = 0,010$). В 2012 г. вдовство ассоциировалось с большей частотой повышенной депрессии ($\chi^2 = 6,6$; $df = 1$; $p = 0,010$), а безработица в 3 раза увеличивала вероятность развития клинической депрессии ($\chi^2 = 6,8$; $df = 1$; $p = 0,009$ с поправкой Йетса). В семьях с низким благосостоянием повышенный и клинический уровни депрессии регистрировались значимо чаще, чем в более обеспеченных семьях ($\chi^2 = 21,3$; $df = 1$;

$p < 0,001$ и $\chi^2 = 14,3$; $df = 1$; $p < 0,001$ соответственно). Для анализа связи депрессии с возрастом лица были разделены на две группы: от 25 до 44 лет и от 45 до 64 лет. В 2006 г. анализ показал преобладание лиц с повышенной ($\chi^2 = 10,8$; $df = 1$; $p = 0,001$) и клинической депрессией ($\chi^2 = 7,8$; $df = 1$; $p = 0,005$) в более старшей возрастной группе (≥ 45 лет); при этом в 2012 г. связь возраста с частотой симптомов депрессии оказалась более слабой как по силе, так и по уровню статистической значимости и достигала значимых различий между группами только в отношении клинической депрессии ($\chi^2 = 5,5$; $df = 1$; $p = 0,019$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные по частоте симптомов депрессии по HADS(d) среди взрослого населения г. Красноярска в 2006 г. согласуются с данными С.Ю. Штарик, согласно которым в 2004–2008 гг. расстройства депрессивного спектра (РДС) по тесту Бека были выявлены среди 34,7% респондентов в возрасте 19–64 лет, в то же время однозначно сопоставить результаты обоих исследований невозможно ввиду различий в методиках психометрического тестирования и возраста испытуемых. По оценке С.А. Шальной, среди 10 регионов – участников исследования

«ЭССС РФ-2012» по HADS(d) повышенный уровень депрессии регистрируется среди 25,6% взрослого населения нашей страны, при этом $\frac{1}{3}$ показателя (8,8%) приходится на клинический уровень. В 2012 г. население г. Красноярска оказалось сопоставимым по частоте повышенной и клинической депрессии с Кемеровской (16,7 и 5,0%) областью и г. Санкт-Петербургом (18,9 и 5,7%) [1, 11].

Наши результаты несколько разнятся с данными российских и зарубежных авторов, согласно которым симптомы депрессии среди женщин встречаются в 2–4 раза чаще (особенно в постклимактерическом периоде) в сравнении с мужчинами: в исследовании НАРИЕЕ в выборке из 2 151 респондента в возрасте 45–64 лет по шкале CES-D частота депрессии среди женщин достигала 44%, а среди мужчин – вдвое меньше (23%); в работе О.В. Цыганковой среди 245 пациентов с ИБС в возрасте 35–65 лет вероятность обнаружения субдепрессии по шкале Зунга у женщин была в 2 раза выше – 41,2% против 24,0 [7, 8, 14]. В то же время в г. Красноярске группы пациентов с РДС в 2004–2008 гг. по половому составу были сопоставимы [11]. Следует отметить, что в исследовании «ЭССС РФ-2012» среди 10 субъектов РФ мужчины и женщины по частоте симптомов депрессии различались незначительно: 20,6% среди женщин против 20,0% среди мужчин по показателю HADS(d) ≥ 8 , а в работе F.N. Jaska (2011) среди 2 957 норвежцев в возрасте 46–49 лет уровень депрессии «выше нормы» по HADS(d) регистрировался среди 9,6% мужчин и 7,6% женщин [1, 15].

Проведенное исследование подтверждает, что низкий уровень образования и бедность семьи являются факторами, ассоциированными с низким социальным статусом и высокой распространенностью депрессии [1, 11]. В 2012 г. связи частоты симптомов депрессии с бедностью семьи оказались сильнее, чем с низким уровнем образования по силе и уровню значимости. В 2004–2008 гг. в г. Красноярске пациенты с РДС по шкале Бека имели более низкий уровень образования [11]. В исследовании А.В. Орлова среди 1 600 жителей г. Санкт-Петербурга в возрасте 25–64 лет в ходе регрессионного анализа после поправки на пол и биологические ФР связь симптомов депрессии по HADS(d) с низким образованием не подтвердилась [5].

Считается, что одиночество и смерть близких являются ФР депрессии [6]. По нашим данным, в 2012 г. вдовы лица наиболее часто встречались в старшей возрастной группе 55–64 лет (61,6%), среди них частота повышенного уровня депрессии была максимальной – 26,7%. В 2006 г. частота симптомов депрессии не зависела от занимаемой должности, в то же время в 2012 г. отсутствие работы ассоци-

ровалось с большей частотой клинического уровня депрессии. При этом, как отмечено в работе О.В. Цыганковой, среди женщин субсиндромальные проявления депрессии проявляют более сильную связь с безработицей, чем с отсутствием семьи и возрастом [8]. Очевидно, что на современном этапе прослеживается тенденция в пользу ослабления ассоциации между возрастом и частотой депрессии. По мнению В.В. Гафарова, с наступлением 45 лет значение возраста перестает влиять на распространенность депрессии, и в возрасте 45–69 лет средний уровень депрессии остается на одном уровне [16]. Между тем в обеих выборках лица с клинически выраженной депрессией по HADS(d) чаще всего регистрировались в старшей возрастной группе. Аналогичный рост градиента частоты симптомов депрессии по мере увеличения возраста был отмечен в исследовании С.А. Шальной, однако в рамках исследования НАРИЕЕ среди жителей г. Новосибирска данная ассоциация оказалась незначимой [1, 7, 16].

На результаты проведенного исследования существенные ограничения вносит ряд факторов. Изучаемые выборки различались по возрасту испытуемых; значимыми были различия по частоте лиц с инвалидностью (что можно объяснить их естественной гибелью за 6-летний период) и с высшим образованием (29,2% против 46,3, обусловленный, по всей видимости, приростом населения в 2012 г.). В то же время инвалидность и низкий уровень образования в 2006 г. не влияли на вариабельность симптомов депрессии. Так или иначе, к выводам о снижении частоты симптомов депрессии в 2012 г. следует отнестись с некоторой долей критики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время возросло влияние социально-экономических факторов на вариабельность симптомов депрессии: если в 2006 г. такие связи не прослеживались, то в 2012 г. мы смогли выявить «социальные» категории лиц, наиболее склонных к депрессии. С 2006 по 2012 г. среди взрослого населения г. Красноярска отмечено снижение частоты повышенного и клинического уровней депрессии по HADS(d).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шальной С.А., Евтифеева С.Е., Деев А.Д., Артамонова Г.В., Гатагонова Т.М., Дупляков Д.В., Ефанов А.Ю., Жернакова Ю.В., Конради А.О., Либси Р.А., Минаков Э.В., Недогода С.В., Ощепкова Е.В., Романчук С.В., Ротарь О.П., Трубачева И.А., Шляхто Е.В., Бойцов С.А. Распространенность тревоги и депрессии в различных регионах Российской Федерации и ее ассоциации с социально-демографическими факторами (по данным исследования

- ЭССЕ-РФ). *Терапевтический архив*. 2014. 86 (12): 53–60. DOI: 10.17116/terarkh2014861253-60.
- Смулевич А.Б. Депрессия в общемедицинской практике. М.: Берг, 2000: 160.
 - Vjelland I., Dahl A.A., Haug T.T., Neckelmann D. The validity of the Hospital Anxiety and Depression Scale. An updated literature review. *Journal of Psychosomatic Research*. 2002; 52: 69–77. DOI: 10.1016/s0022-3999(01)00296-3.
 - Андрющенко А.В., Дробижев М.Ю., Добровольский А.В. Сравнительная оценка шкал CES-D, BDI и HADS (d) в диагностике депрессий в общемедицинской практике. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2003; 5: 11–18.
 - Орлов А.В., Ротарь О.П., Бояринова М.А., Алиева А.С., Могучая Е.В., Паскарь Н.А., Солнцев В.Н., Баранова Е.А., Коиради А.О. Тревожно-депрессивные расстройства – связующее звено между социально-экономическими, поведенческими и биологическими сердечно-сосудистыми факторами риска? *Сибирское медицинское обозрение*. 2017; 2 (104): 60–66. DOI: 10.20333/2500136-2017-2-60-66.
 - Иванец Н.Н., Кинкулькина М.А., Морозов Д.И., Авдеева Т.И. Психогенные депрессии: современный взгляд на возрастные особенности клинической картины и терапии. Сравнительная характеристика особенностей психотравмирующих событий, вызывающих психогенные депрессии в молодом и позднем возрасте (пилотное исследование). *Психиатрия и психофармакотерапия*. 2017; 19 (5): 4–14.
 - Bobak M., Pikhart H., Pajak A., Kubinova R., Malyutina S., Sebakova H., Topor-Madry R., Nikitin Yu., Marmot M. Depressive symptoms in urban population samples in Russia, Poland and the Czech Republic. *The British Journal of Psychiatry*. 2006; 188 (4): 359–365. DOI: 10.1192/bjp.188.4.359.
 - Цыганкова О.В., Платонов Д.Ю., Николаев К.Ю., Бондарева З.Г., Рагино Ю.И., Латынцева Л.Д., Екимова Ю.С., Костюк Т.А. Распространенность субдепрессии у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца и ее связь с демографическими и социально-экономическими факторами. *Проблемы женского здоровья*. 2014; 9 (2): 18–26.
 - Winkleby M.A., Jatulis D.E., Frank E., Fortmann S.P. Socio-economic status and health: how education, income, and occupation contribute to risk factors for cardiovascular disease. *American Journal of Public Health*. 1992; 82 (6): 816–820. DOI: 10.2105/ajph.82.6.816.
 - Лебедева Е.В., Счастный Е.Д., Симуткин Г.Г., Репин А.Н., Нонка Т.Г. Клиническая характеристика аффективных расстройств и эффективность антидепрессивной терапии у больных хронической ишемической болезнью сердца. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (4): 85–93. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-85-93.
 - Штарик С.Ю., Петрова М.М., Гарганеева Н.П. «Психическое здоровье» большого города. *Психическое здоровье*. 2010; 8 (2): 34–41.
 - Гринштейн Ю.И., Петрова М.М., Шабалин В.В., Руф Р.Р., Баланова Ю.А., Евстифеева С.Е., Евсюков А.А., Данилова Л.К., Топольская Н.В., Косинова А.А., Штрих А.Ю., Шульмин А.В. Распространенность артериальной гипертензии в Красноярском крае по данным эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ. *Артериальная гипертензия*. 2016; 22 (6): 551–559. DOI: 10.18705/1607-419X-2016-22-6-551-559.
 - Паниотто В.И., Харченко Н.Н. Социологические исследования как способ контроля за результатами выборов и референдумов. *Социология: методология, методы, математическое моделирование*. 2003; 17: 34–55.
 - Бохан Н.А., Лукьянова Е.В., Симуткин Г.Г. Депрессивные расстройства у женщин в климактерическом возрасте (обзор зарубежной литературы за 2012–2016 гг.). *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (2): 100–113. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-2-100-113.
 - Jacka F.N., Mykletun A., Berk M. et al. The association between habitual diet quality and the common mental disorders in community-dwelling adults: The Hordaland Health Study. *Journal Psychosomatic Medicine*. 2011; 73 (6): 483–490. DOI: 10.1097/PSY.0b013e318222831a.
 - Гафаров В.В., Гагулин И.В., Громова Е.А., Панов Д.О., Гафарова А.В. Депрессия, тревога и нарушения сна у населения 45-69 лет в России (Сибирь): эпидемиологическое исследование. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2017; 9 (4): 31–37. DOI: 10.14412/2074-2711-2017-4-31-37.

Сведения об авторах

Песковец Роман Дмитриевич, аспирант, кафедра поликлинической терапии, семейной медицины и ЗОЖ с курсом ПО, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-7192-5700.

Штарик Светлана Юрьевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра поликлинической терапии, семейной медицины и ЗОЖ с курсом ПО, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0003-3245-1132.

Евсюков Александр Александрович, канд. мед. наук, доцент, кафедра поликлинической терапии, семейной медицины и ЗОЖ с курсом ПО, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) **Песковец Роман Дмитриевич**, e-mail: roman_peskovets@inbox.ru.

Поступила в редакцию 02.04.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Выращивание и характеристика тканеинженерной конструкции из гладкомышечных клеток коронарной артерии сердца человека

Сульгин А.А.¹, Сидорова Т.Н.², Сидоров В.Ю.³

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

² Vanderbilt University Medical Center
1211, Medical Center Dr., Nashville, 37232, USA

³ Vanderbilt University
1221, Stevenson Center Ln., Nashville, 37240, USA

РЕЗЮМЕ

Цель. Оптимизировать биоинженерную платформу I-Wire для выращивания тканеинженерных конструкций (ТК) из гладкомышечных клеток (ГМК) артериальных сосудов и охарактеризовать механоэластические свойства полученных ТК.

Материалы и методы. Клеточную смесь на основе фибрина засеивали в канал матрицы из полидиметил-оксана с вставками из титановой проволоки на противоположных концах канала для горизонтальной поддержки конструкции. Размеры канала: глубина 3 мм, ширина 2 мм и длина 12 мм. Для измерения деформации ТК использовали гибкий зонд диаметром 365 мкм и длиной 42 мм. Отклонение кончика зонда при различной силе растяжения, приложенной к ТК, регистрировали с помощью системы оптической регистрации на основе инвертированного микроскопа. Модуль упругости вычисляли на основе диаграмм растяжения ТК. Были оценены механоэластические свойства конструкций в контроле и под действием изопроterenолола (Изо), ацетилхолина (Ацх), блебистатина (Бб) и цитохалазина Д (Цито-Д). Для структурной характеристики конструкций использовали метод иммуногистохимического окрашивания конструкций на α -актин гладких мышц, десмин и ядра клеток.

Результаты. Формирование конструкций происходило на 5–6-й день инкубации. Последующие измерения в течение 7 дней не выявили значительных изменений эластичности. Значения величины модуля упругости конструкций составили $7,4 \pm 1,5$ кПа в первый день после их формирования, $7,9 \pm 1,4$ кПа – на 3-й и $7,8 \pm 1,9$ кПа – на 7-й день культивирования. Изменения механоэластических свойств ТК в ответ на последовательное применение Бб и Цито-Д имели двухфазный характер, что демонстрирует возможность выделения активного и пассивного элементов эластичности гладкомышечных конструкций. Добавление 1 мкМ Изо приводило к увеличению значения величины модуля упругости с $7,9 \pm 1,5$ кПа до $10,2 \pm 2,1$ кПа ($p < 0,05$, $n = 6$). Добавление Ацх не вызывало значимого изменения эластичности.

Заключение. Представленная система позволяет количественно оценивать механоэластические свойства ТК в ответ на фармакологическое воздействие и может быть полезна в моделировании патологических изменений в ГМК сосудов.

Ключевые слова: тканевая инженерия, васкулярные гладкомышечные клетки, гладкомышечная тканеинженерная конструкция.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Национального института здравоохранения (NIH, USA), Национального центра содействия трансляционным наукам (NCATS, USA), Национального института неврологических расстройств и инсульта (NINDS, USA) и Национального института здоровья детей и развития человека им. Юнис Кеннеди Шрайвер (NICHD), грант № 1UG3TR002097-01,

✉ Сидоров Вениамин Юрьевич, e-mail: v.sidorov@vanderbilt.edu.

а также Фонда Зимина (Zimin Foundation). Содержание работы является исключительной ответственностью авторов и не обязательно отражает официальные взгляды национальных институтов здравоохранения.

Для цитирования: Сулгин А.А., Сидорова Т.Н., Сидоров В.Ю. Выращивание и характеристика тканеинженерной конструкции из гладкомышечных клеток коронарной артерии сердца человека. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 85–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-85-95>.

Growth and characterization of a tissue-engineered construct from human coronary artery smooth muscle cells

Sulgin A.A.¹, Sidorova T.N.², Sidorov V.Y.³

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

² Vanderbilt University Medical Center
1211, Medical Center Dr., Nashville, 37232, USA

³ Vanderbilt University
1221, Stevenson Center Ln., Nashville, 37240, USA

ABSTRACT

Aim. To optimize a bioengineered I-Wire platform to grow tissue-engineered constructs (TCs) derived from coronary artery smooth muscle cells and characterize the mechano-elastic properties of the grown TCs.

Materials and methods. A fibrinogen-based cell mixture was pipetted in a casting mold having two parallel titanium anchoring wires inserted in the grooves on opposite ends of the mold to support the TC. The casting mold was 3 mm in depth, 2 mm in width and 12 mm in length. To measure TC deformation, a flexible probe with a diameter of 365 μm and a length of 42 mm was utilized. The deflection of the probe tip at various tensile forces applied to the TC was recorded using an inverted microscope optical recording system. The elasticity modulus was calculated based on a stretch-stress diagram reconstructed for each TC. The mechano-elastic properties of control TCs and TCs under the influence of isoproterenol (Iso), acetylcholine (ACh), blebbistatin (Bb), and cytochalasin D (Cyto-D) were evaluated. Immunohistochemical staining of smooth muscle α -actin, desmin and the cell nucleus was implemented for the structural characterization of the TCs.

Results. The TCs formed on day 5–6 of incubation. Subsequent measurements during the following 7 days did not reveal significant changes in elasticity. Values of the elastic modulus were 7.4 ± 1.5 kPa on the first day, 7.9 ± 1.4 kPa on the third day, and 7.8 ± 1.9 kPa on the seventh day of culturing after TC formation. Changes in the mechano-elastic properties of the TCs in response to the subsequent application of Bb and Cyto-D had a two-phase pattern, indicating a possibility of determining active and passive elements of the TC elasticity. The application of 1 μM of Iso led to an increase in the value of the elastic modulus from 7.9 ± 1.5 kPa to 10.2 ± 2.1 kPa ($p < 0.05$, $n = 6$). ACh did not cause a significant change in elasticity.

Conclusion. The system allows quantification of the mechano-elastic properties of TCs in response to pharmacological stimuli and can be useful to model pathological changes in vascular smooth muscle cells.

Key words: tissue engineering, vascular smooth muscle cells, smooth muscle tissue construct.

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

Source of financing. This study was supported by the National Institutes of Health (NIH), National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS), National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) under Award Number 1UG3TR002097-01, and the Zimin Foundation. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

For citation: Sulgin A.A., Sidorova T.N., Sidorov V.Y. Growth and characterization of a tissue-engineered construct from human coronary artery smooth muscle cells. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 2020; 19 (2): 85–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-85-95>.

ВВЕДЕНИЕ

Васкулярные гладкомышечные клетки (ГМК) являются основным типом клеток сосудистой системы, которые определяют тонус сосудов, а также периферическое и артериальное давление. Особенность ГМК – их неполная дифференциация и, как следствие, высокая пластичность, связанная с изменениями между сократительным и секреторным фенотипами в ответ на биохимическую либо механическую стимуляцию [1]. Показано, что изменение фенотипа ГМК задействовано в таких патологиях, как атеросклероз, аневризм аорты и артериальная гипертензия [2–4].

В настоящее время в большинстве экспериментальных работ по изучению механизмов сосудистых заболеваний *in vitro* традиционно используют двухмерные культуры ГМК. Подобные экспериментальные модели представляют не физиологичное окружение, что делает невозможным поддержание исходного фенотипа клеток и усложняет интерпретацию данных. Современное развитие методов тканевой инженерии позволяет достаточно хорошо воспроизводить основные физиологические свойства различных типов тканей [5–7]. Преимуществами трехмерных тканеинженерных конструкций (ТК) являются: соответствующее механическое окружение, обеспечение стабильности ответа на внешнюю стимуляцию в течение длительного временного промежутка, относительная легкость проведения генетических манипуляций и уникальный потенциал для изучения биофизических характеристик ткани *in vitro* [8].

Таким образом, создание адекватной модели *in vitro*, как для изучения механизмов сосудистых заболеваний, так и для тестирования лекарственных препаратов, является актуальной задачей. Целью данной работы было оптимизировать недавно разработанную на базе Университета Вандербильта биоинженерную платформу I-Wire [9, 10] для выращивания ТК с использованием артериальных ГМК и охарактеризовать механоэластические свойства полученных конструкций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление матрицы из полидиметилсилоксана и клеточной смеси. В работе была использована ПДМС-матрица с горизонтальной поддержкой ТК (титановая проволока диаметром 0,25 мм и длиной 12 мм, Sigma-Aldrich, США). В процессе приготовления матрицы сначала был сделан шаблон с шестью полостями из монолитного акрилового пластика при помощи сверла диаметром 0,79 мм и фрезерного станка с числовым программным управлением

(MicroProtoSystems, США). В каждую полость были вставлены две тонкие кромки из того же материала для формирования каналов для поддерживающей титановой проволоки.

Площадки заливали жидким ПДМС (SYLGARD 184 kit, DowCorning, США), смешанным с отвердителем в пропорции 10:1, и дегазировали. Затем собранную конструкцию помещали в печь на 6 ч для полимеризации при 65 °С. Конечная ПДМС-матрица имела канал глубиной 3 мм, шириной 2 мм и длиной 12 мм, а также две борозды для размещения анкерной проволоки. Далее каждую ПДМС-матрицу переносили в лунку 6-луночного планшета, где приклеивали ко дну при помощи жидкого ПДМС. Каналы ПДМС-устройств были обработаны 0,2%-м раствором Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, США) для увеличения гидрофобности стенок и промыты деионизированной водой. Затем планшеты были стерилизованы ультрафиолетовым излучением в течение 30 мин.

Для выращивания ТК из коммерческих ГМК (HCASMC, ThermoFisher, США) была приготовлена клеточная смесь на основе фибрина. Показано, что продукты деградации фибрина в процессе созревания конструкции способствуют пролиферации ГМК и стимулируют формирование внеклеточного матрикса [11]. В предварительных экспериментах по оптимизации условий формирования конструкции использовали клеточную смесь фибробластов и ГМК в пропорции 1:10. В случае использования только ГМК конечная концентрация клеток и остальных компонентов среды была той же самой.

Сердечные фибробласты (NHCF-V, Lonza, США) и ГМК были собраны с культуральных флаконов T-175 (Thermo Fisher Scientific, США) при помощи TrypLE Express Enzyme (Thermo Fisher Scientific, США). Общая концентрация клеток была доведена до 10^6 , 2×10^6 либо 4×10^6 клеток/мл, после чего клетки смешали с фибриногеном (100 мкл, 20 мг/мл, Sigma-Aldrich, США), апротинином (33 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США), тромбином (10 мкл, 100 ЕД/мл, Sigma-Aldrich, США), а также добавили антибиотики пенициллин и стрептомицин (1%-й, Gibco, США). Помимо этого, в зависимости от условий добавляли Matrigel (100 мкл, BD Biosciences, США). После разведения конечная концентрация клеток была $0,5 \times 10^6$, 10^6 или 2×10^6 клеток/мл. Затем смесь была пипетирована в канал каждого ПДМС-устройства. Планшеты инкубировали при 37 °С и 5%-м CO_2 в течение 1 ч для полимеризации фибрина, после чего в каждую лунку добавили по 3 мл среды Gibco Medium 231 (Thermo Fisher Scientific, США) с апротинином (33 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США), транексамовой

кислотой (400 мкМ, Sigma-Aldrich, США), антибиотиками (1%-й, Gibco, США) и ростовой добавкой для пролиферации (Gibco Smooth Muscle Growth Supplement, SMGS; Thermo Fisher Scientific, США) либо для дифференциации клеток (Gibco Smooth Muscle Differentiation Supplement, SMDS; Thermo Fisher Scientific, США).

Среду заменяли каждый 2-й день. После формирования ТК, их механоэластические свойства были измерены с помощью системы оптической регистрации на основе инвертированного микроскопа (рис. 1). Созревшие гладкомышечные волокна имели 350–450 мкм в диаметре и 7 мм в длину (рис. 2, а).

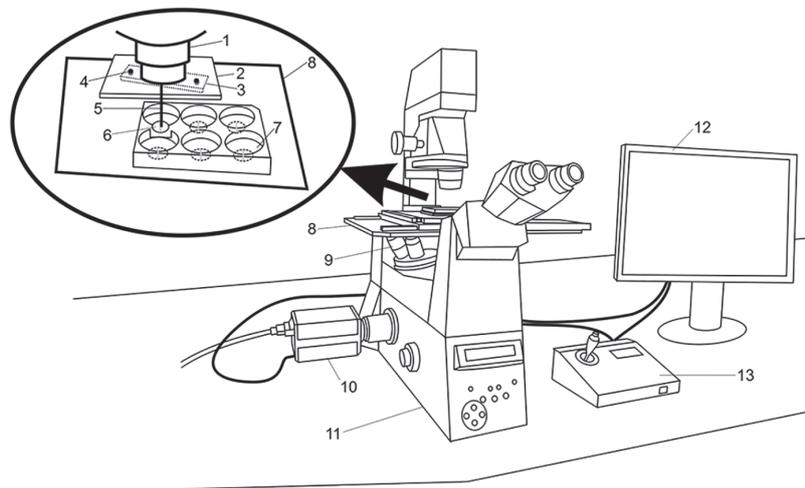


Рис. 1. Схема установки для измерения механоэластических свойств тканеинженерных конструкций: 1 – конденсор, 2 – пластина-держатель, 3 – консоль, 4 – магнит, 5 – гибкий сенсор, 6 – ПДМС-матрица с конструкцией, 7 – лунка планшета, 8 – моторизованная платформа, 9 – объектив, 10 – камера, 11 – инвертированный микроскоп, 12 – компьютер, 13 – микроконтроллер

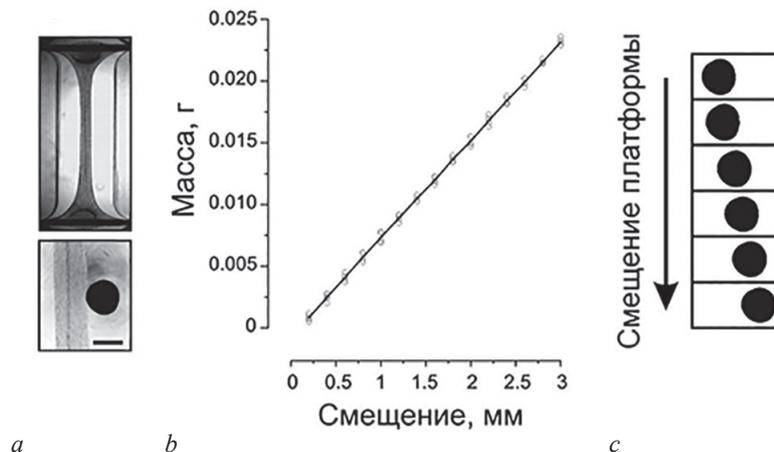


Рис. 2. Калибровочный график упругости и кадры смещения кончика гибкого сенсора: а – общий вид тканевой конструкции и центральная часть с концом гибкого сенсора, размер масштабной шкалы 300 мкм; б – график, показывающий линейную зависимость изменения массы от смещения положения консоли с гибким сенсором ($n = 5$, $r = 0,99997$); в – обработанные бинарные изображения положения сенсора при поэтапном смещении моторизованной платформы с планшетом

Устройство для измерения механоэластических свойств тканеинженерных конструкций. Для измерения модуля продольной упругости был использован гибкий зонд из полиэфирэфиркетона (Putnam Plastics, США) с наружным диаметром 365 мкм, диаметром отверстия 120 мкм и длиной 42 мм. Зонд был приклеен к консоли из органического стекла, которая в свою очередь прикрепленна к пластине-держателю с двумя

магнитами для контроля положения зонда. Консоль, пластина-держатель и гибкий зонд были смонтированы при помощи фрикционного крепления к конденсору инвертированного флуоресцентного микроскопа (Eclipse Ti, Nikon, США), оснащенного микроконтроллером (MS-2000 Flat-Top XYZ Automated Stage, ASI, США), который позволяет точно перемещать платформу по двум измерениям (см. рис. 1).

Упругость гибкого сенсора была откалибрована и имела линейную зависимость деформации от приложенной силы (рис. 2, *b*). Оптическая регистрация смещения кончика гибкого зонда осуществлялась при помощи цифровой камеры (Zyla sCMOS Camera, Andor Technology, Северная Ирландия) через равные интервалы смещения платформы с планшетом так, что каждое смещение соответствовало определенной приложенной силе, величину которой вычисляли, используя калибровочный график.

Протоколы измерений и иммуногистохимическое окрашивание. В эксперименте применяли два протокола. Первый протокол заключался в серии последовательных измерений положения конца гибкого зонда при смещении платформы на каждые 200 мкм перед внесением веществ и после инкубации с веществами в течение двух часов. Согласно второму протоколу, регистрации были проведены при постоянной приложенной силе = 0,062 мН в течение 95 мин. В течение первых 15 мин были выполнены контрольные регистрации, после чего были последовательно внесены блеббистатин (Бб) в концентрации 30 мкМ через 20 мин и цитохалазин Д (Цито-Д) в концентрации 50 мкМ через 55 мин от начала протокола. Для оценки способности клеток отвечать на β -адренергическую и холинэргическую стимуляцию ТК был инкубирован в стандартных средах, содержащих 1 мкМоль изопротеренола (Изо) (Sigma-Aldrich, США) и 5 мкМ ацетилхолина (Ацх) (Sigma-Aldrich, США) в течение 60 мин. В данных экспериментах применяли первый протокол.

Блеббистатин и Цито-Д применяли для оценки влияния фармакологических стимулов на сократительную функцию и эластичность внеклеточного матрикса ТК. Блеббистатин является обратимым ингибитором АТФ-азной активности миозина II [12], в то время как цитохалазин Д блокирует полимеризацию актина, тем самым нарушает организацию сети филаментов цитоскелета и при этом не влияет на внеклеточный матрикс [13].

Для иммуногистохимического окрашивания тканевые конструкции сначала фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида в течение 15 мин, отмывали трехкратно с помощью натрий-фосфатного буфера, затем помещали в парафиновые блоки и делали срезы толщиной 5 мкм. Доступность антигенов обеспечивали инкубацией срезов при 94 °С в 10 мМ растворе цитрата натрия (рН 6,0) в течение 10 мин. Были использованы первичные мышинные моноклональные антитела к α -актину гладкомышечных клеток (α -SMA) (Sigma-Aldrich, США), моноклональные антитела кролика к десмину (Abcam, США) и вторичные антитела против мыши (Thermo Fisher,

США) и кролика (Thermo Fisher, США), конъюгированные с Alexa (568 и 488 нм), а также краситель для окрашивания ядер DAPI (Fluoromount-G 368/451, Southern Biotech, США). Регистрацию цветных изображений делали на конфокальном микроскопе Zeiss LSM780 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ и статистическая обработка данных. Анализ изображений проводили в программной среде MATLAB (MathWorks, США). Контрастность кадра была подобрана таким образом, чтобы оставался виден только конец гибкого зонда, после чего создавалось бинарное изображение и вычислялись координаты центра окружности в каждом кадре (рис. 2, *c*). На основе полученных данных вычислялись изменение длины ТК, значение силы, действующей вдоль конструкции (F_c), и значение модуля упругости. Детальное описание вычисления модуля упругости и диаграмма геометрии конструкции содержатся в дополнительном материале ранее опубликованной работы [9]. Поэтому здесь приведем только краткое описание процедуры вычисления.

Модуль упругости рассчитывали как отношение зависимости деформации от напряжения по формуле [14]:

$$E = \frac{L_0 F_c}{A_0 \Delta L},$$

где F_c – сила, действующая вдоль ТК, L_0 – исходная длина ТК, A_0 – площадь поперечного сечения, ΔL – изменение длины ТК.

Учитывая положение ТК в пространстве, формула для вычисления модуля упругости была модифицирована следующим образом [9]:

$$E = \frac{2L_0 F_t \sqrt{(d_s - d_t)^2 + a^2}}{\pi D^2 \Delta L (d_s - d_t)},$$

где F_t – сила, прикладываемая гибким зондом, d_s – расстояние между начальным и текущим положением платформы, d_t – расстояние между начальным и текущим положением конца гибкого зонда, a – половина длины конструкции в расслабленном состоянии, D – диаметр тканеинженерной конструкции. Диаметр ТК вычислялся на основе среднего значения трех измерений – в срединной точке и двух точках на расстоянии 1 мм справа и слева от срединной точки.

Статистический анализ проводился с помощью коммерческих программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и OriginLab R2018 (OriginLab Corporation, США). Статистические сравнения между контрольной и опытной группой были сделаны

при помощи *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок, одномерного дисперсионного анализа для повторных измерений (ANOVA) в случае трех и более групп, а также с использованием непараметрического парного критерия Вилкоксона. Изменение длины в ответ на приложенную силу, измеренное в процентах от изначальной длины препарата, представлено в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Различия в полученных результатах считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. В процессе калибровки гибкого сенсора для оценки линейности его упругих свойств в зависимости от нагрузки применяли корреляционный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные результаты предварительных экспериментов по оптимизации протокола показали следующее: использование культуральной среды с добавкой SMDS не вызывало формирование тканевых фибрилл; добавление Matrigel ускоряло конденсацию геля и образование гладкомышечных тканеинженерных структур; концентрация ГМК 106 клеток/мл

является оптимальной и способствует быстрому формированию конструкций; добавление 10% фибробластов не влияло на скорость формирования конструкций.

Для структурной характеристики конструкций использовали метод флуоресцентной микроскопии. На рис. 3 представлено иммуногистохимическое окрашивание ТК на α -актин гладких мышц, десмин и ядерное ДНК с использованием DAPI, а также окраска гематоксилином и эозином. Наибольшую белковую фракцию в ГМК составляет α -актин, он также выполняет основную роль в сокращении при взаимодействии с миозином и через полимеризацию участвует в формировании цитоскелета [15]. Десмин является основным белком, составляющим промежуточный филамент сократительного аппарата, и локализован в Z-пластинке поперечно полосатой мышцы и в плотных тельцах гладкой мышечной ткани [16]. Данные иммуногистохимического окрашивания демонстрируют структурную однородность тканеинженерных волокон, равномерное и плотное распределение гладкомышечных клеток в конструкциях.

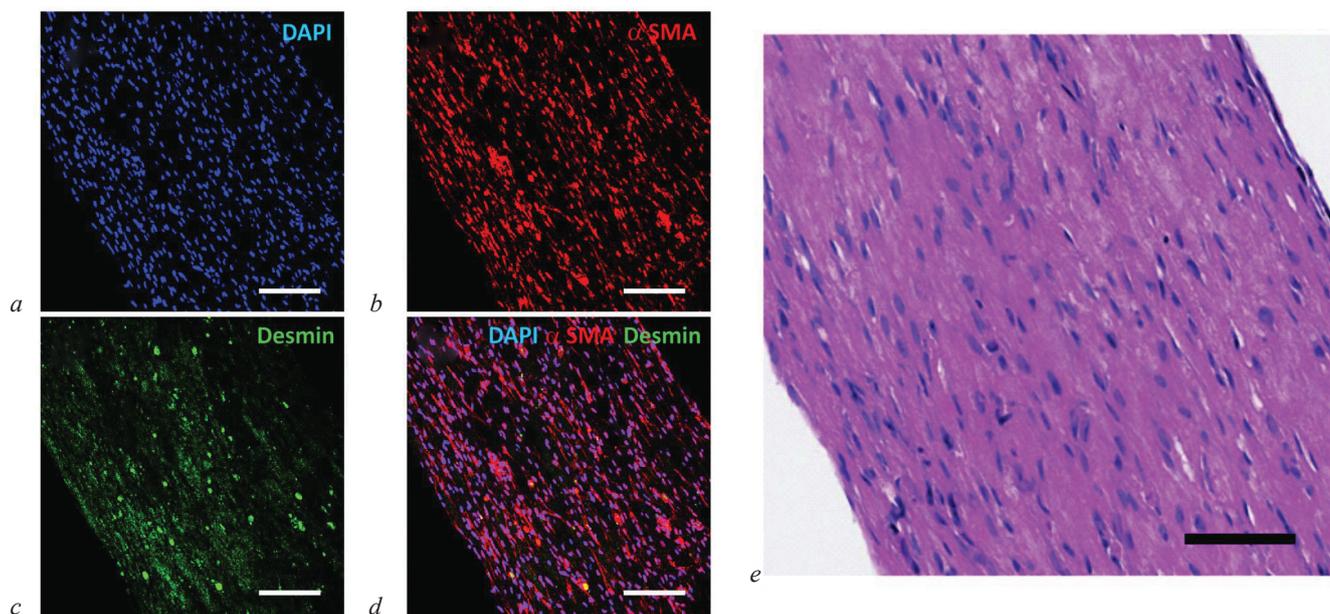


Рис. 3. Иммуногистохимический анализ продольных срезов конструкции: *a* – окраска ядерной ДНК при помощи DAPI; *b*, *c* – окрашивание на основные маркеры сократительного фенотипа α -актин (красный) и десмин (зеленый); *d* – объединенное изображение; *e* – окраска гематоксилином и эозином. Размер масштабной шкалы – 100 мкм

Для проверки стабильности механоэластических свойств ТК были выполнены контрольные измерения в течение 7 дней после формирования конструкций. Диаграмма растяжения представлены на рис. 4, *a*. Линейную часть диаграммы использовали для вычисления модуля упругости (рис. 4, *b*). Существенное удлинение ТК наблюдается при приложении попе-

речной силы растяжения (F) больше 0,07 мН. Анализ диаграмм растяжения не выявил статистически значимых изменений между измерениями в 1-, 3- и 7-й дни ($F(2,10) = 0,225$; $p = 0,8$; $n = 6$). Значение модуля упругости составило $7,4 \pm 1,5$ кПа в начале эксперимента, $7,9 \pm 1,4$ кПа на 3-й день и $7,8 \pm 1,9$ кПа – на 7-й день соответственно.

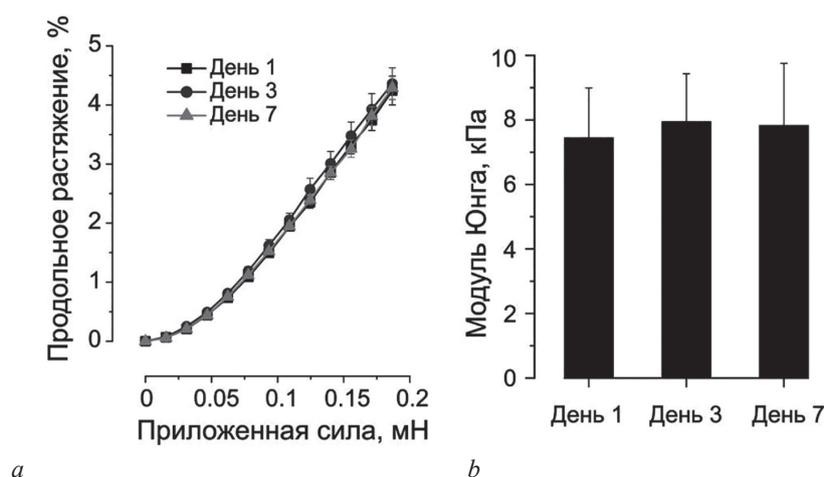


Рис. 4. Стабильность механоэластических свойств тканеинженерных конструкций: *a* – диаграмма растяжения конструкции. Повторные измерения на 1-, 4- и 7-й день; *b* – рассчитанный модуль упругости (модуль Юнга), $\bar{x} \pm SEM$, $n = 6$. Статистические отличия между тремя группами отсутствуют

В литературе данные эластичности гладкомышечных ТК варьируют в зависимости от способа выращивания – при статической либо переменной нагрузке; состава среды культивирования; геометрии конструкций – кольцевые [5, 6], фибрилообразные [7]; типа наполнителя клеточной смеси – коллаген, фибрин, а также от происхождения клеток и их количественного соотношения с наполнителем [5, 17–20]. Данные, полученные в отдельных ГМК, менее вариабельны и в основном определяются фенотипом клеток [21–23]. В частности, при измерении эластичности методом атомно-силовой микроскопии в конструкциях, выращенных с использованием гладкомышечных клеток, изолированных из грудной части аорты обезьяны (*Macaca fascicularis*) и коллагенового матрикса, были получены значения модуля упругости в пределах $13,7 \pm 2,4$ и $23,3 \pm 3,0$ кПа [24].

Наблюдаемую вариабельность авторы связывают с возрастными изменениями экспрессии актина и $\beta 1$ -субъединицы интегрина [25]. Оценка эластичности с помощью того же метода, проведенная в отдельных ГМК, полученных из грудной аорты здоровых молодых крыс линии Вистар, варьирует в пределах 5–14 кПа [21, 23]. Близкие значения модуля эластичности ($\sim 13,7$ кПа) были продемонстрированы в отдельных ГМК, изолированных из артериол скелетных мышц крысы линии Спрег-Дуули и культивированных в течение 3–7 дней после первого пассажа [22].

Изометрическое измерение эластичности, выполненное D. Seliktar и соавт. с помощью датчика силы в кольцевых трехмерных гладкомышечных конструкциях, выращенных в коллагеновом матриксе (2 мг/мл) из клеток грудной аорты крыс (10^6 клеток/мл),

после 8 дней культивирования показало значения равное 68 кПа [18]. В другой работе, где авторы сравнивали эластические свойства кольцевых конструкций, созданных на основе фибрина (2 мг/мл) и коллагена (2 мг/мл) с использованием того же типа ГМК (аорта крысы, 106 клеток/мл), было показано, что после 5 дней культивирования коллагеновые конструкции обладают значительно большей жесткостью (191 кПа) по сравнению с фибриновыми (19 кПа) [20]. Увеличение концентрации коллагена и фибрина в клеточной смеси до 4 мг/мл увеличивало жесткость до 242 и 28 кПа соответственно.

Показатели эластичности гладкомышечных ТК, полученные в нашей работе, близки к таковым в отдельных ГМК. Это объясняется использованием фибрина в клеточной смеси. Матрикс на основе фибрина широко применяется в тканевой инженерии [26]. Фибриновый гель обладает вазоактивными и высокими адгезивными свойствами, способствует быстрой адаптации и пролиферации клеток в конструкциях [11], но вследствие структурных особенностей имеет значительную эластичность [27]. Следует отметить, что поскольку ГМК обладают высокой пластичностью [28, 29], эластичность конструкций может значительно изменяться в течение культивирования [18, 19]. Это может усложнять интерпретацию данных, особенно в длительных экспериментах, как, например, с применением продолжительной механической стимуляции [18]. Использование в нашей работе ингибиторов фибринолизина (апротинин, транексамовая кислота) и ростовой добавки с низким содержанием сыворотки (SMDS) способствовало устойчивости эластических свойств ТК после их созревания (см. рис. 4).

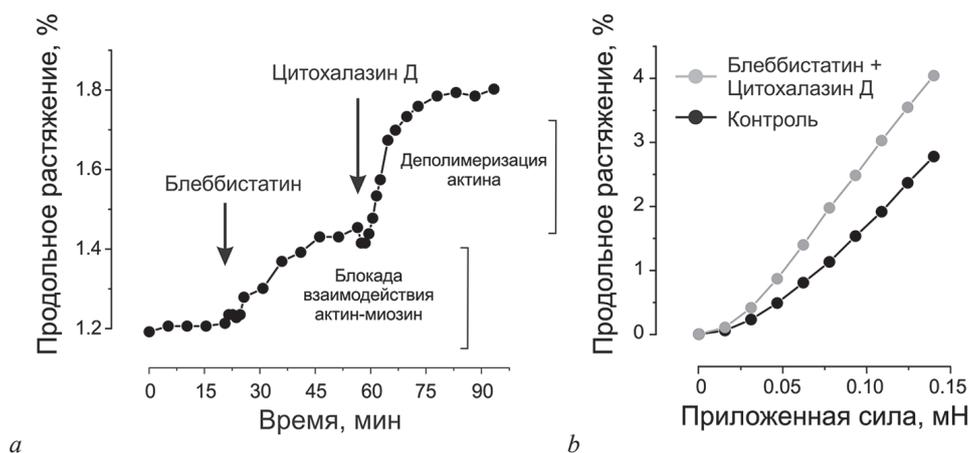


Рис. 5. Влияние блеббистатина и цитохалазина Д на механоэластические свойства тканеинженерных конструкций: *a* – кривая динамики изменения растяжения конструкции в ответ на последовательное применение 30 мкМ блеббистатина и 50 мкМ цитохалазина Д при постоянной приложенной силе 0,062 мН; *b* – диаграмма растяжения конструкции в контроле и после инкубации с блеббистатином и цитохалазином Д

На рис. 5 показаны результаты отдельного эксперимента по тестированию механоэластических свойств ТК под воздействием Бб и Цито-Д. Видно, что добавление 30 мкМоль Бб вызывает увеличение растяжения ТК с 1,2 до 1,45% (рис. 5, *a*). Последующая обработка Цито-Д в концентрации 50 мкМоль способствует дальнейшей релаксации ТК и увеличению растяжения до 1,8%. Это соотносится с изменениями эластичности, соответствующими приложенной силе 0,062 мН на диаграмме растяжения конструкции, представленной на рис. 5, *b*. Известно, что Бб является селективным ингибитором АТФ-азной активности различных изоформ миозина II в поперечнополосатых [12] и ГМК [30], тогда как Цито-Д изменяет механические свойства путем деполимеризации актиновых филаментов цитоскелета клеток [13]. Соответственно, добавление Бб ингибирует связанное с миозином сокращение, а последующая инкубация с Цито-Д разрушает актиновое тоническое сокращение и увеличивает релаксацию ТК.

Адренергическая и холинергическая стимуляции являются одними из наиболее важных систем, задействованных в регуляции сердечно-сосудистого тонуса. С одной стороны, известно, что β -адренергическая стимуляция через активацию аденилатциклазы и увеличение цАМФ влияет на уровень внутриклеточного Ca^{2+} [31, 32]. Релаксацию обуславливают следующие предложенные механизмы: гиперполяризация через Ca^{2+} активируемые калиевые каналы, уменьшение чувствительности сократительных элементов к Ca^{2+} вследствие фосфорилирования киназы легких цепей миозина, уменьшение содержания цитозольного Ca^{2+} через регуляцию Ca^{2+} -транспортирующих систем саркоплазматического ретикулума и плазмалеммы и

др. [33, 34]. С другой стороны, васкулярные ГМК находятся в близком структурном и функциональном взаимодействии с клетками эндотелия, который может регулировать тонус сосудов через паракринное взаимодействие либо через межклеточные каналы, соединяющие два типа клеток [35]. Поэтому возможна опосредованная адренергическая регуляция сократимости ГМК с участием эндотелиальных клеток [35–37].

В наших экспериментах инкубация ТК с Изо в концентрации 1 мкМ вызывала небольшое, но значимое уменьшение эластичности при увеличении приложенной силы растяжения свыше 0,05 мН ($p < 0,05$, $n = 6$), а также значимое увеличение модуля упругости ($p < 0,05$, $n = 6$) с $7,9 \pm 1,5$ кПа до $10,2 \pm 2,1$ кПа (рис. 6). В ранних работах по изучению влияния β -адренергической стимуляции на тонус сосудов и на сократимость ГМК, эксперименты в основном проводились *in vivo* либо *in vitro* на изолированных препаратах сосудов животных, где типичным является релаксирующий эффект [32, 33, 35]. На изолированных ГМК был продемонстрирован двойной механизм регуляции кальциевых каналов, когда при наноконцентрациях Изо увеличивал ток кальциевых каналов L-типа, в то время как при микроконцентрациях его действие было обратным [38]. Поскольку для выращивания конструкций нами использовались только ГМК, зависимость механизма ответа от концентрации Изо может лежать в основе наблюдаемого эффекта уменьшения эластичности.

Действие Ацх на васкулярные ГМК осуществляется через M_3 -мускариновые рецепторы [39]. Согласно концепции участия эндотелиальных клеток в гуморальной регуляции тонуса сосудов, первичную

роль в ответ на холинергическую стимуляцию выполняют эндотелиальные клетки, а примыкающие к ним ГМК являются пассивными реципиентами монооксида азота [40], хотя из ранних работ известно, что в случае прямого воздействия на ГМК, Ацх,

связываясь с M_3 -рецептором, активирует фосфолипазу С и через инозитолтрифосфатный путь может индуцировать сократительный эффект [41]. В наших экспериментах применение Ацх вызывало незначительное уменьшение эластичности ТК (рис. 6, b).

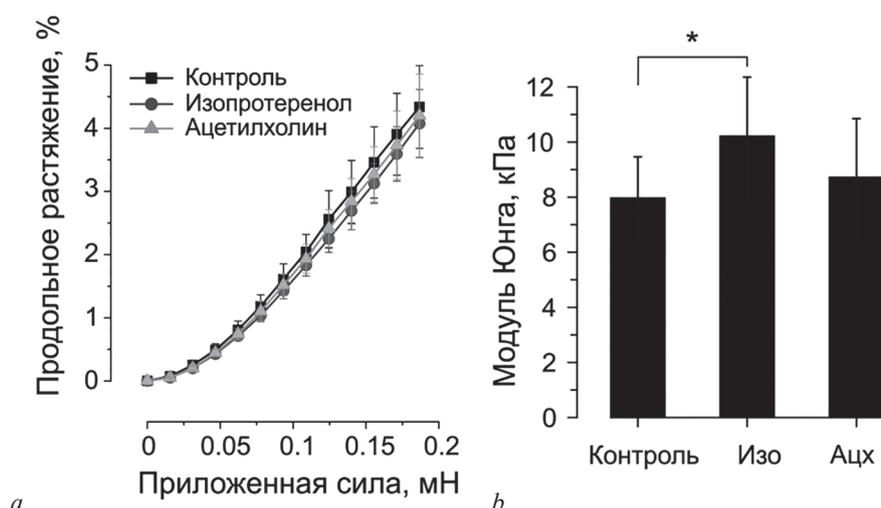


Рис. 6. Изменение упругости тканеинженерных конструкций в ответ на адренергическую и холинергическую стимуляцию: *a* – диаграмма растяжения конструкции в контроле и под действием изопротеренола и ацетилхолина; *b* – изменение модуля упругости (модуля Юнга) под действием изопротеренола и ацетилхолина, $\bar{x} \pm SEM$, $n = 6$

Незначительный эффект, скорее всего, обусловлен гомогенной клеточной популяцией, т.е. отсутствием эндотелиальных клеток в клеточной смеси при выращивании конструкций. Последующие эксперименты с добавлением фракции эндотелиальных клеток позволят оценить роль взаимодействия различных типов клеток как в холинергической, так и в адренергической регуляции сократимости гладкомышечных ТК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые была использована экспериментальная платформа I-Wire для выращивания и характеристики гладкомышечных ТК, полученных с использованием ГМК из коронарной артерии человека. Мы показали, что концентрация 10^6 клеток/мл является оптимальной для формирования тканевых фибрилл с однородным и плотным распределением клеток, при этом добавление в клеточную смесь Matrigel способствует более быстрому формированию конструкции. Совместное применение Бб и Цито-Д дает возможность вычленения и оценки активных и пассивных элементов эластичности ТК. Добавление Изо вызывало увеличение жесткости конструкций, тогда как инкубация с Ацх не оказывала значительного влияния на эластичность ТК. Поскольку клетки эндотелия играют важную роль в регуляции гладкомышечного тонуса сосудов, то для воспроизведения

более полной системы регуляции гладкомышечных ТК дальнейшие эксперименты должны включать выращивание конструкций при совместном культивировании ГМК и эндотелиальных клеток, а также использование эластина и коллагена для формирования более жесткого внеклеточного матрикса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iyemere V.P., Proudfoot D., Weissberg P.L., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Intern. Med.* 2006; 260 (3): 192–210. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01692.x.
2. Bennett M.R., Sinha S., Owens G.K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118 (4): 692–702. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.
3. Ailawadi G., Moehle C.W., Pei H., Walton S.P., Yang Z., Kron I.L., Lau C.L., Owens G.K. Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009; 138 (6): 1392–1399. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.07.075.
4. Touyz R.M., Alves-Lopes R., Rios F.J., Camargo L.L., Anagnostopoulou A., Arner A., Montezano A.C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc. Res.* 2018; 114 (4): 529–539. DOI: 10.1093/cvr/cvy023.
5. Gwyther T.A., Hu J.Z., Billiar K.L., Rolle M.W. Directed cellular self-assembly to fabricate cell-derived tissue rings for biomechanical analysis and tissue engineering. *J. Vis. Exp.* 2011; 57: e3366. DOI: 10.3791/3366.

6. Dash B.C., Levi K., Schwan J., Luo J., Bartulos O., Wu H., Qiu C., Yi T., Ren Y., Campbell S., Rolle M.W., Qyang Y. Tissue-engineered vascular rings from human iPSC-derived smooth muscle cells. *Stem Cell Reports*. 2016; 7 (1): 19–28. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.05.004.
7. West A.R., Zaman N., Cole D.J., Walker M.J., Legant W.R., Boudou T., Chen C.S., Favreau J.T., Gaudette G.R., Cowley E.A., Maksym G.N. Development and characterization of a 3D multicell microtissue culture model of airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2013; 304 (1): L4–16. DOI: 10.1152/ajplung.00168.2012.
8. Vunjak Novakovic G., Eschenhagen T., Mummery C. Myocardial tissue engineering: *in vitro* models. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4 (3): pii: a014076. DOI: 10.1101/cshperspect.a014076.
9. Sidorov V.Y., Samson P.C., Sidorova T.N., Davidson J.M., Lim C.C., Wiksw J.P. I-Wire Heart-on-a-Chip I: Three-dimensional cardiac tissue constructs for physiology and pharmacology. *Acta Biomater.* 2017; 48: 68–78. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.009.
10. Schroer A.K., Shotwell M.S., Sidorov V.Y., Wiksw J.P., Merryman W.D. I-Wire Heart-on-a-Chip II: Biomechanical analysis of contractile, three-dimensional cardiomyocyte tissue constructs. *Acta Biomater.* 2017; 48: 79–87. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.010.
11. Ahmann K.A., Weinbaum J.S., Johnson S.L., Tranquillo R.T. Fibrin degradation enhances vascular smooth muscle cell proliferation and matrix deposition in fibrin-based tissue constructs fabricated *in vitro*. *Tissue Eng. Part A*. 2010; 16 (10): 3261–3270. DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0708.
12. Kovacs M., Toth J., Hetenyi C., Malnasi-Csizmadia A., Sellers J.R. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (34): 35557–35563. DOI: 10.1074/jbc.M405319200.
13. Wakatsuki T., Schwab B., Thompson N.C., Elson E.L. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J. Cell Sci.* 2001; 114 (Pt 5): 1025–1036. PMID: 11181185.
14. Warren M.L. Forces. In: Taylor E.F. (edit.) *Introductory Physics*. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1979: 82–83.
15. Gunst S.J., Zhang W. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008; 295 (3): C576–587. DOI: 10.1152/ajpcell.00253.2008.
16. Paulin D., Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp. Cell Res.* 2004; 301 (1): 1–7. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.08.004.
17. Hirai J., Kanda K., Oka T., Matsuda T. Highly oriented, tubular hybrid vascular tissue for a low pressure circulatory system. *Asaio J.* 1994; 40 (3): M383–388. PMID: 8555543 DOI: 10.1097/00002480-199407000-00027.
18. Seliktar D., Black R.A., Vito R.P., Nerem R.M. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling *in vitro*. *Ann. Biomed. Eng.* 2000; 28 (4): 351–362. PMID: 10870892. DOI: 10.1114/1.275.
19. Rowe S.L., Stegemann J.P. Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios. *Biomacromolecules*. 2006; 7 (11): 2942–2948. DOI: 10.1021/bm0602233.
20. Cummings C.L., Gawlitta D., Nerem R.M., Stegemann J.P. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials*. 2004; 25 (17): 3699–3706. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.073.
21. Sehgel N.L., Sun Z., Hong Z., Hunter W.C., Hill M.A., Vatner D.E., Vatner S.F., Meininger G.A. Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging. *Hypertension*. 2015; 65 (2): 370–377. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04456.
22. Hong Z., Reeves K.J., Sun Z., Li Z., Brown N.J., Meininger G.A. Vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion to collagen I modified by vasoactive agonists. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0119533. DOI: 10.1371/journal.pone.0119533.
23. Zhou N., Lee J.J., Stoll S., Ma B., Costa K.D., Qiu H. Rho kinase regulates aortic vascular smooth muscle cell stiffness via actin/SRF/myocardin in hypertension. *Cell Physiol. Biochem*. 2017; 44 (2): 701–715. DOI: 10.1159/000485284.
24. Qiu H., Zhu Y., Sun Z., Trzeciakowski J.P., Gansner M., Depre C., Resuello R.R., Natividad F.F., Hunter W.C., Genin G.M., Elson E.L., Vatner W.E., Meininger G.A., Vatner S.F. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circ. Res.* 2010; 107 (5): 615–619. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.221846.
25. Zhu Y., Qiu H., Trzeciakowski J.P., Sun Z., Li Z., Hong Z., Hill M.A., Hunter W.C., Vatner D.E., Vatner S.F., Meininger G.A. Temporal analysis of vascular smooth muscle cell elasticity and adhesion reveals oscillation waveforms that differ with aging. *Aging Cell*. 2012; 11 (5): 741–750. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2012.00840.x.
26. Shaikh F.M., Callanan A., Kavanagh E.G., Burke P.E., Grace P.A., McGloughlin T.M. Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008; 188 (4): 333–346. DOI: 10.1159/000139772.
27. Litvinov R.I., Weisel J.W. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol.* 2017; 60–61: 110–123. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.08.003.
28. Rensen S.S., Doevendans P.A., van Eys G.J. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth. Heart J.* 2007; 15 (3): 100–108. DOI: 10.1007/bf03085963.
29. Tuna B.G., Bakker E.N., VanBavel E. Smooth muscle biomechanics and plasticity: relevance for vascular calibre and remodelling. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012; 110 (1): 35–41. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00794.x.
30. Eddinger T.J., Meer D.P., Miner A.S., Meehl J., Rovner A.S., Ratz P.H. Potent inhibition of arterial smooth muscle tonic contractions by the selective myosin II inhibitor, blebbistatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 320 (2): 865–870. DOI: 10.1124/jpet.106.109363.
31. Tanaka Y., Horinouchi T., Koike K. New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; 32 (7): 503–514. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2005.04222.x.

32. Eckly A.E., Stoclet J.C., Lugnier C. Isoprenaline induces endothelium-independent relaxation and accumulation of cyclic nucleotides in the rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 271 (1): 237–240. DOI: 10.1016/0014-2999(94)90287-9.
33. Scheid C.R., Honeyman T.W., Fay F.S. Mechanism of beta-adrenergic relaxation of smooth muscle. *Nature.* 1979; 277 (5691): 32–36. DOI: 10.1038/277032a0.
34. Mueller E., van Breemen C. Role of intracellular Ca²⁺ sequestration in beta-adrenergic relaxation of a smooth muscle. *Nature.* 1979; 281 (5733): 682–683. DOI: 10.1038/281682a0.
35. Gray D.W., Marshall I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 107 (3): 684–690. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14507.x.
36. Graves J., Poston L. Beta-adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 108 (3): 631–637. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb12853.x.
37. Chalon S., Tejura B., Moreno H.Jr., Urae A., Blaschke T.F., Hoffman B.B. Role of nitric oxide in isoprenaline and sodium nitroprusside-induced relaxation in human hand veins. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1999; 47 (1): 91–98. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1999.00863.x.
38. Xiong Z., Sperelakis N., Fenoglio-Preiser C. Isoproterenol modulates the calcium channels through two different mechanisms in smooth-muscle cells from rabbit portal vein. *Pflugers Arch.* 1994; 428 (2): 105–113. DOI: 10.1007/bf00374847.
39. Walch L., Brink C., Norel X. The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. *Therapie.* 2001; 56 (3): 223–226. PMID: 11475798.
40. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288 (5789): 373–376. DOI: 10.1038/288373a0.
41. Itoh T., Fujiwara T., Kubota Y., Nishiye E., Kuriyama H. Roles of protein kinase C on the mechanical activity of vascular smooth muscles. *Am. J. Hypertens.* 1990; 3 (8 Pt 2): 216s–219s. DOI: 10.1093/ajh/3.8.216.

Сведения об авторах

Сульгин Александр Андреевич, студент, медико-биологический факультет, СибГМУ, г. Томск.

Сидорова Татьяна Николаевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, отделение аллергии, легочной и интенсивной терапии, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA.

Сидоров Вениамин Юрьевич, канд. биол. наук, профессор, факультет биомедицинской инженерии, Vanderbilt University, Nashville, USA.

(✉) Сидоров Вениамин Юрьевич, e-mail: v.sidorov@vanderbilt.edu.

Поступила в редакцию 13.09.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Состояние антиоксидантной системы в митохондриях клеток кожи при росте экспериментальной меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли

Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Трепитаки Л.К., Немашкалова Л.А., Каплиева И.В., Лесовая Н.С.

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63/8

РЕЗЮМЕ

Цель – изучить состояние антиоксидантной системы в митохондриях клеток кожи при росте меланомы B16/F10 у мышей на фоне хронической нейрогенной боли.

Материалы и методы. Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6 ($n = 28$). Экспериментальные группы: интактная, контрольная – воспроизведение модели хронической нейрогенной боли, группа сравнения – стандартная подкожная перевивка меланомы B16/F10, основная группа – перевивка меланомы B16/F10 через 3 нед после создания модели хронической нейрогенной боли. Животных на 14-е сут роста меланомы B16/F10 декапитировали, иссекали кожу, выделяли митохондрии. Тест-системой для иммуноферментного анализа определяли уровень восстановленного глутатиона (GSH), окисленного глутатиона (GSSG) (Bio Source, США); глутатионпероксидазы-4 (ГПО-4) (Clod-Clon Corporation, CNDR); глутатионредуктазы (ГР) (Cusabio, CNDR); глутатион-S-трансферазы (ГТ) (Ivundiagnostik, Германия); глутатионпероксидазы-1 (ГПО-1), супероксиддисмутазы-2 (СОД-2) (Ab Frontier, Южная Корея).

Результаты. В митохондриях клеток кожи в контрольной группе установлено повышение содержания GSH в 1,3 раза; ГПО-1 – 2,9; ГПО-4 – 1,9; ГР – 2,8; СОД-2 в 2,4 раза относительно значений у интактных животных. В группе сравнения обнаружили принципиально противоположные изменения: снижение содержания ГПО-1 в 1,9 раза; ГПО-4 – 3,7; ГР – 3,9; СОД-2 в 3,8 раза и повышение уровня GSSG в 1,36 раза по сравнению со значениями у интактных животных. При росте меланомы на фоне хронической нейрогенной боли отмечено увеличение уровня GSH в 1,5 раза; ГПО-1 – 3,6; ГТ – 1,28; ГПО-4 – 1,6 и СОД-2 в 1,8 раза по сравнению со значениями в интактной группе животных.

Заключение. При росте меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли происходит перестройка антиоксидантной системы митохондрий клеток кожи в сторону реализации «восстановительного стресса» под воздействием хронической боли, что может оказывать влияние на рост и развитие экспериментальной меланомы.

Ключевые слова: экспериментальная меланома B16/F10, хроническая нейрогенная боль, кожа, антиоксидантная система, митохондрии.

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. Исследование одобрено биоэтическим комитетом по работе с животными Ростовского научно-исследовательского онкологического института (протокол № 4 от 10.08.2018).

Для цитирования: Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Трепитаки Л.К., Немашкалова Л.А., Каплиева И.В., Лесовая Н.С. Состояние антиоксидантной системы в митохондриях клеток кожи при росте экспериментальной меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 96–103. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-96-103>.

State of the antioxidant system in mitochondria of skin cells during experimental B16/F10 melanoma growth with chronic neurogenic pain

Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Trepitaki L.K., Nemashkalova L.A., Kaplieva I.V., Lesovaya N.S.

Rostov Research Institute of Oncology
8, 63, 14th liniya, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the state of the antioxidant system in mitochondria of skin cells during B16/F10 melanoma growth in mice with chronic neurogenic pain.

Materials and methods. The study included female C57BL/6 mice ($n = 28$). Experimental groups included an intact group, a control group – chronic neurogenic pain model, a comparison group – standard subcutaneous transplantation of B16/F10 melanoma, and a main group – transplantation of B16/F10 melanoma 3 weeks after creation of a model of chronic neurogenic pain. Animals were decapitated on day 14 of the B16/F10 melanoma growth, the skin was excised and mitochondria were isolated. Standard ELISA test systems were used to determine the levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) (Bio Source, USA); glutathione peroxidase-4 (GPx 4) (Clod-Clon Corporation, CNDR); glutathione reductase (GR) (Cusabio, CNDR); glutathione S-transferase (G-S-T) (Ivvundiagnostik, Germany); glutathione peroxidase-1 (GPx 1), and superoxide dismutase-2 (SOD-2) (Ab Frontier, South Korea).

Results. Mitochondria of skin cells in controls showed an increase in the levels of GSH by 1.3 times, GPx 1 – by 2.9 times, GPx 4 – by 1.9 times, GR – by 2.8 times, and SOD-2 – by 2.4 times, compared to intact animals. Changes in the comparison group were opposite: GPx 1 decreased by 1.9 times, GPx 4 – by 3.7 times, GR – by 3.9 times, SOD-2 – by 3.8 times, and GSSG rose by 1.36 times compared to intact animals. The growth of melanoma with chronic neurogenic pain caused an increase in the levels of GSH by 1.5 times, GPx 1 – by 3.6 times, G-S-T – by 1.28 times, GPx 4 – by 1.6 times, and SOD-2 – by 1.8 times, compared to intact animals.

Conclusions. The growth of B16/F10 melanoma together with chronic neurogenic pain restructures the antioxidant system of skin mitochondria towards generation of reductive stress under the influence of chronic pain, which can affect the growth and development of experimental melanoma.

Key words: experimental B16/F10 melanoma, chronic neurogenic pain, skin, antioxidant system, mitochondria.

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

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

Conformity with the principles of ethics. The animal studies were conducted in compliance with humanity principles set forth in the Directive of the European Union (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki. The study was approved at the session of the Bioethics Committee for Working with Animals of Rostov Research Institute of Oncology (Protocol No. 4 dated 10/08/2018). All participants of the study signed an informed consent to participate in the research.

For citation: Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Trepitaki L.K., Nemashkalova L.A., Kaplieva I.V., Lesovaya N.S. State of antioxidant system in mitochondria of skin cells during experimental B16/F10 melanoma growth with chronic neurogenic pain. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 96–103. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-96-103>.

ВВЕДЕНИЕ

Меланома кожи характеризуется крайне высокой степенью злокачественности и необычайно большим потенциалом метастазирования, которое происходит лимфогенным, гематогенным и лимфогематогенными

путиами. Традиционно меланома кожи считается опухолью с вариабельным, часто непредсказуемым, клиническим течением, в том числе как с наличием случаев спонтанной регрессии первичного опухолевого очага, так и ранней генерализацией опухолево-

го процесса при наличии благоприятных прогностических признаков [1]. В последние годы достигнуты определенные успехи в понимании этиологии данного заболевания, которая связана с анатомической локализацией, степенью воздействия ультрафиолетового излучения, генетическими особенностями и потенциально другими факторами [1, 2].

Любой патологический процесс на момент очевидной значимости проходит начальную перестройку на сверхтонком уровне. Грань перехода от нормы к патологии требует досконального изучения на атомно-молекулярном и субклеточном уровне [3]. Способность адаптировать клеточные биоэнергетические возможности под влиянием быстро меняющихся условий окружающей среды является обязательной как при нормальной клеточной функции, так и при развитии опухолей [4]. Высокочувствительными индикаторами возникновения в организме патологических процессов являются митохондрии. Они, являясь центральной метаболической органеллой, выполняют «критические» биохимические функции в синтезе основных клеточных компонентов, включая жирные кислоты, аминокислоты и нуклеотиды. Клетки многих опухолей, содержащие полностью функциональные митохондрии, для поддержания пролиферации и выживания увеличивают скорость гликолиза, обеспечивая повышенный поток субстрата для биосинтетических путей, частично осуществляемых в митохондриях (метаболизм глюкозы и липогенез, метаболизм аминокислот и биосинтез нуклеотидов). В результате активации метаболического потока через митохондриальные пути повышается связанное с этим производство активных форм кислорода (АФК) в опухолевых клетках, что влечет за собой активацию путей антиоксидантного ответа клеток [4].

Органом-мишенью для меланомы часто служит кожа, являющаяся уникальным и самым большим органом (тканью) тела, концентрирующим в себе множество физиологических функций. Кожа является ключевым интерфейсом между эндокринной, нервной и иммунной системами, представляющим собой самостоятельный орган. Кожа – это целостная, сложно устроенная тканевая система, включающая в себя несколько слоев, которые находятся в тесной связи между собой. В коже сконцентрированы кровеносные, лимфатические и нервные пути, которые позволяют быстро реагировать на болевые, механические, химические, термические и другие раздражения, отвечая сужением или расширением просвета с последующим изменением кровотока.

На тонус (ширину просвета кровеносных сосудов, скорость кровотока) кровеносной сети кожи влияет

кора головного мозга через многочисленные сосудосуживающие и сосудорасширяющие нервные окончания, благодаря которым реализуется возможность организма чувствовать тепло, холод, давление, осязание, а также боль [5]. Боль часто является сопровождающим компонентом опухолевого процесса и присутствует у 30–50% онкологических больных после проведения противоопухолевой терапии, у 65–90% пациентов в связи с прогрессированием заболевания [6]. Происхождение боли у онкологических больных, как правило, многофакторное: прямые и косвенные эффекты роста опухоли, побочное действие противоопухолевой терапии, сопутствующие заболевания [6]. Экспериментальная онкология движется в сторону понимания биологических и физиологических процессов, происходящих в организме в случае сопутствующей хронической боли при опухолевой болезни. Показано, что хроническая нейрогенная боль является стимулятором и модификатором роста злокачественной меланомы кожи в эксперименте [7].

В связи с вышесказанным весьма актуальным представляется изучение антиоксидантных процессов в митохондриях клеток кожи при патологических процессах, сопровождаемых болевым синдромом. Бесспорно, изучение патофизиологических процессов возможно через применение экспериментальных моделей. Неоспорим тот факт, что развитие экспериментальной онкологии с углубленным изучением патофизиологии злокачественного процесса на экспериментальных моделях животных способствует совершенствованию практической и теоретической составляющей такого глобального направления в медицине, как онкология.

Цель исследования – изучить антиоксидантную систему в митохондриях клеток кожи экспериментальных животных на фоне хронической нейрогенной боли, опухолевого процесса и сочетанного воздействия данных патологических процессов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6 ($n = 28$) 8-недельного возраста с начальной массой 21–22 г. Животные были получены из ФГБУ МНИЦ Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе использовали клеточную линию мышинной меланомы B16/F10, метастазирующую в легкие. Опухолевый штамм получен из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Исследования на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в

Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животные были распределены методом случайной выборки на следующие экспериментальные группы: интактная группа ($n = 7$), контрольная группа с воспроизведением модели хронической боли [8] ($n = 7$), группа сравнения (В16/Ф10) – мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы В16/Ф10 ($n = 7$) и основная группа (хроническая боль + В16/Ф10) – мыши, которым меланому В16/Ф10 перевивали через 3 нед после создания модели хронической боли ($n = 7$).

Мышам основной группы (хроническая боль + В16/Ф10) осуществляли перевязку седалищного нерва с двух сторон под ксила-золетилловым наркозом. Через 3 нед после заживления операционной раны подкожно под правую лопатку вводили 0,5 мл взвеси опухолевых клеток меланомы В16/Ф10 в физиологическом растворе в разведении 1 : 10. Животным из группы сравнения (В16/Ф10) перевивали меланому В16/Ф10 подкожно в той же дозе и объеме, что и в основной группе, но без воспроизведения модели хронической боли. При стандартной перевивке опухоль появляется в 100% случаев, достаточно быстро растет и на 12–16-е сут роста метастазирует преимущественно гематогенно в легкие (60–90%), реже – в печень и селезенку. Все манипуляции с животными производили в боксе. Инструменты, посуду, руки дезинфицировали общепринятым способом.

Всех животных через 2 нед (14-е сут) эксперимента декапитировали на гильотине. После декапитации

у животных с применением хладагентов быстро иссекали кожу и выделяли митохондрии по методу М.В. Егоровой, С.А. Афанасьева [9]. В полученных митохондриальных образцах с помощью стандартных тест-систем иммуноферментного анализа определяли уровень восстановленного глутатиона (GSH), нМ/г белка (Bio Source, США); окисленного глутатиона (GSSG), нМ/г белка (Bio Source, США); глутатионпероксидазы-1 (ГПО-1), нг/мг белка (Ab Frontier, Южная Корея); глутатионпероксидазы-4 (ГПО-4), нг/мг белка (Clod-Clon Corporation, CNDR); глутатионредуктазы (ГР), нг/мг белка (Cusabio, CNDR); глутатион-S-трансферазы (Г-S-T), нг/мг белка (Ivvundiagnostik, Германия); супероксиддисмутазы-2 (СОД-2), нг/мг белка (Ab Frontier, Южная Корея); общего белка биуретовым методом, г/л (Ольвекс Диагностика, Россия).

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Сравнение количественных данных в четырех группах (независимые выборки) проводили с использованием критерия Краскела – Уоллиса с процедурой множественных сравнений. Данные таблиц представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, а m – стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе эксперимента были получены данные по влиянию меланомы В16/Ф10, хронической нейрогенной боли и сочетанного воздействия данных патологических процессов на глутатионовую систему в митохондриях клеток кожи мышей-самок на 14-е сут эксперимента – логарифмическая фаза роста экспериментальной опухоли (табл. 1).

Таблица 1

Содержание антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток кожи мышей-самок при росте меланомы В16/Ф10 на фоне хронической нейрогенной боли, $M \pm m$				
Показатель	Интактные животные	Контрольные животные (хроническая нейрогенная боль)	Группа сравнения (опухоль В16/Ф10)	Основная группа (опухоль В16/Ф10 + хроническая нейрогенная боль)
Глутатион восстановленный (GSH), нМ/г белка	151071,2 ± 717,41	196860,1 ± 1917,581 $p = 0,000000^1$	179886,5 ± 15147,22	219446,3 ± 3643,97 $p = 0,000000^1$
Глутатион окисленный (GSSG), нМ/г белка	462,32 ± 15,88	506,81 ± 19,83	637,25 ± 17,62 $p = 0,000008^1$ $p = 0,000356^2$	714,34 ± 9,16 ^{1,2} $p = 0,000000^1$ $p = 0,000001^2$
ГПО-1, нг/мг белка	0,207 ± 0,009	0,604 ± 0,007 $p = 0,000000^1$	0,107 ± 0,008 $p = 0,000005^1$ $p = 0,000000^2$	0,746 ± 0,014 $p = 0,000000^1$ $p = 0,000001^2$ $p = 0,000000^3$
ГПО-4, нг/мг белка	16,518 ± 0,216	32,263 ± 0,471 $p = 0,000000^1$	4,435 ± 0,166 ^{1,2} $p = 0,000000^1$ $p = 0,000000^2$	25,903 ± 0,282 $p = 0,000000^1$ $p = 0,000000^2$ $p = 0,000000^3$

Окончание табл. 1

Показатель	Интактные животные	Контрольные животные (хроническая нейрогенная боль)	Группа сравнения (опухоль В16/F10)	Основная группа (опухоль В16/F10 + хроническая нейрогенная боль)
ГР, нг/мг белка	13,239 ± 0,190	36,717 ± 0,228 <i>p</i> = 0,00000 ¹	3,403 ± 0,222 ^{1,2} <i>p</i> = 0,00000 ¹ <i>p</i> = 0,00000 ²	16,675 ± 0,189 <i>p</i> = 0,00000 ² <i>p</i> = 0,00000 ³
Г-S-T, нг/мг белка	2,164 ± 0,127	1,898 ± 0,100	1,771 ± 0,099	2,433 ± 0,145 <i>p</i> = 0,010500 ² <i>p</i> = 0,002727 ³
СОД-2, мг/мг белка	461,402 ± 20,133	1128,2 ± 54,186 <i>p</i> = 0,00000 ¹	120,84 ± 10,904 <i>p</i> = 0,00000 ¹ <i>p</i> = 0,00000 ²	849,68 ± 32,492 <i>p</i> = 0,00000 ¹ <i>p</i> = 0,00085 ² <i>p</i> = 0,00000 ³

¹ статистически значимо относительно значений у интактных животных; ² статистически значимо относительно значений у контрольных животных (хроническая нейрогенная боль); ³ статистически значимо относительно значений у группы сравнения (опухоль В16/F10) (здесь и в табл. 2).

В митохондриях клеток кожи у животных с хронической нейрогенной болью (контрольная группа) по сравнению с интактными животными было установлено повышенное содержание компонентов антиокислительной системы: GSH в 1,3 раза; ГПО-1 – 2,9; ГПО-4 – 1,9; ГР – 2,8; СОД-2 в 2,4 раза.

В то же время злокачественный рост у животных из группы сравнения приводит к совершенно противоположным изменениям антиокислительной системы в митохондриях: низкое содержание ГПО-1 в 1,9 раза; ГПО-4 – 3,7; ГР – 3,9; СОД-2 в 3,8 раза и повышенный уровень GSSG в 1,36 раза по сравнению с интактными значениями. Такая же направленность сохранилась и в сравнении с контрольной группой животных (хроническая нейрогенная боль), где уровень ГПО-1 был снижен в 5,6 раза; ГР – 10,8; ГПО-4 – 7,3; СОД-2 в 9,3 раза соответственно. Содержание окисленного глутатиона превосходило величины по контрольной группе в 1,26 раза. При этом уровень восстановленного глутатиона статистически значимо не отличался от интактных и контрольных величин.

Сочетанное воздействие хронической нейрогенной боли и опухолевого процесса способствовало

активной наработке GSH в 1,5 раза; ГПО-1 – 3,6; Г-S-T – 1,28; ГПО-4 – 1,6; СОД-2 в 1,8 раза по сравнению со значениями по интактной группе животных. При этом содержание окисленной формы глутатиона было в 1,54 раза выше интактных значений. По сравнению со значениями у животных, испытывающих только хроническую нейрогенную боль, при сочетанном воздействии двух патологических процессов уровень ГПО-1 был выше в 1,24 раза (*p* = 0,00001), ГР – 2,2; Г-S-T – 1,37 раза (на уровне статистической тенденции), а СОД-2 и ГПО-4, напротив, были снижены в 1,33 и 1,24 раза (*p* = 0,00000). Уровень GSSG и в этом случае был повышен в 1,42 раза. Сравнивая результат сочетанного влияния хронической боли и роста опухоли с аналогичными данными в группе животных только с опухолевым ростом (группа сравнения), обнаружили более высокое содержание ГПО-1 в 6,9 раза; ГР – 4,9; Г-S-T – 1,37; ГПО-4 – 5,8; СОД-2 в 7 раз соответственно.

В табл. 2 представлены коэффициенты соотношения компонентов глутатионовой системы, отражающие поддержание редокс-гомеостаза в организме животного.

Таблица 2

Показатели глутатионового каскада в митохондриях клеток кожи мышей-самок при росте меланомы В16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли, *M ± m*

Показатель	Интактные животные	Контрольные животные (хроническая нейрогенная боль)	Группа сравнения (опухоль В16/F10)	Основная группа (опухоль В16/F10 + хроническая нейрогенная боль)
GSH/GSSG	3,2 ± 0,124	3,9 ± 0,130 <i>p</i> = 0,004849 ¹	2,8 ± 0,300 <i>p</i> = 0,007518 ²	3,1 ± 0,053 <i>p</i> = 0,000064 ²
GSH/ГПО-1	7,3 ± 0,298	3,3 ± 0,052 <i>p</i> = 0,000000 ¹	17,8 ± 2,567 <i>p</i> = 0,001583 ¹ <i>p</i> = 0,000102 ²	2,94 ± 0,039 <i>p</i> = 0,000000 ¹ <i>p</i> = 0,000084 ³
СОД-2/ГПО-1	2,2 ± 0,129	1,8 ± 0,100	1,1 ± 0,112 <i>p</i> = 0,000036 ¹ <i>p</i> = 0,000464 ²	1,1 ± 0,052 <i>p</i> = 0,000004 ¹ <i>p</i> = 0,0000312

Показатель	Интактные животные	Контрольные животные (хроническая нейрогенная боль)	Группа сравнения (опухоль В16/F10)	Основная группа (опухоль В16/F10 + хроническая нейрогенная боль)
ГР/ГПО-1	6,4 ± 0,258	6,0 ± 0,115	3,2 ± 0,324 $p = 0,000006^1$ $p = 0,000003^2$	2,2 ± 0,063 $p = 0,000000^1$ $p = 0,000000^2$ $p = 0,008103^3$

Доминирующее ингибирование антиокислительных компонентов в случае опухолевой болезни и их переизбыток при хронической боли внесли разнонаправленные сдвиги в работу физиологических каскадов антиокислительных ферментов. Так, в случае контрольной группы животных (хроническая нейрогенная боль) по сравнению с интактными значениями отмечалось повышение коэффициента GSH/GSSG в 1,22 раза, снижение GSH/ГПО-1 в 2,2 раза. Опухолевый рост в группе сравнения способствовал снижению вычисляемых коэффициентов СОД-2/ГПО-1 в 2 раза, ГР/ГПО-1 в 2 раза, а GSH/ГПО-1, напротив, был существенно повышен в 2,44 раза. По сравнению с хронической нейрогенной болью, основная масса вычисляемых коэффициентов в группе с опухолевым ростом были снижены: GSH/GSSG в 1,4 раза ($p = 0,007518$), СОД-2/ГПО-1 – в 1,64, ГР/ГПО-1 – в 1,87, а GSH/ГПО-1 был выше в 5,4 раза. Сочетанное воздействие двух патологических процессов подавляло работу физиологических каскадов антиокислительных ферментов. Так, GSH/ГПО-1 по сравнению с интактными величинами был снижен в 2,5 раза, СОД-2/ГПО-1 и ГР/ГПО-1 в 2 и 2,9 раза соответственно. По сравнению с контрольной группой животных (хроническая нейрогенная боль) изменения наблюдались для соотношений GSH/GSSG, СОД-2/ГПО-1 и ГР/ГПО-1, что выразилось в снижении их величин в 1,26 раза ($p = 0,000064$), в 1,64 и 2,7 раза соответственно.

Относительно группы животных с опухолевым ростом (группа сравнения) было найдено снижение GSH/ГПО-1 и ГР/ГПО-1 в 6 и 1,45 раза соответственно. Основная часть изменений в каскадных реакциях была связана с ГПО-1, которая отвечает за «механическую» детоксикацию пероксидов, осуществляющуюся с помощью ферментативного механизма типа «пинг-понг» с двумя молекулами GSH, в связи с чем происходит ферментативная детоксикация нерадикальных гидропероксидов с регуляцией окислительно-восстановительного баланса непосредственно путем элиминации гидропероксидов и окисления GSH, основного низкомолекулярного тиола в клетках [10]. По всей видимости, переизбыток ГПО-1 приводит к нехватке потенциальных субстратов, что проявляется в угнетении всех каскадов с ее участием.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя полученные данные, полагаем, что митохондрии клеток кожи при хронической нейрогенной боли реагируют в сторону «восстановительного стресса», который проявляется в активной работе всех исследованных ферментов, в том числе и трипептида GSH. В случае опухолевого процесса в митохондриях кожи – ткани-мишени для меланомы, отмечали классический сценарий перекисной теории канцерогенеза [11] с угнетением всех антиоксидантных ферментов и накоплением окисленного глутатиона. Существующая хроническая нейрогенная боль у животных с наложением на нее опухолевого процесса не позволяет перестроить меланоме уже развившийся «восстановительный стресс», в связи с чем все антиоксидантные ферменты находятся на достаточно высоком уровне, но при этом ферментативное каскадное взаимодействие подавлено, на что указывают величины вычисляемых коэффициентов: GSH/ГПО-1, ГР/ГПО-1. Избыточное накопление восстановительных эквивалентов приводит к «восстановительному стрессу» и характеризуется отсутствием окислителей и (или) снижением избыточных эквивалентов [12, 13].

Понятие «восстановительный стресс» – достаточно новая концепция. В течение некоторого времени было известно, что отсутствие клеточных окислителей может уменьшить реакции роста клеток. Более новые доказательства указывают на дополнительные клеточные и физиологические эффекты, вызванные отсутствием клеточных окислителей и накоплением избыточных восстановительных эквивалентов, включая изменения в образовании дисульфидной связи белка, уменьшенную митохондриальную функцию и снижение клеточного метаболизма [13]. В настоящее время появился ряд работ, свидетельствующих о том, что «восстановительный» или редуцирующий стресс сопровождается такими состояниями, как гипоксия, гипергликемия, которые ингибируют митохондриальную функцию, вызывают избыточное накопление клеточных восстановительных эквивалентов [14–16].

Полагаем, что хроническая нейрогенная боль относится к таким же состояниям, способным перестраивать работу митохондрий, в данном случае

именно митохондрий клеток кожи, в сторону «восстановительного стресса» с сохранением направленности и в случае присоединенного опухолевого процесса. Возможно, увеличение количества антиоксидантных ферментов под действием хронической нейрогенной боли на момент появления опухоли находится в таком устойчивом состоянии, которое невозможно развернуть или подавить окислительным процессом, характеризующим в свою очередь опухолевый рост.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что хроническая нейрогенная боль оказывает модулирующее воздействие на функционирование митохондрий клеток кожи, способствуя перестройке их антиоксидантной системы в сторону «восстановительного стресса», что проявляется в существенном увеличении содержания антиоксидантных ферментов. Такая ответная реакция митохондрий клеток кожи – ткани-мишени для меланомы – может приводить к иным закономерностям в развитии опухолевого процесса на фоне хронической нейрогенной боли. Бесспорно, речь идет только о коже, а не обо всем организме в целом, и мы понимаем, что функциональная реакция митохондрий разных органов может быть различна. Это и вызывает интерес и требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуковец А.Г. Современные принципы и перспективы лечения меланомы кожи. *Онкологический журнал*. 2015; 9 (4): 69–76.
2. Curtin J.A., Fridlyand J., Kageshita T., Patel H.N., Busam K.J., Kutzner H., Cho K.H., Aiba S., Bröcker E.B., LeBoit P.E., Pinkel D., Bastian B.C. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353 (20): 2135–2147. DOI: 10.1056/NEJMoa050092.
3. Пирузян Л.А. О возможности создания новых лечебных технологий. *Нейрохимия*. 2010; 27 (2): 109–129.
4. Ahn C.S., Metallo C.M. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab.* 2015; 3 (1): 1–10. DOI: 10.1186/s40170-015-0128-2.
5. Древин В.Е., Савина Е.Г., Надежкина Е.Ю., Савин Г.А. Кожная экскреция азотистых веществ. Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2014: 108.
6. Leppert W., Zajaczowska R., Wordliczek J., Dobrogowski J., Woron J., Krzakowski M. Pathophysiology and clinical characteristics of pain in most common locations in cancer patients. *J. Physiology and Pharmacology*. 2016; 67 (6): 787–799.
7. Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей. *Российский журнал боли*. 2017; 2 (53): 14–20.
8. Котиева И.М. Особенности моноаминового обмена в болевых и противоболевых структурах мозга в динамике хронической боли. Дисс. ... канд. мед. наук. Ростов н/Д, 1999: 169.
9. Егорова М.В., Афанасьев С.А. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: Современные методические приемы. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 26 (1–1): 22–28.
10. Takebe G., Yarimizu J., Saito Y., Hayashi T., Nakamura H., Yodoi J., Nagasawa S., Takahashi K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277 (43): 41254–41258. DOI: 10.1074/jbc.M202773200.
11. Лю Б.Н. Старение, возрастные патологии и канцерогенез (кислородно-перекисная концепция). Алматы: КазНТУ, 2003: 706.
12. Rajasekaran N.S., Connell P., Christians E.S., Yan L.J., Taylor R.P., Orosz A., Zhang X.Q., Stevenson T.J., Peshock R.M., Leopold J.A., Barry W.H., Loscalzo J., Odelberg S.J., Benjamin I.J. Human alphaB-crystallin mutation causes oxidative stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Cell*. 2007; 130 (3): 427–439. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.044.
13. Lubos E., Loscalzo J., Handy D.E., Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15 (7): 1957–1997. DOI: 10.1089/ars.2010.3586.
14. Kim J.W., Gao P., Dang C.V. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26 (2): 291–298. DOI: 10.1007/s10555-007-9060-4.
15. Nyengaard J.R., Ido Y., Kilo C., Williamson J.R. Interactions between hyperglycemia and hypoxia: implications for diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2004; 53 (11): 2931–2938. DOI: 10.2337/diabetes.53.11.2931.
16. Tilton R.G. Diabetic vascular dysfunction: links to glucose-induced reductive stress and VEGF. *Microsc. Res. Tech.* 2002; 57 (5): 390–407. DOI: 10.1002/jemt.10092.

Вклад авторов

Нескубина И.В. – разработка концепции и дизайна; анализ и интерпретация данных. Франциянц Е.М. – разработка концепции и дизайна; окончательное утверждение для публикации рукописи. Сурикова Е.И. – анализ и интерпретация данных. Каплиева И.В. – разработка концепции и дизайна. Трепитаки Л.К. – разработка концепции и дизайна. Немашкалова Л.А. – обоснование

рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Лесовая Н.С. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания.

Сведения об авторах

Франциянц Елена Михайловна, д-р биол. наук, профессор, зам. генерального директора по научной работе, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0003-3618-6890.

Нескубина Ирина Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-7395-3086.

Сурикова Екатерина Игоревна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-4318-7587.

Трепитаки Лидия Константиновна, науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-9749-2747.

Немашкалова Людмила Анатольевна, науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0003-2713-8598.

Каплиева Ирина Викторовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0002-3972-2452.

Лесовая Наталья Сергеевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону. ORCID 0000-0001-5686-8659.

(✉) **Нескубина Ирина Валерьевна**, e-mail: nes Kubina.irina@mail.ru.

Поступила в редакцию 14.03.2019
Подписана в печать 25.12.2019

Влияние курения на уровни сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови у пациентов без бронхолегочных заболеваний

Харламова О.С., Николаев К.Ю., Рагино Ю.И., Воевода М.И.

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины (НИИТПМ) – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)
Россия, 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Ежегодно около 6 млн человек умирают из-за употребления табака. Дыхательный эпителий – первая линия защиты против экзогенной инвазии, в частности вредных вдыхаемых частиц, патогенов и аллергенов. Однако эпителий дыхательных путей является не просто физическим барьером, но и регулятором иммунологических и воспалительных реакций посредством секреции медиаторов воспаления и рекрутинга иммунных клеток. Важным компонентом легочной иммунной системы является сурфактант, в частности его белки SP-A и SP-D, синтезируемые в основном пневмоцитами II типа.

Цель. Оценить уровень сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови у курящих пациентов без наличия бронхолегочных заболеваний.

Материалы и методы. В исследование включены 59 пациентов, госпитализированных в терапевтическое отделение по поводу гипертонической болезни. Общая группа разделена на подгруппы: некурящие пациенты ($n = 31$) и «здоровые курильщики» ($n = 28$). Всем пациентам проведены клиническое, функционально-диагностическое и лабораторное исследования. Содержание сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Подгруппы не различались по полу, возрасту, росту, массе тела, уровню артериального давления, частоте сердечных сокращений, частоте дыхательных движений, а также по распределению сопутствующей патологии. Сравнимые подгруппы достоверно отличались по уровню тромбоцитов, по остальным основным параметрам общего анализа крови, биохимического анализа различий не отмечено. Выявлено, что уровень в крови сурфактантных белков SP-A и SP-D в подгруппе «здоровых курильщиков» достоверно выше в сравнении с подгруппой некурящих пациентов. При корреляционном анализе прямая связь получена для сурфактантных белков SP-A и SP-D и курения ($R = 0,360$; $p = 0,006$; $R = 0,274$; $p = 0,037$). Обратная корреляционная связь выявлена SP-D с возрастом ($R = -0,315$; $p = 0,016$) и прямая связь белка SP-A – с диастолическим артериальным давлением ($R = 0,271$; $p = 0,039$). В подгруппе некурящих получена обратная связь SP-D с возрастом ($R = -0,438$; $p = 0,016$) и систолическим артериальным давлением ($R = -0,433$; $p = 0,017$).

Заключение. Отмечены более высокий уровень сурфактантных белков SP-A и SP-D в группе курящих пациентов, их прямая связь патогенетически обоснована (воспалительные изменения, структурные аномалии в паренхиме легких при воздействии сигаретного дыма). Белок SP-D более значим в сравнении с SP-A при ремоделировании сосудистой стенки, матрикса ткани легкого, при окислительном повреждении ткани легкого и апоптозе, что объясняет его обратную связь с возрастом и систолическим артериальным давлением.

Ключевые слова: сурфактант, сурфактантный белок А, сурфактантный белок D, биомаркер, курение.

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

Источники финансирования. Материал статьи является частью бюджетной темы НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекуляр-

✉ Харламова Ольга Сергеевна, e-mail: olga.kharlamova2016@yandex.ru.

но-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению». Работа выполнена в рамках государственного задания по интеграционному проекту (0324-2018-0040) «Разработка новых способов экспресс-диагностики заболеваний человека на основе детекции органоспецифических маркеров с помощью современных физических и физико-химических подходов».

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИТПМ – филиал ИЦИГ СО РАН (протокол № 15 от 10.04.2018).

Для цитирования: Харламова О.С., Николаев К.Ю., Рагино Ю.И., Воевода М.И. Влияние курения на уровни сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови у пациентов без бронхолегочных заболеваний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 104–111. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-104-111>.

Effects of smoking on the level of sp-a and sp-d surfactant proteins in the blood of patients without bronchopulmonary diseases

Kharlamova O.S., Nikolaev K.Yu., Ragino Yu.I., Voevoda M.I.

*Research Institute of Therapy and Preventive Medicine, branch of the Federal Research Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
175/1, Boris Bogatkov Str., Novosibirsk, 630089, Russian Federation*

ABSTRACT

Every year, about six million people die from tobacco use. Respiratory epithelium is the first line of defense against exogenous invasion, in particular, harmful inhaled particles, pathogens and allergens. However, the epithelium of the respiratory tract is also a regulator of immunological and inflammatory reactions through secretion of inflammation and immune cell recruitment mediators. An important component of the pulmonary immune system is the surfactant, and, in particular, its proteins SP-A and SP-D, synthesized mainly by type II pneumocytes.

Aim. To assess the levels of surfactant proteins SP-A and SP-D in the blood of smoking patients without bronchopulmonary diseases.

Materials and methods. The study included 59 patients admitted to the department of internal medicine with hypertension. The general group was divided into subgroups: non-smoking patients ($n = 31$) and healthy smokers ($n = 28$). All patients underwent clinical, functional, diagnostic and laboratory tests. The content of surfactant proteins SP-A and SP-D in the blood was determined by enzyme immunoassay.

Results. The subgroups did not differ in sex, age, height, body weight, blood pressure, heart rate, respiratory rate, and the distribution of comorbidities. The subgroups differed in the platelet level; in other main parameters of complete blood count and blood biochemistry no differences were revealed. It was found that the blood levels of surfactant proteins SP-A and SP-D in the subgroup of healthy smokers were significantly higher in comparison with the subgroup of non-smoking patients. The correlation analysis revealed a direct relationship between surfactant proteins SP-A and SP-D and smoking ($R = 0.360$, $p = 0.006$, $R = 0.274$, $p = 0.037$), a negative correlation between SP-D protein and age ($R = -0.315$, $p = 0.016$), and a direct relationship between SP-A protein and diastolic blood pressure ($R = 0.271$, $p = 0.039$). In the non-smoking subgroup, a negative correlation between SP-D and age ($R = -0.438$, $p = 0.016$) and between SP-D and systolic blood pressure ($R = -0.433$, $p = 0.017$) was identified.

Conclusion. The direct relationship between higher levels of the surfactant proteins SP-A and SP-D and smoking in the group of healthy smokers is justified (inflammatory changes, structural abnormalities in the lung parenchyma under the influence of cigarette smoke). The SP-D protein is more significant in comparison with the SP-A protein in vascular wall remodeling, lung tissue matrix, oxidative lung tissue damage, and apoptosis, which explains its negative correlation with age and systolic blood pressure.

Key words: surfactant, surfactant protein A, surfactant protein D, biomarker, smoking.

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

Source of financing. This article is a part of the government-funded research topic of the Research Institute of Therapy and Preventive Medicine “Epidemiological monitoring of the state of public health and the study of molecular genetic and molecular biological mechanisms of the development of common therapeutic diseases in Siberia for improving approaches to their diagnosis, prevention and treatment.” This work was carried out within the state assignment for an integration project (0324-2018-0040) “Development of new methods for the rapid diagnosis of human diseases based on the detection of organ-specific markers using modern physical and physicochemical approaches.”

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Research Institute of Therapy and Preventive Medicine (Protocol No. 15 of April 10, 2018).

For citation: Kharlamova O.S., Nikolaev K.Yu., Ragino Yu.I., Voevoda M.I. Effects of smoking on the level of sp-a and sp-d surfactant proteins in the blood of patients without bronchopulmonary diseases. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 104–111. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-104-111>.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на усилия, направленные на снижение распространенности курения, ежегодно около 6 млн человек во всем мире умирают из-за употребления табака [1]. Курение сигарет вносит значительный вклад в патогенез хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), гипертонии, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, а также является признанным фактором риска для неинфекционных заболеваний с воспалительными компонентами, такими как атеросклероз, болезнь Крона, ревматоидный артрит, псориаз, офтальмопатия Грейвса и инсулиннезависимый сахарный диабет [2–5]. Кроме того, у курильщиков наблюдается повышенная восприимчивость к микробным инфекциям (инфекции дыхательных путей, бактериальный менингит и пародонтит) и ухудшение заживления ран [6]. Дыхательный эпителий – первая линия защиты против экзогенной инвазии, в частности вредных вдыхаемых частиц, патогенов и аллергенов. Однако эпителий дыхательных путей является не просто физическим барьером, но и регулятором иммунологических и воспалительных реакций посредством секреции медиаторов воспаления и рекрутинга иммунных клеток [7–9]. Важным компонентом легочной иммунной системы является сурфактант, в частности его белки SP-A и SP-D, синтезируемые в основном пневмоцитами II типа [10].

Физиологически сурфактантные белки SP-A и SP-D встречаются в небольших количествах в крови, табачный дым вызывает повышенную альвеоло-капиллярную утечку поверхностно-активных белков в кровь, и их уровень может помочь в оценке повреждения легких, вызванного дымом. Возможность использования сурфактантных белков в качестве маркеров повреждения альвеолярного эпителия при курении не изучена, также лишь единичные исследо-

вания уровней SP-A и SP-D у пациентов с ХОБЛ. В связи с вышесказанным, изучение данных механизмов является актуальным в современной медицинской науке для ранней идентификации курильщиков, подверженных риску ХОБЛ.

Цель исследования – оценить уровень сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови у курящих пациентов без наличия бронхолегочных заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 59 пациентов, госпитализированных в терапевтическое отделение по поводу гипертонической болезни. Критерии включения пациентов в исследование: ухудшение течения гипертонической болезни (средний показатель систолического артериального давления ≥ 140 мм рт. ст. при автоматическом измерении артериального давления в кабинете у врача), пациенты обоих полов в возрасте 18–75 лет, отсутствие острых и хронических заболеваний бронхов и легких, отсутствие изменений по данным спирографии и рентгенографии органов грудной клетки, согласие на участие в данном исследовании и заполнение соответствующей формы добровольного информированного согласия.

Критерии исключения пациентов: наличие острого инфекционного процесса на момент включения в исследование, наличие онкологических заболеваний, предшествующие курсы химиотерапии или лучевой терапии, иммунодефицитное заболевание, перенесенный (активный) туберкулез легких, клинически значимое, по мнению исследователя, нестабильное кардиологическое заболевание, например неконтролируемая симптоматическая аритмия, фибрилляция предсердий, сердечная недостаточность с застойными явлениями 3–4-й степени согласно классификации NYHA, тяжелая степень почечной

недостаточности, определяемая при значении рСКФ, рассчитанном по формуле СКД-ЕРІ (сотрудничества в области эпидемиологии хронических заболеваний почек) с учетом концентрации креатинина в сыворотке крови менее 15 мл/мин/1,73 м², сахарный диабет (СД) 1-го типа, период беременности или лактации, известное сопутствующее заболевание, представляющее опасность для жизни, при котором ожидаемая продолжительность жизни составит менее 18 мес с момента включения в исследование.

Общая группа разделена на подгруппы: некурящие пациенты ($n = 31$) и «здоровые курильщики» ($n = 28$). «Здоровые курильщики» – термин, используемый в современной литературе, подразумевает у данных пациентов отсутствие респираторных симптомов или минимальные респираторные симптомы (такие как кашель, выделение мокроты, одышка после незначительных физических нагрузок), которые могут быть обнаружены только с помощью клинического опроса [11]. В подгруппу здоровых курильщиков были включены пациенты с минимальным индексом курения от 2 пачка/лет.

Всем пациентам проведены клиническое, функционально-диагностическое и лабораторное исследования. Лабораторная диагностика (гемограмма, биохимический анализ крови) проводилась на биохимическом анализаторе Beckman Coulter AU 480 (Бекмен Культер, США) и гематологическом анализаторе Siemens adiva2120i, вс 5300 (Германия). Содержание сурфактантных белков SP-A и SP-D

в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа на анализаторе Multiscan EX (Финляндия) с использованием тест-системы ELISA BioVendor (R&D, США). Рентгенографическое исследование органов грудной клетки проводилось на аппарате «ТелеКоРД-МТ» (комплекс рентгеновский диагностический телеуправляемый, Россия), исследование функции внешнего дыхания – на аппарате Spirolab I спирометр (Италия).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета программ SPSS 10.05. Определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение и стандартное отклонение $M \pm SD$. При сравнении двух нормально распределенных выборок использовался t -тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычислялись медиана, 25- и 75-й процентиля Me (25%; 75%). Связи между признаками оценивались путем вычисления коэффициента корреляции Спирмена (R). При оценке качественных признаков использовался критерий χ^2 . Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы p принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов				
Показатель	Общая группа пациентов, $n = 59$	Подгруппа «здоровых курильщиков», $n = 28$	Подгруппа некурящих пациентов, $n = 31$	p
Пол, мужчины/женщины, n (%)	32 (54,2) / 27 (45,8)	17 (60,7) / 11 (39,3)	15 (48,4) / 16 (51,6)	0,421
Возраст, лет, Me (25%; 75%)	55 (47; 68)	53 (48; 65)	61 (44; 68)	0,543
Рост, см, $M \pm SD$	169,2 \pm 9,0	170,6 \pm 9,6	168,0 \pm 8,3	0,113
Масса тела, кг, Me (25%; 75%)	79 (69; 85)	80 (71; 83)	75 (65; 86)	0,101
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст., $M \pm SD$	157 \pm 26	162,7 \pm 26,8	152,3 \pm 24,3	0,343
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст., $M \pm SD$	89 \pm 12	91,8 \pm 12,7	86,3 \pm 10,5	0,320
Частота дыхательных движений, уд./мин, $M \pm SD$	17,6 \pm 4,8	17,3 \pm 6,4	18,0 \pm 2,6	0,716
Частота сердечных сокращений, уд./мин, $M \pm SD$	84,2 \pm 10,2	83,4 \pm 10,1	83,8 \pm 10,4	0,113
Количество пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, n (%)	8 (13,6)	4 (14,3)	4 (12,9)	0,885
Количество пациентов с ожирением, ИМТ ≥ 30 , n (%)	21 (35,6)	10 (35,7)	11 (35,4)	0,933

Примечание. ИМТ – индекс массы тела, p – достоверность различия подгрупп некурящих пациентов и «здоровых курильщиков» (здесь и в табл. 2, 3).

Подгруппы не различались по полу, возрасту, росту, массе тела, уровню артериального давления, частоте сердечных сокращений, частоте дыхательных движений, а также по распределению сопутствующей патологии.

Характеристика лабораторных показателей (общий анализ крови, биохимический анализ, анализ уровней сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови) пациентов представлена в табл. 2, 3.

Сравниваемые подгруппы достоверно отличались по уровню тромбоцитов, по остальным основным параметрам общего анализа крови, биохимического анализа различий не выявлено. Выявлено, что уровень в крови сурфактантных белков SP-A и SP-D в подгруппе «здоровых курильщиков» достоверно выше в сравнении с подгруппой некурящих пациентов.

Значимые корреляционные связи в общей группе пациентов представлены в табл. 4.

Таблица 2

Общий анализ крови, биохимический анализ пациентов				
Показатель	Общая группа пациентов, <i>n</i> = 59	Подгруппа «здоровых курильщиков», <i>n</i> = 28	Подгруппа некурящих пациентов, <i>n</i> = 31	<i>p</i>
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$, <i>Me</i> (25%; 75%)	8,1 (6,6; 10,1)	9,0 (6,5; 10,5)	7,6 (6,6; 9,7)	0,427
Эритроциты, $\times 10^9/\text{л}$, <i>M</i> \pm <i>SD</i>	4,5 \pm 0,7	4,5 \pm 0,9	4,5 \pm 0,5	0,737
Гемоглобин, г/л, <i>M</i> \pm <i>SD</i>	135,3 \pm 22,7	135,8 \pm 27,7	134,8 \pm 17,4	0,762
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$, <i>Me</i> (25%; 75%)	225 (176; 267)	184 (150; 236)	249 (202; 268)	0,016
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч, <i>Me</i> (25%; 75%)	8 (5; 13)	8 (4; 13)	9 (6; 12)	0,861
Аланинаминотрансфераза, МЕ/л, <i>Me</i> (25%; 75%)	18,5 (12,0; 29,2)	21,5 (14,1; 33,7)	15,0 (11,3; 23,2)	0,069
Аспаргатаминотрансфераза, МЕ/л, <i>Me</i> (25%; 75%)	21,3 (17,1; 35,0)	22,0 (18,3; 46,2)	20,5 (17,0; 30,1)	0,349
Общий белок, г/л, <i>M</i> \pm <i>SD</i>	71,0 \pm 26,5	72,6 \pm 7,3	69,9 \pm 5,7	0,146
Билирубин общий, ммоль/л, <i>Me</i> (25%; 75%)	13,7 (10,8; 17,4)	13,4 (9,8; 17,3)	14,2 (11,5; 17,4)	0,611
Холестерин, ммоль/л, <i>M</i> \pm <i>SD</i>	4,8 \pm 1,3	4,7 \pm 1,1	4,8 \pm 1,4	0,902
Креатинин, ммоль/л, <i>Me</i> (25%; 75%)	99,0 (80,9; 21,6)	100,0 (81,2; 133,4)	98,0 (78,0; 108,0)	0,237
Глюкоза, ммоль/л, <i>Me</i> (25%; 75%)	5,2 (4,6; 5,9)	5,3 (4,9; 6,0)	5,0 (4,4; 5,8)	0,221
Мочевина, ммоль/л, <i>Me</i> (25%; 75%)	6,1 (5,4; 8,5)	5,9 (4,8; 8,9)	6,3 (5,5; 8,1)	0,809

Таблица 3

Уровень сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови пациентов				
Показатель	Общая группа пациентов, <i>n</i> = 59	Подгруппа «здоровых курильщиков», <i>n</i> = 28	Подгруппа некурящих пациентов, <i>n</i> = 31	<i>p</i>
Белок SP-A, нг/мл, <i>Me</i> (25%; 75%)	34,19 (26,97; 45,96)	44,60 (28,35; 61,56)	29,26 (21,25; 39,46)	0,007
Белок SP-D, нг/мл, <i>Me</i> (25%; 75%)	274,06 (173,95; 484,22)	333,99 (232,32; 593,35)	242,37 (145,51; 356,80)	0,039

Таблица 4

Корреляционные связи в общей группе пациентов		
Корреляционная пара	Общая группа пациентов, <i>n</i> = 58	
	<i>R</i>	<i>p</i>
Белок SP-A – курение	0,360	0,006
Белок SP-D – курение	0,274	0,037
Белок SP-A – диастолическое артериальное давление	0,271	0,039
Белок SP-D – возраст	-0,315	0,016

Прямая корреляционная связь получена для сурфактантных белков SP-A и SP-D и курения, обратная связь выявлена SP-D с возрастом и прямая связь белка у SP-A – с диастолическим артериальным давлением. При рассмотрении корреляционных связей отдельно в подгруппах получена обратная связь SP-D с возрастом ($R = -0,438$; $p = 0,016$) и систолическим артериальным давлением ($R = -0,433$; $p = 0,017$) у некурящих пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты в отношении более высокого уровня в крови сурфактантных белков SP-A и SP-D в подгруппе «здоровых курильщиков» в сравнении с подгруппой некурящих пациентов корреспондируются с результатами G.L. Sorensen и соавт. (2006), W. Mazur и соавт. (2011), D. Behera и соавт. (2005), H. Pumets и соавт. (2011), F. Moazed и соавт. (2016), K.P. Lone, Nida, (2018) [12–17]. У «здо-

ровых курильщиков» в дыхательных путях и паренхиме легких обычно наблюдаются воспалительные изменения и структурные аномалии из-за сигаретного дыма, в результате чего сурфактантные белки SP-A и SP-D попадают в кровь [18]. Это связано с потерей целостности воздушно-кровяного барьера при курении, который ответствен за утечку секретруемых легочных белков внутрисосудистым путем в кровеносное русло [19]. Экспериментально продемонстрировано, что градиент концентрации SP-A и SP-D позволяет белкам, синтезированным в дыхательном тракте, попадать в кровоток при экспозиции сигаретного дыма [16, 20, 21]. При определенных условиях, включая острое воздействие сигаретного дыма, уровень сурфактантных белков может уменьшаться в бронхоальвеолярной лаважной жидкости при одновременном обогащении сыворотки крови этими белками. Статус курения является сильным предиктором такой транслокации [16, 22, 23].

В нашем исследовании обращает на себя внимание сильная обратная связь SP-D с систолическим артериальным давлением в подгруппе некурящих пациентов. В литературе не встречается указаний на связь сурфактантных белков SP-A и SP-D с систолическим и диастолическим артериальным давлением. Известно, что для гипертензивной ангиопатии неотъемлемой частью является сосудистое ремоделирование: сложная структурная и пространственная модификация мелких артерий, в том числе в тканях легких [24–26]. Ремоделирование стенок представляет собой многослойное взаимодействие, включающее гипертрофию, гиперплазию, апоптоз, гиалиноз и фибриноидный некроз гладкомышечных клеток сосудов, а также отложение внеклеточного матрикса [27, 28].

Экспериментально доказана важная роль белков SP-A и SP-D в регуляции апоптоза клеток, дальнейшем поглощении фагоцитами клеточного детрита, а также последующем ремоделировании внеклеточного матрикса. Однако SP-D является более мощным модулятором апоптоза клеток в легких по сравнению с SP-A [29]. Таким образом, при более высоком артериальном давлении происходит не только нарушение альвеолярно-капиллярной проницаемости в легких, но и активное участие SP-D в процессах ремоделирования сосудистой стенки, что может повлиять на снижение уровня этого белка в крови.

В данном исследовании получена обратная связь уровня SP-D в крови с возрастом и не получено корреляций в паре ожирение – SP-D, SP-A. Исследования в этой области единичны и противоречивы. Так, в исследовании G.L. Sorensen и соавт. (2006) возраст наряду с ожирением отмечены как важные детерми-

нанты конституциональных уровней циркулирующего SP-D [12], что объясняется экспериментально продемонстрированной связью между снижением уровня альвеолярного SP-D и повышенным окислительным повреждением ткани легкого [30]. А исследования T. Betsuyaku и соавт. (2004), X.M. Zhao и соавт. (2007) уровня альвеолярного SP-D у человека не показали заметного изменения его уровня с возрастом [31, 32]. Это коррелирует с данными J.I. Moliva (2014), в которых в эксперименте не наблюдалась индукция альвеолярного SP-D во время старения наряду с индукцией цитокинов и окислителей [33].

Таким образом, патогенетически обоснована прямая связь сурфактантных белков SP-A и SP-D в группе курящих пациентов. Белок SP-D более значим в сравнении с SP-A при ремоделировании сосудистой стенки, матрикса ткани легкого, окислительном повреждении ткани легкого и апоптозе, что объясняет его обратную связь с возрастом и систолическим артериальным давлением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень сурфактантных белков SP-A и SP-D в крови у курящих пациентов без бронхолегочных заболеваний достоверно выше в сравнении с некурящими пациентами. Уровень белка SP-A прямо связан с диастолическим артериальным давлением. Уровень белка SP-D имеет обратную связь с возрастом пациента и систолическим артериальным давлением. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, можно ли использовать SP-A и SP-D в качестве маркера для ранней идентификации курильщиков, подверженных риску ХОБЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Global Report on Trends in Prevalence of Tobacco Smoking. Geneva, Switzerland, 2015.
2. Schauer G.L., Wheaton A.G., Malarcher A.M., Croft J.B. Health-care provider screening and advice for smoking cessation among smokers with and without COPD: 2009–2010 National Adult Tobacco Survey. *Chest*. 2016; 149 (3): 676–684. DOI: 10.1378/chest.14-2965.
3. Campos Td. S., Richter K.P., Cupertino A.P. et al. Cigarette smoking among patients with chronic diseases. *Int. J. Cardiol.* 2014; 174 (3): 808–810. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.04.150.
4. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 372–377. DOI: 10.1038/nri803.
5. Stampfli M.R., Anderson G.P. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9 (5): 377–384. DOI: 10.1038/nri2530.
6. Nuorti J.P., Butler J.C., Farley M.M., Harrison L.H., McGeer A., Kolczak M.S., Breiman R.F. Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. *Active Bacterial Core*

- Surveillance Team. N. Engl. J. Med.* 2000; 342 (10): 681–689. DOI: 10.1056/NEJM200003093421002.
7. Zhang M., Shi R., Zhang Y. et al. Nix/BNIP3L-dependent mitophagy accounts for airway epithelial cell injury induced by cigarette smoke. *J. Cell Physiol.* 2019; 234 (8): 1420–1422. DOI: 10.1002/jcp.28117.
 8. Zeglinski M., Turner C., Zeng R. et al. Soluble wood smoke extract promotes barrier dysfunction in alveolar epithelial cells through a MAPK signaling pathway. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 10027. DOI: 10.1038/s41598-019-46400-8.
 9. Dye J.A., Adler K.B. Effects of cigarette smoke on epithelial cells of the respiratory tract. *Thorax.* 1994; 49 (8): 825–834. DOI: 10.1136/thx.49.8.825.
 10. Pastva A.M., Wright J.R., Williams K.L. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2007; 4 (3): 252–257. DOI: 10.1513/pats.200701-018AW.
 11. Mastora I., Remy-Jardin M., Sobaszek A., Boulenguez C., Remy J., Edme J.L. Thin-section CT finding in 250 volunteers: assessment of the relationship of CT findings with smoking history and pulmonary function test results. *Radiology.* 2001; 218 (3): 695–702. DOI: 10.1148/radiology.218.3.r01mr08695.
 12. Sorensen G.L., Hjelmberg J.B., Kyvik K.O., Fenger M., Hoj A., Bendixen C. et al. Genetic and environmental influences of surfactant protein D serum levels. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006; 290 (5): L1010–1017. DOI: 10.1152/ajplung.00487.2005.
 13. Mazur W., Toljamo T., Ohlmeier S., Vuopala K., Nieminen P., Kobayashi H. et al. Elevation of surfactant protein A in plasma and sputum in cigarette smokers. *Eur. Respir. J.* 2011; 38 (2): 277–284. DOI: 10.1183/09031936.00110510.
 14. Behera D., Balamugesh T., Venkateswarlu D., Gupta A., Majumdar S. Serum surfactant protein A levels in chronic bronchitis and its relation to smoking. *Indian J. Chest. Dis. Allied Sci.* 2005; 47 (1): 13–17.
 15. Ilumets H., Mazur W., Toljamo T., Louhelainen N., Nieminen P., Kobayashi H. et al. Ageing and smoking contribute to plasma surfactant proteins and protease imbalance with correlations to airway obstruction. *BMC Pulm. Med.* 2011; 11: 19. DOI: 10.1186/1471-2466-11-19.
 16. Moazed F., Burnham E.L., Vandivier R.W., O’Kane C.M., Shyamsundar M., Hamid U. et al. Cigarette smokers have exaggerated alveolar barrier disruption in response to lipopolysaccharide inhalation. *Thorax.* 2016; 71 (12): 1130–1136. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-207886.
 17. Lone K.P., Nida. Plasma surfactant protein-A levels in apparently healthy smokers, stable and exacerbation COPD patients. *Pak. J. Med. Sci.* 2018; 34 (4): 934–939. DOI: 10.12669/pjms.344.13951.
 18. Hogg J.C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2004; 364 (9435): 709–721. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16900-6.
 19. Hastings R.H., Grady M., Sakuma T., Matthay M.A. Clearance of different-sized proteins from the alveolar space in humans and rabbits. *J. Appl. Physiol.* 1992; 73 (4): 1310–1316. DOI: 10.1152/jappl.1992.73.4.1310.
 20. Gaunsbaek M.Q., Rasmussen K.J., Beers M.F., Atochina-Vasserman E.N., Hansen S. Lung surfactant protein D (SP-D) response and regulation during acute and chronic lung injury. *Lung.* 2013; 191 (3): 295–303. DOI: 10.1007/s00408-013-9452-x.
 21. Hiram N., Shibata Y., Otake K., Machiya J., Wada T., Inoue S. et al. Increased surfactant protein-D and foamy macrophages in smoking-induced mouse emphysema. *Respirology.* 2007; 12 (2): 191–201. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2006.01009.x
 22. Winkler C., Atochina-Vasserman E.N., Holz O., Beers M.F., Erpenbeck V.J., Krug N. et al. Comprehensive characterisation of pulmonary and serum surfactant protein D in COPD. *Respir. Res.* 2011; 12: 29. DOI: 10.1186/1465-9921-12-29.
 23. Moré J., Voelker D., Silveira L., Edwards M., Chan E., Bowler R. Smoking reduces surfactant protein D and phospholipids in patients with and without chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm. Med.* 2010; 10: 53. DOI: 10.1186/1471-2466-10-53.
 24. Gutsol A.A., Blanco P., Samokhina S.I. et al. A novel method for comparison of arterial remodeling in hypertension: quantification of arterial trees and recognition of remodeling patterns on histological sections. *PLoS One.* 2019; 14 (5): e0216734. DOI: 10.1371/journal.pone.0216734.
 25. Rizzoni D., Agabiti-Rosei E. Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern. Emerg. Med.* 2012; 7 (3): 205–212. DOI: 10.1007/s11739-011-0548-0.
 26. Laurent S., Boutouyrie P. The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. *Circ. Res.* 2015; 116 (6): 1007–1021. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303596.
 27. Hill G.S., Heudes D., Jacquot C., Gauthier E., Bariéty J. Morphometric evidence for impairment of renal autoregulation in advanced essential hypertension. *Kidney Int.* 2006; 69 (5): 823–831. DOI: 10.1038/sj.ki.5000163.
 28. Schoen F.J. Robbins basic pathology. In: Kumar V., Abbas A. F.N. (edit.) Pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012: 511–554.
 29. Vandivier R., Ogden C., Fadok V. A., Hoffmann P., Brown K., Botto M., Walport M. J., Fisher J. H., Henson P. M., Greene K. E. (2002). Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells *in vivo* and *in vitro*: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J. Immunol.* 2002; 169 (7): 3978–3986. DOI: 10.4049/jimmunol.169.7.3978.
 30. Umstead T.M., Freeman W.M., Chinchilli V.M., Phelps D.S. Age-related changes in the expression and oxidation of bronchoalveolar lavage proteins in the rat. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2009; 296 (1): L14–29. DOI: 10.1152/ajplung.90366.2008.
 31. Betsuyaku T., Kuroki Y., Nagai K., Nasuhara Y., Nishimura M. Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur. Respir. J.* 2004; 24 (6): 964–970. DOI: 10.1183/09031936.04.00064004.
 32. Zhao X.M., Wu Y.P., Wei R., Cai H.X., Tornøe I., Han J.J. et al. Plasma surfactant protein D levels and the relation to body mass index in a chinese population. *Scand. J. Immunol.* 2007; 66 (1): 71–76. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2007.01943.x.
 33. Moliva J.I., Rajaram M.V., Sidiki S., Sasindran S.J., Guirado E., Pan X.J. et al. Molecular composition of the alveolar lining fluid in the aging lung. *Age (Dordr).* 2014; 36 (3): 9633. DOI: 10.1007/s11357-014-9633-4.

Благодарности

Работа выполнена на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Новосибирской области «Городская клиническая больница № 25», г. Новосибирск, Россия.

Вклад авторов

Харламова О.С. – сбор и обработка материала, статистическая обработка, анализ и интерпретация данных, написание текста. Николаев К.Ю., Воевода М.И. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование. Рагино Ю.И. – концепция и дизайн исследования, получение данных для анализа, анализ и интерпретация данных, редактирование.

Сведения об авторах

Харламова Ольга Сергеевна, аспирант, мл. науч. сотрудник, лаборатория неотложной терапии, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0001-8788-685X.

Николаев Константин Юрьевич, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией неотложной терапии, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0003-4601-6203.

Рагино Юлия Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, врио руководителя НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-4936-8362.

Воевода Михаил Иванович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, руководитель научного направления фундаментальных и клинических исследований, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0001-9425-413X.

(✉) **Харламова Ольга Сергеевна**, e-mail: olga.kharlamova2016@yandex.ru.

Поступила в редакцию 06.09.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Активность воспалительного процесса и маркеры деструкции внеклеточного матрикса при туберкулезе легких

Эсмедляева Д.С.¹, Алексеева Н.П.^{1,2,3}, Новицкая Т.А.^{1,3,4}, Дьякова М.Е.¹,
Ариэль Б.М.¹, Григорьев И.В.³, Соколов Е.Г.^{1,3}

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии (СПб НИИФ)
Россия, 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2-4

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

³ Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ)
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

⁴ Северо-Западный государственный медицинский университет (СЗГМУ) имени И.И. Мечникова
Россия, 195015, г. Санкт-Петербург, Кирочная ул., 41

РЕЗЮМЕ

Цель. Сопоставить уровень маркеров деструкции внеклеточного матрикса (ВКМ) в периферической крови с морфологическими характеристиками активности воспалительного процесса и определить возможность их использования при выборе тактики лечения больных с туберкулезом легких (ТУБ).

Материалы и методы. В периферической крови 87 больных (55 мужчин и 32 женщины) с верифицированным диагнозом ТУБ иммуноферментным методом определяли концентрацию коллагеназ (матриксные металлопротеиназы (ММП) 1, 8), стромелизина (ММП-3), желатиназы (ММП-9), тканевого ингибитора ММП-1 (ТИМП-1) с использованием наборов R&D Systems (США); энзиматически – активность нейтрофильной эластазы (НЭ), протеиназного ингибитора (ПИ) и α 2-макроглобулина (МГ); иммунотурбодиметрически – концентрацию реактанты острой фазы воспаления (РОФ): гаптоглобина (ГП), α 1-кислого гликопротеина (АГП) с использованием наборов Termo Fisher Scientific (США). Применяли пакет программ Statistica 7.0 и метод проективной классификации.

Результаты. Установлено, что ТУБ как клиническая форма туберкулеза легких характеризуется нарушением баланса ММП и НЭ с ингибиторами: повышением уровня ММП-1, -8, -9, НЭ и снижением МГ при отсутствии изменений ММП-3, ТИМП-1 и ПИ. Показано соответствие маркеров деструкции ВКМ в крови морфологическим характеристикам активности процесса. Информативными показателями для оценки альтернативного компонента воспаления (наличия казеоза в центре ТУБ) и его продуктивного компонента (гранулематозных изменений в капсуле) является как сочетание ММП-1 с МГ, так и ММП-8 с МГ. Различные комбинации показателей маркеров деструкции ВКМ (в сочетании с реактантами острой фазы воспаления или без) дают возможность прогнозировать ту или иную морфологическую картину с точностью 80–92%.

Заключение. При выборе тактики лечения больных с ТУБ следует принимать во внимание биохимические данные с их оценкой активности воспалительного процесса наряду с комплексом клинико-рентгенологических характеристик.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, матриксные металлопротеиназы, ингибиторы протеиназ, туберкулема легких.

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

✉ Эсмедляева Дилара Салиевна, e-mail: diljara-e@yandex.ru.

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

Соответствие принципам этики. Исследования выполнены с информированного согласия пациентов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СПб НИИФ.

Для цитирования: Эсмедляева Д.С., Алексеева Н.П., Новицкая Т.А., Дьякова М.Е., Ариэль Б.М., Григорьев И.В., Соколович Е.Г. Активность воспалительного процесса и маркеры деструкции внеклеточного матрикса при туберкулезе легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 112–119. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-112-119>.

Inflammatory activity and markers of extracellular matrix destruction in pulmonary tuberculoma

Esmedlyeva D.S.¹, Alekseeva N.P.^{1,2,3}, Novitskaya T.A.^{1,3,4}, Dyakova M.Ye.¹, Ariel I.V.¹, Grigoriev B.M.³, Sokolovich E.G.^{1,3}

¹ Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology
2–4, Ligovsky Av., Saint-Petersburg, 191036, Russian Federation

² Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University
6–8, L'va Tolstogo Str., Saint-Petersburg, 197022, Russian Federation

³ Saint-Petersburg State University
7/9, Universitetskaya Emb., Saint-Petersburg, 199034, Russian Federation

⁴ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
41, Kirochnaya Str., Saint-Petersburg, 195015, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To correlate the concentration of markers of extracellular matrix (ECM) destruction in peripheral blood with morphological characteristics of inflammatory activity and to evaluate their applicability in determining treatment strategy for patients with pulmonary tuberculoma (TUB).

Materials and methods. Peripheral blood samples were taken from 87 patients diagnosed with TUB. The concentrations of matrix metalloproteinases (MMPs), such as collagenases (MMP-1 and MMP-8), stromelysin (MMP-3), gelatinase (MMP-9), and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1), were measured using the ELISA method (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The activity of α_2 -macroglobulin (MG), neutrophil elastase (NE) and proteinase inhibitor (PI) were measured using enzyme assays; acute phase reactants (APR) – haptoglobin (GP) and α_1 -acid glycoprotein (AGP) – were measured using immunoturbidimetric assays (Thermo Fisher Scientific, USA). Statistica 7 software package and the predictive classification method (PCM) were employed for data analysis.

Results. It has been established that TUB as a clinical form of pulmonary tuberculosis (TB) is characterised by enzyme imbalance between MMP, NE and their inhibitors, namely, by an increase in the levels of MMP-1, MMP-8, MMP-9, and NE and a decrease in MG without changes in MMP-3, TIMP-1 and PI. There is a clear correlation between markers of ECM destruction in blood and morphological characteristics of inflammatory activity. The combinations of MMP-1 and MG can serve as a diagnostic criterion for caseous necrosis in the TUB centre (the alterative component of inflammation), while the levels of MMP-8 and MG can be indicative of granulomatous changes in the capsule (the productive component of inflammation). Various combinations of markers of ECM destruction (with or without APR) enable to predict a particular morphological pattern with accuracy from 80% up to 92%.

Conclusion. When determining a treatment strategy for patients with TUB, biochemical data which allow to assess the tempo and intensity of the inflammation process should be taken into account along with a dataset of clinical and radiological features.

Key words: extracellular matrix, matrix metalloproteinases, proteinase inhibitors, pulmonary tuberculoma.

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

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

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at St. Petersburg Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology.

For citation: Esmedlyeva D.S., Alekseeva N.P., Novitskaya T.A., Dyakova M.Ye., Ariel I.V., Grigoriev B.M., Sokolovich E.G. Inflammatory activity and markers of extracellular matrix destruction in pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 112–119. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-112-119>.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск различных маркеров для диагностики и оценки эффективности терапии различных патологических состояний не теряет актуальности. Сложность задачи связана с тем, что большинство из маркеров, обладая высокой чувствительностью, недостаточно специфичны, определяя тем самым перспективность выделения их совокупности для обеспечения более точного прогноза [1]. Одним из методов оценки интенсивности воспалительно-деструктивного процесса на современном уровне развития лабораторной диагностики является оценка активности различных классов протеиназ крови – сериновых, цистеиновых, аспартатных и матриксных металлопротеиназ (ММП), последние из которых подразделяют на несколько групп в соответствии с субстратной специфичностью, а именно на коллагеназы, желатиназы, стромелизины и др. [2].

Белки класса ММП играют двойную роль в патогенезе воспаления, вызывая разрушение всех компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), а также участвуя в иммунных реакциях. Конечный эффект действия протеолитической системы зависит от соотношения протеиназ и их ингибиторов. Источниками ММП могут быть нейтрофилы, моноциты, макрофаги, фибробласты и клетки эпителия. На посттрансляционном уровне в активации проферментов участвуют сериновые протеиназы, а в ограничении их активности – тканевые ингибиторы металлопротеиназ ТИМП-1, -4 и α_2 -макроглобулин (МГ) [3]. Патоген *M. tuberculosis* (МБТ) регулирует ММП на уровне экспрессии генов наряду с фактором некроза опухоли α и интерлейкином-1 [4].

Сопоставление морфологических характеристик активности процесса с функционально-метаболическими особенностями фагоцитов при различных формах туберкулеза легких (ТЛ) проводилось в единичных работах [5], тогда как их сопоставление с маркерами деструкции ВКМ в литературе отсутствуют.

Туберкулема легких (ТУБ) – клиническая форма вторичного туберкулеза легких, представляет собой

казеозно-некротическое образование диаметром более 12 мм, ограниченное от прилежащей легочной ткани фиброзной капсулой, в которой иногда видны единичные клетки Лангханса, а также эпителиоидно-клеточные бугорки (при активно прогрессирующем процессе), характеризуется торпидным течением [6]. Согласно «Национальным клиническим рекомендациям», хирургическое лечение ТУБ показано при отсутствии эффекта проведенной в течение 4–6 мес химиотерапии в ходе динамического наблюдения [7]. Отсутствие клинико-рентгенологических признаков активности не исключает наличия ее морфологического проявления. Морфологические особенности ТУБ в последние годы стали особенно хорошо известны, поскольку именно при наличии этого образования больные подлежат хирургическому лечению, а резецированные участки легочной ткани подвергаются тщательному патологоанатомическому исследованию [8].

Цель исследования состояла в сопоставлении изменений показателей деструкции ВКМ (активности ММП и сериновой протеиназы) в периферической крови с морфологическими характеристиками воспалительного процесса для возможности их использования в качестве дополнительного критерия при выборе тактики лечения больных с ТУБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 87 больных (55 мужчин и 32 женщины) с верифицированным диагнозом ТУБ по данным морфологических исследований, находившихся на лечении в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте фтизиопульмонологии, которым было показано хирургическое лечение (2011–2017 гг.), средний возраст пациентов составил $(35,3 \pm 1,2)$ лет. Контрольную группу составили 20 практически здоровых доноров с сопоставимыми по полу и возрасту характеристиками. В большинстве случаев ТУБ сформировалась в ходе инволюции инфильтративного ТЛ (95%) в условиях химиотерапии до 1,5 лет. По данным компьютерной томографии органов грудной по-

лости, верхнедолевое, нижнедолевое и двустороннее расположение ТУБ было установлено в 70,2; 17,2 и 12,5% случаях соответственно. ТУБ размером от 1–2, 2–4 и более 4 см встречались в 57,14; 28,51 и 14,35% случаях соответственно. В 34,9% случаев при бактериологическом исследовании мокроты выявлялись МБТ (до лечения). В основном это были штаммы с множественной лекарственной устойчивостью, что характерно для современного туберкулеза, какой бы ни была его клинико-анатомическая форма [9].

Биохимические исследования проводили в сроки не более чем за 7 сут до операции. Методом твердофазного иммуоферментного анализа в сыворотке крови определяли концентрацию представителей трех подсемейств ММП – коллагеназ ММП-1, -8, желатиназы ММП-9, стромелизина ММП-3 и их ингибитора ТИМП-1 с использованием наборов реагентов R&D Systems (США). Иммуотурбодиметрически определяли концентрацию реагентов острой фазы воспаления (РОФ): гаптоглобина (ГП) и α_1 -кислого гликопротеина (АГП) с использованием наборов фирмы Termo Fisher Scientific (США) согласно протоколам производителя. Энзиматическими методами оценивали активность сериновой протеиназы – нейтрофильной эластазы (НЭ) [10], протеиназного ингибитора (ПИ) и МГ [11].

Все ТУБ имели морфологические особенности казеом (табл. 1). Оценка активности воспалительного процесса проводилась согласно классификации Б.М. Ариэля (1998) [6] на основе соотношения состояния казеозных масс, капсулы и окружающей легочной ткани.

Таблица 1

Морфологическая характеристика воспалительного процесса ТУБ	
Показатель	Частота встречаемости, абс. (n), %
Число туберкулем:	
– единичная;	35 (40,2)
– множественные;	41(47,0)
– конгломератная	11(12,8)
Характер казеозных масс:	
– без расплавления;	23 (26,8)
– с расплавлением	64 (73,2)
Структура капсулы:	
– однослойная;	34 (39)
– двухслойная	53 (61)
Степень активности:	
– 2;	23 (26)
– 3;	52 (45)
– 4;	24 (27,5)
– 5	1 (1,5)

Для статистического анализа данных использовали пакет прикладных программ Statistica 7.0.

Качественные признаки представлялись в виде абсолютной и относительной величины n (%). Метрические показатели представлялись в виде медианы и интерквартильного размаха (25%; 75%) $Me [Q_1; Q_3]$. Для ряда метрических показателей применялось преобразование данных, уменьшающее асимметрию распределений в виде логарифмического шкалирования $\log_2(x + 1) MeL$. Проверка значимости взаимосвязи между качественными переменными проводилась при помощи точного критерия Фишера. Проверка гипотез однородности по двум и нескольким выборкам осуществлялась по U -критериям Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса соответственно. При корреляционном анализе метрических величин использовали ранговый коэффициент Спирмена. Различия показателей считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Задача объективной оценки той или иной морфологической картины решалась на основе анализа совокупности маркеров деструкции ВКМ при помощи метода проективной классификации (МПК) с базовым алгоритмом дискриминантного анализа, преимуществом которого является возможность анализа вне зависимости от полноты представленных данных [12]. В отличие от стандартного дискриминантного анализа, при котором вычисляется общая дискриминантная функция (ДФ) по всем показателям одновременно, в МПК выделяется комплекс коррелирующих между собой значимых ДФ, построенных по разнообразным подмножествам маркеров. За счет небольшого количества маркеров, составляющих ДФ, они легче поддаются интерпретации и позволяют с разных сторон рассмотреть многообразие биохимических проявлений изучаемого процесса. По весам (условные единицы измерения) ДФ можно определить, какие из маркеров вносили наибольший вклад в разделение индивидов. В случае положительных значений ДФ пациентов следует отнести к группе с менее тяжелым проявлением процесса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ТУБ как клиническая форма ТЛ характеризовалась умеренным повышением в крови концентрации коллагеназ ММП-1, -8, значительным увеличением желатиназы ММП-9 и сохранением стромелизина ММП-3 как и ингибитора ТИМП-1 на контрольном уровне. Это сопровождалось снижением активности другого ингибитора ММП – МГ. Установлено статистически достоверное увеличение активности сериновой протеиназы НЭ без повышения активности ее ингибитора (ПИ) (табл. 2).

Обнаружена прямая связь концентрации ММП-9 с ММП-8 ($r = 0,44$; $p \leq 0,014$) и активностью НЭ

($r = 0,234$; $p \leq 0,05$), а также между уровнями ТИМП-1 с ММП-9 ($r = 0,31$; $p \leq 0,009$).

Таблица 2

Уровень анализируемых параметров в периферической крови пациентов с ТУБ, Me [Q ₁ ; Q ₃]		
Маркер	Пациенты с ТУБ, n = 87	Контрольная группа, n = 20
ММП-1, нг/мл	1,74 [1,31; 2,30] $p = 0,002^*$	1,17 [0,89; 1,72]
ММП-8, нг/мл	3,27 [2,64; 3,94] $p = 0,003^*$	2,58 [2,22; 2,70]
ММП-9, нг/мл	1638,00 [950,80; 2557,69] $p = 0,00004^*$	71,99 [51,33; 73,94]
ММП-3, нг/мл	1,55 [1,07; 2,16]	1,87 [1,57; 2,07]
ТИМП-1, нг/мл	6,72 [6,58; 6,89]	6,66 [6,55; 6,80]
МГ, МЕ	1,70 [1,40; 2,16] $p = 0,00003^*$	3,00 [2,46; 3,28]
НЭ, МЕ	195,60 [173,90; 217,30] $p = 0,0002^*$	163,00 [152,10; 173,90]
ПИ, МЕ	1,82 [1,27; 2,17]	1,20 [0,91; 1,31]
ГП, г/л	1,56 [1,08; 2,14] $p = 0,01^*$	1,04 [0,90; 1,10]
АГП, г/л	1,10 [0,86; 1,69]	0,96 [0,88; 1,08]

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: ТУБ – туберкулема легких, ММП – матриксные металлопротеиназы, ТИМП-1 – тканевый ингибитор ММП-1, МГ – α_2 -макроглобулин, НЭ – нейтрофильная эластаза, ПИ – протеиназный ингибитор, ГП – гаптоглобин, АГП – α_1 -кислый гликопротеин (орозомукоид).

* уровень статистической значимости различий по сравнению с контрольной группой (U-критерий Манна – Уитни).

Учитывая способность НЭ выступать в крови активатором профермента ММП, можно предположить, что отсутствие изменений ее главного ингибитора ПИ косвенно способствовало

росту ММП-1, с которым у последней была установлена отрицательная взаимосвязь ($r = -0,46$; $p \leq 0,004$) [13]. По мере увеличения размеров ТУБ наблюдалось усиление протеолитических процессов, судя по значимым различиям в росте концентрации ММП-1, -8 и снижению ТИМП-1 в крови. Отсюда следует, что деградация ВКМ при формировании ТУБ связана с нарушением баланса между протеиназами и ингибиторами, а именно с превалированием уровня двух классов протеиназ ММП и НЭ, что согласуется с данными литературы о способности микобактериальной инфекции к усилению экспрессии и секреции ММП, а не ТИМП-1 [14].

Статистический анализ показал, что ни пол (критерий Фишера), ни возраст, ни длительность химиотерапии (критерий Краскела – Уоллиса) не определяли активность воспалительного процесса ТУБ в морфологическом понимании: все значимости по критериям были больше 0,70. В то же время анализ взаимосвязи биохимических показателей деструкции с морфологическими характеристиками активности процесса выявил ассоциации с изменениями представителей различных ММП (табл. 3). При наличии признаков расплавления величины ММП-1 и МГ были выше (хотя последний в обоих случаях был ниже контрольного уровня), чем без него. Полученные результаты являются вполне закономерными, поскольку центр гранулемы, представленный казеозными массами, формируется из разрушенных макрофагов, погибающих при контакте с МБТ с высвобождением протеиназ. По данным А. Kubler (2015), нарушение равновесия в системе протеазы (антипротеазы) свидетельствует о ведущей роли ММП-1 в формировании казеозного центра [15].

Таблица 3

Уровень анализируемых параметров в периферической крови пациентов в зависимости от морфологических характеристик активности процесса при ТУБ, Me [Q ₁ ; Q ₃]				
Маркер	Наличие признаков расплавления		Характеристика капсулы	
	нет, n = 23	есть, n = 64	однослойная, n = 34	двухслойная, n = 53
ММП-1, нг/мл	1,59 [1,10; 1,83]	1,96 [1,48; 2,46] $p = 0,04^*$	1,82 [1,57; 2,40]	1,78 [1,26; 2,69]
ММП-8, нг/мл	3,28 [2,87; 3,87]	2,96 [2,46; 3,52]	2,84 [2,62; 3,26]	3,37 [2,92; 3,73] $p = 0,02^*$
ММП-9, нг/мл	1575,63 [916,30; 2195,86]	2060,67 [913,68; 2988,27]	1647,07 [936,91; 2228,03]	1623,43 [916,29; 2253,56]
ММП-3, нг/мл	1,56 [1,10; 1,84]	1,50 [0,86; 2,13]	1,41 [0,87; 1,77]	1,64 [1,07; 2,14]
ТИМП-1, нг/мл	6,70 [6,60; 6,86]	6,66 [6,57; 6,86]	6,79 [6,65; 6,82]	6,64 [6,65; 6,93]
МГ, МЕ	1,84 [1,40; 2,12]	2,20 [1,36; 3,09] $p = 0,04^*$	1,82 [1,6; 2,22]	2,11 [1,44; 2,72] $p = 0,04^*$
НЭ, МЕ	197,33 [173,90; 217,30]	205,68 [162,90; 241,83]	196,61 [179,30; 217,30]	201,02 [168,43; 225,47]
ПИ, МЕ	1,69 [1,27; 2,15]	1,80 [1,55; 2,09]	1,63 [1,45; 1,84]	1,66 [1,22; 2,15]

* уровень статистической значимости различий между группами сравнения (U-критерий Манна – Уитни).

Известно, что формирование двухслойной капсулы, состоящей из коллагеновых волокон (в наружном слое) и грануляционной ткани с макрофагами, эпителиоидными клетками, клетками Лангханса (во внутреннем слое), наблюдается при переходе от стабилизации к прогрессированию. Было установлено, что наличие двухслойной капсулы влияло на более выраженный рост уровня ММП-8 в сочетании с МГ, чего не наблюдалось при наличии однослойной фиброзной капсулы, согласуясь с литературными данными об увеличении количества гранулоцитов и усилении их фагоцитарной активности при активных ТУБ [5].

Аналогичным образом при большей остроте воспалительного процесса (4–5-й степени активности) в отличие от умеренной (3-й степени активности) и наименьшей остроты (2-й степени активности) установлено повышение уровней ММП-1 ($p = 0,03$), ММП-9 ($p = 0,04$) и снижение активности МГ ($p = 0,003$). Наряду с этим значения ММП-3, ТИМП-1 и ПИ не выходили за рамки референтного размаха, значения НЭ были его выше независимо от активности воспалительного процесса и составляющих ее характеристик в морфологическом понимании (критерий Краскела – Уоллиса).

Следовательно, прогрессирование воспалительного процесса находит свое отражение в более выраженном нарушении баланса в системе протеиназы/ингибиторы, что согласуется с литературными данными [16], причем это справедливо в отношении всех больных, имеющих хотя бы один очаг типа ТУБ. Иными словами, число ТУБ в этом случае не играет роли.

Для возможности классификации пациентов по степени активности использовали МПК на основе восьми маркеров деструкции ВКМ. Для более полной оценки в анализ были включены данные о состоянии таких полифункциональных белков РОФ, как ГП (одна из функций активация про-ММП-1) и АГП (способствует фиброгенезу) (см. табл. 2). В качестве итоговых показателей МПК по разным степеням активности процесса было получено 32 ДФ, отделяющих пациентов с наименьшей 2-й степенью (ДФ1) или наибольшей 4–5-й (ДФ2) от всех остальных с точностью классификации 80–92% (табл. 4).

Учитывая высокую взаимную корреляционную зависимость всех ДФ между собой, обусловленную самим методом их построения, можно ограничиться интерпретацией только некоторых из них. Согласно полученным данным (см. табл. 4), отделение пациентов с наименьшей остротой процесса (2-я степень активности) от остальных (3–5-я степень активности) связано с нейтрофильными характеристиками

(ДФ1). Такая функция характеризуется более низкими значениями нейтрофильной коллагеназы (ММП-8), маркером дегрануляции нейтрофилов (НЭ) в сочетании с высоким уровнем ингибитора последней, судя по различиям в знаках между протеиназой и ПИ. Если же рассматривать воспалительный процесс с точки зрения перехода от умеренно активной (2–3-я степень) к активной фазе (4–5-я степень) (ДФ2), то в этом случае наибольшее значение приобретает комбинация уровней одной из коллагеназ (ММП-1) со стромелизином, что соответствует литературным данным об определяющей роли соотношения ММП-3/ТИМП-1 в разрушении ВКМ [17].

Таблица 4

Наиболее информативные комбинации анализируемых параметров, определяющие точность оценки морфологической активности процесса при ТУБ			
Показатель	Наиболее информативные комбинации параметров и их веса	Степень морфологической активности	Точность оценки, %
ДФ1	ММП-8 (1,13), НЭ (0,02), ПИ (-1,03), ММП-8 (1,34), МГ(114), АГП (-1,29)	2/3–5	86
		2/3–5	83
ДФ2	ММП-1 (0,55), ММП-3 (0,089), МГ(-1,53)	2–3/4–5	92

Использование МПК для оценки морфологической активности процесса достаточно четко позволило идентифицировать области, характерные для пациентов со 2-й и 4–5-й степенями активности. Наибольшую сложность представляла классификация пациентов с 3-й степенью активности. Эти пациенты могут иметь тенденцию к развитию в ту или иную сторону, что свидетельствует не столько об ограничениях метода, сколько является следствием неизбежного при математическом моделировании упрощения полиморфной картины воспалительного процесса. Для более четкой классификации, по-видимому, недостаточно основываться только на двух характеристиках (характер казеозных масс и состояние капсулы), а требуется проведение анализа на большем материале с включением в него таких характеристик, как наличие отсеков в окружающую легочную ткань, поражение бронхов и регионарных лимфоузлов.

На примере ТУБ показана перспективность применения МПК для оценки активности воспалительного процесса по сочетаниям трех показателей деструкции ВКМ (в сочетании или без РОФ) с точностью 80–92%. Предложенный метод позволяет глубже понять многообразие биохимических проявлений тканевых и клеточных механизмов

прогрессирования воспалительного процесса. Отсутствие достоверных различий большинства показателей деструкции ВКМ при их изолированной оценке в зависимости от морфологических характеристик не исключает значимости их вклада в формирование различной морфологической картины.

Нельзя не отметить в заключение, что при выборе тактики лечения больных с ТУБ следует принимать во внимание и биохимические данные с их оценкой активности воспалительного процесса наряду с комплексом клиничко-рентгенологических характеристик.

ВЫВОДЫ

1. Для ТУБ как клинической формы вторичного ТЛ характерно увеличение уровня протеиназ различных классов в периферической крови, способствующее смещению баланса в системе протеиназы (ингибиторы) в сторону протеиназ. Отмечается повышение концентрации коллагеназ ММП-1, -8, желатиназы ММП-9 на фоне сохранения контрольного уровня стромелизина ММП-3 и ТИМП-1 в сочетании с низкой активностью МГ и некомпенсированным повышением активности НЭ.

2. Показано соответствие маркеров деструкции ВКМ в периферической крови морфологическим характеристикам активности процесса. Информативными показателями для оценки альтернативного компонента воспаления (наличия казеоза в центре ТУБ) и его продуктивного компонента (гранулематозных изменений в капсуле) являются сочетание ММП-1, ММП-8 с МГ соответственно.

3. На примере ТУБ показана перспективность применения МПК для оценки той или иной морфологической картины по ряду различных сочетаний трех маркеров деструкции ВКМ (в сочетании с РОФ или без) периферической крови с точностью 80–92%. Показана возможность их использования в качестве дополнительного критерия при выборе тактики лечения больных с ТУБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Титова О.Н., Кузубова З.А., Лебедева Е.С. Биомаркеры прогноза тяжести течения и исхода внебольничной пневмонии. *Медальянс*. 2018; 2: 55–60.
2. De Groote M.A., Nahid P., Jarlsberg L., Johnson J.L., Weiner M., Muzanyi G., Janjic N., Sterling D.G., Ochsner U.A. Elucidating novel serum biomarkers associated with pulmonary tuberculosis treatment. *PLoS One*. 2013; 8 (4): e61002. DOI: 10.1371/journal.pone.0061002.
3. Apte S.S., Park W.C. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol*. 2015; 44–46: 1–6. DOI:10.1016/j.matbio.2015.04.005.
4. Ong C.W., Elkington P.T., Friedland J.S. Tuberculosis, pulmonary cavitation and matrix metalloproteinases. *Am. J. Resp. Crit. Care*. 2014; 190 (1): 9–18. DOI: 10.1164/accm.201311-2106PP.
5. Бердюгина О.В., Ершова А.В. Иммунологические реакции у больных с туберкулезом легкого в разных фазах активности. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11 (20): 363–365.
6. Ариэль Б.М., Ковальский Г.Б., Осташко О.М., Шацлло О.И. Макро- и микроскопическая диагностика туберкулеза, его осложнений, исходов и причин смерти: пособие для врачей. СПб., 1998: 53.
7. Национальные клинические рекомендации по применению хирургических методов в лечении туберкулеза легких. Торакальная хирургия; под ред. П.К. Яблонского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014: 160.
8. Холодок О.А., Григоренко А.А., Черемкин М.И. Туберкулема легкого как форма туберкулезного процесса. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2014; 53: 126–131.
9. Павлова М.В., Ершова Е.С., Виноградова Т.И., Сапожникова Н.В., Заболотных Н.В., Гришко А.Н. Современные тенденции в лечении лекарственно-устойчивого туберкулеза. *Медальянс*. 2017; 4: 23–29.
10. Visser L., Blout E.R. The use of p-nitrophenyl N-tert-butylloxycarbonyl-L-alanine as substrate for elastase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1972; 268 (1): 257–260. DOI: 10.1016/0005-2744(72)90223-9.
11. Веремеенко К.Н., Голобородко, Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. Киев: Здоровья, 1988: 198.
12. Алексеева Н.П., Горлова И.А., Бондаренко Б.Б. Возможности прогнозирования возникновения артериальной гипертензии на основе метода проективной классификации. *Артериальная гипертензия*. 2017; 23 (5): 472–480. DOI: 10.18705/1607-419X-2017-23-5-472-480.
13. Liu Z., Zhou X., Shapiro S.D., Shipley J.M., Twining S.S., Diaz L.A., Senior R.M., Werb The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 *in vivo*. *Cell*. 2000; 1; 102 (5): 647–655. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00087-8.
14. Quiding-Järbrink M., Smith D.A., Bancroft G.J. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect. Immun*. 2001; 69 (9): 5661–5670. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5661-5670.2001.
15. Kubler A., Luna B., Larsson C., Ammerman N.C., Andrade B.B., Orandle M., Bock K.W., Xu Z., Bagci U., Molura D.J., Marshall J., Burns J., Winglee K., Ahidjo B.A., Cheung L.S., Klunk M., Jain S.K., Kumar N.P., Babu S., Sher A., Friedland J.S., Elkington P.T., Bishai W.R. Mycobacterium tuberculosis dysregulates MMP/TIMP balance to drive rapid cavitation and unrestrained bacterial proliferation. *J. Pathol*. 2015; 235 (3): 431–444. DOI: 10.1002/path.4432.
16. Ong C.W., Elkington P.T., Brilha S., Ugarte-Gil C., Tome-Esteban M.T., Tezera L.B., Pabisiak P.J., Moores R.C., Sathya-moorthy T., Patel V., Gilman R.H., Porter J.C., Friedland J.S. Neutrophil-derived MMP-8 drives AMPK-dependent matrix destruction in human pulmonary tuberculosis. *PLoS Pathog*. 2015; 11 (5): e1004917. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004917.
17. Nissinen L., Kähäri V.M. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014; 1840 (8): 2571–2580. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.03.007.

Вклад авторов

Эсмедляева Д.С. – разработка концепции и дизайна статьи, пробоподготовка, сбор материала, выполнение биохимического раздела исследований, анализ литературы, анализ и интерпретация данных, написание и оформление текста рукописи. Алексева Н.П. – статистическая обработка результатов, участие в написании текста рукописи. Новицкая Т.А. – выполнение морфологического раздела исследований. Дьякова М.Е. – выполнение биохимического раздела исследования. Ариэль Б.М. – интерпретация результатов, участие в написании текста рукописи. Григорьев И.В. – перевод статьи, участие в формировании концепции статьи. Соколов Е.Г. – участие в формировании концепции статьи, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Эсмедляева Диляра Салиевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, СПб НИИФ, г. Санкт-Петербург. ORCID 0000-0002-9841-0061.

Алексеева Нина Петровна, канд. физ.-мат. наук, науч. консультант, СПб НИИФ; зав. лабораторией биомедицинской статистики института фармакологии им. А.В. Вальдмана, Первый СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; доцент, кафедра статистического моделирования, СПбГУ, г. Санкт-Петербург.

Новицкая Татьяна Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, СПб НИИФ; доцент, кафедра патологии, СПбГУ; доцент, кафедра патологической анатомии, СЗГМУ им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург. ORCID :0000-0001-5137-5126 HTA.

Дьякова Марина Евгеньевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, СПб НИИФ, г. Санкт-Петербург. ORCID 0000-0002-7810-880X.

Ариэль Борис Михайлович, д-р мед. наук, профессор, науч. консультант, СПб НИИФ, г. Санкт-Петербург.

Григорьев Иван Вадимович, канд. искусствоведения, доцент, зав. кафедрой английского языка и филологии, СПбГУ, г. Санкт-Петербург. ORCID 0000-0001-9865-0199.

Соколов Евгений Георгиевич, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе, СПб НИИФ; кафедра госпитальной хирургии, СПбГУ, г. Санкт-Петербург. ORCID 0000-0003-4794-0588.

(✉) Эсмедляева Диляра Салиевна, e-mail: diljara-e@yandex.ru.

Поступила в редакцию 19.03.2019

Подписана в печать 25.12.2019

УДК 616.126-002-022.7-097

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-120-131>

Роль комплекса IL-33/ST2 в модуляции иммунного ответа при инфекционном эндокардите (обзор литературы)

Асанов М.А.^{1,2}, Понасенко А.В.¹

¹ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ) Россия, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

² Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН (ФИЦ УУХ СО РАН) Россия, 650000, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10

РЕЗЮМЕ

Процесс воспаления, который сопровождает немалое количество патологических состояний организма, является одним из формирующих комплекс симптомов инфекционного эндокардита факторов. Компоненты иммунной системы, участвующие в воспалительном ответе, могут являться маркерами, определяющими развитие и прогноз заболевания, а также могут быть потенциальными терапевтическими мишенями. К таким компонентам относятся цитокины IL-33, sST2 и рецепторный комплекс IL-33/ST2, принимающие активное участие в модулировании воспалительной реакции. На настоящий момент роль этих биологически активных молекул достаточно хорошо описана для различных патологий, связанных с деструкцией тканей, в том числе и при сердечно-сосудистых заболеваниях, но не для патогенеза инфекционного эндокардита.

Данный обзор направлен на анализ имеющейся информации о патогенезе инфекционного эндокардита, роли IL-33 и ST2 в формировании воспалительного ответа при различных патологических процессах и экспрессии генов, кодирующих эти белки под воздействием различных факторов.

Ключевые слова: IL-33, ST2, интерлейкин, инфекционный эндокардит, сердечно-сосудистые заболевания, секреция белка, экспрессия гена.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Для цитирования: Асанов М.А., Понасенко А.В. Роль комплекса IL-33/ST2 в модуляции иммунного ответа при инфекционном эндокардите (обзор литературы). *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 120–131. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-120-131>.

The role of IL-33/ST2 system in the modulation of the immune response in infective endocarditis (a literature review)

Asanov M.A.^{1,2}, Ponasenko A.V.¹

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
6, Sosnovy Blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

² The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of SB RAS
10, Leningradsky Av., Kemerovo, 650000, Russian Federation

ABSTRACT

An inflammatory process accompanied by a considerable number of pathological conditions in the body is one of the symptoms of infective endocarditis. The components of the immune system involved in the inflammatory response may serve as markers determining the development and prognosis of the disease and as potential therapeutic targets. These components include cytokines IL-33, sST2, and the IL-33/ST2 system, which are actively involved in the modulation of the inflammatory response. At present, the role of these biologically active molecules is well described for various pathologies associated with tissue destruction, including cardiovascular diseases, but not for the pathogenesis of infective endocarditis. This review is aimed at analyzing the available information on the pathogenesis of infective endocarditis, the role of IL-33 and ST2 in the formation of the inflammatory response in various pathological processes, and changes in the expression of the genes encoding these proteins under the influence of various factors.

Key words: IL-33, ST2, interleukin, infective endocarditis, cardiovascular diseases, protein secretion, gene expression.

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

Source of financing. This work was supported by the comprehensive program of basic research of the SB RAS within the framework of the fundamental theme of the Research Institute of the Communist Party of the Soviet Socialist Republic No. 0546-2015-0011 “Pathogenetic substantiation of the development of implants for cardiovascular surgery based on biocompatible materials, with the implementation of a patient-oriented approach using mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors».

For citation: Asanov M.A., Ponasenko A.V. The role of IL-33/ST2 system in the modulation of the immune response in infective endocarditis (a literature review). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 120–131. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-120-131>.

ВВЕДЕНИЕ

Заболееваемость инфекционным эндокардитом (ИЭ) даже в экономически благополучных странах Западной Европы и США варьирует от 25 до 93 на 1 млн населения, и летальность от этого заболевания остается высокой – от 18 до 36% (по разным источникам) [1]. В Российской Федерации заболеваемость ИЭ составляет 3–10 случаев на 100 тыс. человек в год [2]. Несомненно, что ИЭ является гетерогенным заболеванием, характеризующимся широким спектром клинических проявлений, которые зависят как от этиологического агента, так и комплекса предрасполагающих факторов.

Основываясь на представлении об ИЭ как о системном заболевании, тяжесть которого в значитель-

ной степени определяется иммунопатологическими процессами, связанными с инвазией и элиминацией возбудителя, первоочередная задача при определении путей профилактики лежит в поиске ключевых иммунологических факторов, определяющих резистентность организма к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Компоненты иммунной системы, такие как цитокины, иммуноглобулины, компоненты комплемента и другие, являются активными участниками воспалительного ответа, индуцированного внедрением микробного агента. Ключевым путем инициации воспалительного ответа является активация NFκB- и MAPK-сигнальных путей, значимое участие в которой принимают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) микроорганизмов и некоторые цитокины (например, фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и интерлейкин (IL) 1).

Мы предполагаем, что одним из модификаторов риска развития ИЭ может служить трансмембранный рецептор ST2L (suppression of tumorigenicity 2 ligand). Белок ST2L является членом суперсемейства Toll/интерлейкин-1 – высококонсервативных внутриклеточных сигнальных доменов. Представители этого семейства инициируют врожденный иммунитет посредством активации транскрипционного фактора NF-каппа В (NF κ B), что приводит к образованию провоспалительных цитокинов. Однако установлено, что ST2L образует гетеродимерный комплекс для связывания IL-33 с IL-1R. Сигнальный комплекс IL-33/ST2 может стимулировать иммунные ответы как Т-хелперов 1-го типа (Th1), так и Т-хелперов 2-го типа (Th2) в зависимости от типа активированной клетки, микроокружения и сети цитокинов в поврежденной ткани [3]. В то же время в экспериментальных работах показано, что IL-33, являющийся членом семейства IL-1, может самостоятельно функционировать в качестве модулятора активности NF κ B-сигнального пути и канонического сигнала от комплекса Toll-like рецептор/IL-1R [4, 5].

Цель исследования – сбор имеющихся сведений о взаимосвязи комплекса IL-33/ST2 и полиморфизма генов, кодирующих его составляющие, изменении уровня их экспрессии и патогенезе инфекционного эндокардита.

СТРАТЕГИЯ ПОИСКА

В данный обзор включены данные релевантных статей, описывающих роль полиморфизма генов врожденного иммунного ответа и особенности их экспрессии у пациентов с инфекционным эндокардитом, опубликованных с января 2008 по январь 2018 г. и представленных в базе данных PubMed. Поисковые запросы задавались посредством следующих сочетаний слов: для русскоязычных публикаций – инфекционный эндокардит, экспрессия гена, интерлейкин, секреция белка, сердечно-сосудистые заболевания; для англоязычных публикаций – infective endocarditis, gene expression, interleukin, protein secretio, cardiovascular disease. Осуществлялся поиск публикаций, не найденных по поисковым запросам, по списками литературы в релевантных статьях.

ИНФЕКЦИОННЫЙ ЭНДОКАРДИТ

Инфекционный эндокардит является одним из многофакторных заболеваний и занимает второе место среди причин развития приобретенных по-

роков сердца. Ключевым моментом формирования патологических изменений клапанного аппарата является инфицирование, обычно бактериальной этиологии, клапанных и подклапанных структур сердца, имеющее острое или подострое течение [6, 7]. Микробная колонизация возможна в поврежденных областях нативных клапанов сердца либо на структурах протезов. Имеется вероятность колонизации внутрисердечных имплантатов, инородных внутрисосудистых протезных материалов, использующихся при широком спектре лечебных хирургических мероприятий для коррекции сердечно-сосудистых патологий. Прогресс в консервативном и хирургическом лечении, появление новых групп риска и формирование резистентности микроорганизмов к широкому спектру антимикробных препаратов привели к появлению новых клинических проявлений ИЭ, что затрудняет своевременную диагностику и ухудшает прогноз заболевания.

Инфекционный эндокардит, не связанный с приемом внутривенных наркотических веществ, – заболевание, встречающееся как у мужчин, так и у женщин (однако частота встречаемости ИЭ у первых в 3 раза больше) и в любом возрасте (но риски возрастают у лиц, достигших 50 лет) [8].

На сегодняшний день известны более 120 возбудителей инфекционного эндокардита. Ведущими возбудителями являются грамположительные микроорганизмы [2]. Чаще всего это представители родов *Streptococcus* (*Str. viridans*, *Str. bovis* и др.), *Staphylococcus* (преимущественно *S. aureus*, *S. epidermidis*), *Enterococcus*. В отдельных случаях в качестве возбудителя могут выступать грибы и бактерии из группы НАСЕК (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* и *Kingella*) и другие грамотрицательные палочки, а иногда и кокки [9].

В норме эндотелий клапанного аппарата сердца устойчив к бактериальной колонизации в условиях периодической транзитной бактериемии [6]. Для развития ИЭ, не связанного с внутривенным введением наркотических средств, требуется ряд независимых друг от друга факторов: изменение поверхности сердечного клапана для получения подходящего места для бактериальной колонизации; устойчивая бактериемия с циркулирующим пулом высоковирулентных микроорганизмов; создание зараженной массы путем «захоронения» пролиферирующего микроорганизма в защитной матрице фибрина и тромбоцитов, наличие иммунодепрессивных состояний, включая угнетение иммунного ответа, связанное со стрессом (переохлаждение, неправильное и недостаточное питание, хронический психоэмоциональный стресс), генетическая предрасположенность, обу-

словленная мутационной изменчивостью генов белков различных классов [8].

В месте прикрепления бактериальной колонии воспалительная реакция может быть выражена до уровня формирования абсцесса с последующим разрушением створки клапана. Образование абсцессов является существенным осложнением при ИЭ, так как абсцессы могут проникать вглубь фиброзных колец и миокарда [10]. При распространении на протезе клапана сердца помимо деформации створчатого аппарата образуются фистулы, которые могут привести к полному отрыву протеза от фиброзного кольца. Предсердная поверхность створок митрального клапана и желудочковая поверхность створок аортального клапана относятся к местам повышенного риска прикрепления вегетаций, так как являются местами повышенного давления.

Воспалительный ответ при развитии ИЭ имеет системный характер и стимулирует развитие реакций как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, начиная с острофазных белков, активации системы комплемента, повышения концентраций циркулирующих иммуноглобулинов всех классов, появлением в периферической крови макрофагов, синтеза различных типов циркулирующих антител [11]. Для контроля нарастающего инфекционного поражения организм-хозяин усиленно продуцирует опсонические антитела; криоглобулины; антитела, направленные на бактериальные белки теплового шока и макроглобулинов; комплементсвязывающие и агглютинирующие антитела. Антитела против компонентов клеточной поверхности снижают адгезию *C. albicans* к фибрину и тромбоцитам *in vitro* и уменьшают заболеваемость ИЭ *in vivo*. Недавние данные указывают на возможную роль вакцинации против фибриноген-связывающего фактора А для профилактики ИЭ в модельных исследованиях [12]. Однако эффективной вакцины для человека до сих пор не разработано.

Таким образом, патогенез ИЭ включает несколько факторов: патогенный микроорганизм, повреждение поверхности нативного клапана или наличие протеза клапана сердца, активность иммунного ответа, экзогенные и эндогенные факторы, в том числе индивидуальная восприимчивость к инфекции [13].

Несмотря на тот факт, что клиническая составляющая ИЭ изучена в достаточной мере, по поводу этиологии данного заболевания нет единого мнения [13]. Также недостаточно изученным является пусковой механизм развития патологического процесса с точки зрения активации иммунного ответа. Меняется информация о реакциях иммунного ответа, генах-маркерах и их экспрессии в процессе воспалительного ответа при ИЭ [14]. Некоторые исследова-

дователи [15] демонстрируют связь полиморфизма генов врожденного иммунного ответа с восприимчивостью к инвазии *S. aureus* и увеличением рисков развития инфекционного эндокардита нативных клапанов сердца.

ИНТЕРЛЕЙКИН-33

Интерлейкин-33, являющийся членом семейства провоспалительных цитокинов IL-1, поступает в цитоплазму и внеклеточное пространство при повреждении клетки. Секретируется в клетках эндотелия, эпителиальных клетках и фибробластах как при гомеостазе, так и при воспалении. Действует как сигнал тревоги (алармин активируемый), высвобождается при разрушении клетки или повреждении ткани для инициации иммунных клеток. Иницирует и активирует местные воспалительные реакции путем рекрутирования и активации клеток, имеющих ассоциированные с воспалением функции (эозинофилы, базофилы и нейтрофилы), стимулирует фиброгенез и ангиогенез, влияет на сосудистую проницаемость (в моделях *in vitro* и *in vivo*), а также участвует в восстановлении целостности слизистой оболочки и заживлении ран [15].

Ген *IL 33* локализован в хромосоме 9p24.1 протяженностью 42 835 оснований, взаимодействует с такими генами, как *IL1RL1*, *USP21*, *GATA3* и т.д. Постоянная экспрессия *IL 33* регистрируется в эпителиальных клетках различных видов, фибробластах, клетках гладкомышечной ткани и тучных клетках [17]. Экспрессия *IL 33* в макрофагах незначительна, но может быть активация противовоспалительными факторами – липополисахаридами клеточной стенки [18]. Полиморфный вариант данного гена с мутацией в сайте rs7044343 связан с модуляцией ишемической болезни сердца [19].

Отличает IL-33 от IL-1 и фактора роста фибробластов, с которыми этот интерлейкин имеет структурное сходство, наличие иммунорегуляторных свойств [20]. Являясь важным членом семейства IL-1, IL-33 оказывает плеiotропные эффекты в формировании реакций врожденного и адаптивного иммунного ответа, и его уровень строго коррелирует с уровнем воспаления в ткани [21]. В то же время он может регулировать ядерную транскрипцию генов белков – активаторов воспаления. Действует IL-33 как традиционный цитокин посредством активации NFκB через димерный комплекс ST2L/IL-1RAcP или как внутриклеточный активатор ядерного фактора путем транслокации в ядро, где он связывается с хроматином и модулирует экспрессию гена.

Может действовать как сигнал тревоги, когда он высвобождается после повреждения клеток или как

отрицательный регулятор транскрипции гена NFκB, когда действует внутриклеточно [3]. Синтезируется IL-33 в виде предшественника с молекулярной массой 30 кДа, после отщепления пропептида под действием фермента каспазы 1 превращается в зрелый белок массой 18 кДа. Форма предшественника обрабатывается ферментативно, а затем вызывает воспаление через распознающую сигнальную систему Toll-подобных рецепторов (Toll like receptors, TLRs), выступая в качестве алармина [22].

Однако синтезированный IL-33 может и не проходить стадию созревания. В этом случае он действует как фактор ингибирования транскрипции благодаря наличию сигнала ядерной локализации в пропептиде. Функция репрессора транскрипции, не характерная для семейства цитокинов, реализуется через связи с поверхностью нуклеосомы в области кармана, образованного гистонами H2A и H2B [20]. Также IL-33 может выполнять функцию негистонового хромосомного белка, вовлекаемого в сборку нуклеопротеиновых комплексов, поддерживая и укрепляя структуру хроматина, что оказывает влияние на скорость экспрессии генов на этих участках хромосом. Экспрессируется IL-33 как иммунными клетками, например макрофагами и дендритными клетками, так и неиммунными – эндотелиальными и эпителиальными клетками, фибробластами [21]. В отличие от других членов семейства IL-1, в первую очередь IL-33 индуцирует иммунные ответы Th2 и поляризацию макрофагов через альтернативный путь активации (так называемые M2) [10]. Высвобождение во внеклеточное пространство происходит после повреждения ткани [23] и сопровождается инициацией Th2 и стимуляцией секреции ассоциированных цитокинов (IL-4, IL-5 и IL-13), а также активацией клеток врожденного иммунного ответа – тучных клеток и лимфоидных клеток врожденного иммунного ответа (innate lymphoid cells, ILCs).

Для активации ядерных факторов NFκB и MAPK по MyD88-зависимому сигнальному пути необходимо связывание IL-33 с рецептором плазматической мембраны [3], состоящему из белков-рецепторов ST2L (лиганд супрессора туморогенности 2) и IL-1RAcP (вспомогательный белок рецептора IL-1).

Помимо наиболее изученной роли в аутоиммунном ответе [24] IL-33 участвует в воспалительных процессах, сопровождающих различные раковые, легочные, кишечные, сердечно-сосудистые заболевания [25]. Имеются данные о его роли в патогенезе болезни Альцгеймера [26]. Однако, несмотря на очевидность иммуно-регуляторного влияния на течение ИЭ, участие IL-33 в патогенезе этого воспалительно-го заболевания не описано.

РЕПРЕССОР ТУМОРОГЕННОСТИ 2 (ST2)

Репрессор туморогенности 2 (suppression of tumorigenicity, ST2), известный как IL1RL1, T1, DER4 или Fit-1, является членом семейства интерлейкинов. Ген *IL1RL1* расположен на длинном плече хромосомы 2q12, содержит 11 экзонов. Может выполнять функции иммуномодулятора, потому экспрессируется и как рецептор, закрепленный на мембране, активируемый IL-33, и как растворимый вариант (sST2), который проявляет противовоспалительные свойства.

В результате альтернативного сплайсинга IL1RL1 ST2 может экспрессироваться в виде четырех функциональных изоформ: ST2L (мембран-связанная), sST2 (растворимая), ST2V – изоформа, подобная sST2, но не имеющая третьего внеклеточного домена иммуноглобулина [27], и ST2VL – с трансмембранным доменом. ST2L экспрессируется различными иммунными клетками (тучными, дендритными, моноцитами), избирательно на клетках Th2, но не на Th1-лимфоцитах [28].

Экспрессия ST2L выявлена на поверхности иммунных (Th2, естественных киллеров (NK)) и клеток миелоидного ряда: дендритных, моноцитов и гранулоцитов [29]. Установлено, что эффекты ST2L реализуются через отрицательный контроль IL-1RI и TLR4, заключающийся в блокировании адаптеров MyD88 и Mal. Такая блокировка приводит к ингибированию сигналинга TLR и способствует развитию иммунного ответа по Th2. Однако на сигнальные пути TLR3 контроль не распространяется и не затрагивает регуляторный фактор транскрипции интерферонов третьего типа (IRF3), что дает возможность дополнительно регулировать воспалительный ответ на инфицирование вирусами через активацию транскрипции интерферона (IFN) α и β, а также через другие интерферон-индуцированные гены.

В то же время sST2, связываясь с IL-33, приводит к блокированию сигнального пути по оси IL-33/ST2L [30], снижая противовоспалительные эффекты и устраняя тем самым кардиопротективные действие. Считается, что растворимая форма ST2 как рецептор-ловушка IL-33 играет критическую роль в нескольких аутоиммунных заболеваниях, включая системную красную волчанку, склероз и ревматоидный артрит [31, 32].

Являясь механически индуцированным белком кардиомиоцитов, sST2 в зависимости от уровня может предсказывать результат у пациентов с острым инфарктом миокарда (ИМ) или хронической сердечной недостаточностью, нарушить сердечную функцию и усугубить ремоделирование сердца как в ишемизированных, так и ишемизированных тканях.

Помимо роли IL-33/ST2L в качестве терапевтической мишени, sST2 идентифицирован как биомаркер ишемических заболеваний сердца у человека [33]. Показано, что введение гибридного белка sST2-Fc может быть полезным при лечении артрита, легочной эозинофилии, шоковой, печеночной и кишечной ишемической реперфузионной травмы [34, 35]. Установлено, что sST2 блокирует вызванную липополисахаридами (LPS) клеточных стенок грамотрицательных бактерий продукцию макрофагами провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-12, и TNF α , но не влияет на продукцию IL-10. Выявлено, что генетические варианты, которые меняют внутриклеточную трансмембранную сигнализацию ST2, могут экспрессировать человеческий sST2, открывая новый путь иммунной и воспалительной регуляции [36].

Таким образом, в настоящее время доказано, что ST2 может регулировать воспалительный ответ на повреждение тканей в основном за счет модулирования сигналинга адаптеров MyD88 и Mal, что непосредственно связано с путем активации ядерного фактора NF κ B от TLR. Поскольку TLR являются основными рецепторами врожденного иммунного ответа, распознающими элементы клеточных стенок бактерий и связанных с этим механизмов активации воспаления при ответе на бактериальную инвазию, в том числе и для формирования условий для колонизации клапанных структур оппортунистическим комплексом микроорганизмов *Str. bovis* и *Str. equinus*, связанными с иммунным уклонением [37], то участие белка ST2 в патогенезе ИЭ представляется логичным. Однако этому направлению не уделено достаточного внимания.

РЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС IL-33/ST2

Как упоминалось ранее, к одному из факторов активации сигнального пути ядерного фактора NF κ B, сопровождающегося стимуляцией иммунных ответов по Th1- или Th2-типу в зависимости от типа активированной клетки, микроокружения и содержания цитокинов в поврежденной ткани, относят комплекс IL-33/ST2L [3]. Отмечено, что в экспериментальных моделях развитие диабета 1-го типа, аутоиммунного энцефаломиелимита, молниеносного гепатита и рака молочной железы сопровождалось преимущественно иммунным ответом Th1/Th17. Но одновременно зарегистрирован и более высокий уровень продукции IL-33 [3]. Например, M. Milovanovic и соавт. предполагают, что IL-33 может способствовать развитию воспалительных аутореактивных иммунных реакций.

Примечательно, что рецептор для IL-33 является гетеродимерным комплексом, состоящим из

мембрансвязанного белка ST2L и ко-рецептора IL-1RAcP. В основе эффекторной активации ответов по Th2-типу лежит феномен рецептора ST2L, который, несмотря на свою принадлежность к семейству TIR, не участвует в активации NF κ B. Индуцирование воспалительных реакций через рецепторный комплекс IL-33/ST2 происходит за счет проводящего сигнал ко-рецептора IL-1RAcP и зависит от типа клетки и микроокружения. Были описаны различные сигнальные пути, активированные IL-33, включая MyD88, IL-1R-ассоциированной киназы 4 (IRAK4) и TRAF6 [38]. С помощью нисходящего пути через адаптеры ST2, MyD88 и TRAF6 в конечном итоге возможна активация NF κ B и митоген-активируемых протеинкиназ, которые участвуют в контроле клеточной пролиферации и апоптоза [38].

Члены пути mTOR, такие как фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), также могут быть активированы IL-33 в клетках Th2, макрофагах или эозинофилах [39], что позитивно коррелирует с экспрессией генов IL-33 и sST2 при инфаркте миокарда [40].

Сигнальный путь IL33/ST2L регулируется и другими механизмами, например механизмом альтернативного сплайсинга ко-рецептора IL-1RAcP, и отражается на выраженности воспалительного ответа, так как сигналинг зависит от функционального состояния обоих компонентов [41]. Важное значение IL-1RAcP имеет и для IL-1-индуцированной активации интерлейкин-1 рецептор-ассоциированной киназы (IRAK) и стресс-активируемой протеин-киназы (SAP kinases). Установлено, что рекомбинантный химерный белок sIL-1RAcP-Fc уменьшает секрецию IL-6 в тучных клетках, подвергшихся воздействию IL-33. В своей работе K. Hong и соавт. показали, что совместная инкубация sST2-Fc и sIL-1RAcP-Fc синергически ингибировала активность IL-33, что указывает на роль sIL-1RAcP в модулировании биологической активности IL-33 [41].

В то же время ST2-лигандсвязывающая цепь с компонентом для взаимодействия с IL-33 и растворимая форма ST2 обладают антагонистическими свойствами, что позволяет регулировать активацию воспалительного ответа в различных типах клеток и тканей. Однако предполагается, что существует дополнительный, помимо IL-1RAcP и ST2, рецепторный компонент, который может участвовать в регулировании биологической активности IL-33 [41]. Возможно, что таким компонентом, участвующим в процессе активации сигнального пути, является Ig-IL-1R-связанная молекула (SIGIR), взаимодействующая с IL-1RR (SIGIRR), членом семейства IL-1R, который регулирует передачу сигналов IL-18, IL-1 и IL-33. В Th-2 клетках, подвергшихся воздействию

IL-33, димеризация SIGIRR с ST2L негативно влияет на передачу сигнала IL-33/ST2 через непосредственное взаимодействие с промежуточным сигнальным звеном семейства IL-1R. Сборка IL-1R и IL1RAcP оказывает действие через внеклеточный домен IL-33 или путем его взаимодействия с MyD88, IRAK и TRAF6, мешающими нисходящей передаче сигналов [42].

РОЛЬ КОМПЛЕКСА IL-33/ST2 В ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ

Как описывалось выше, комплекс IL-33/ST2 может оказывать как провоспалительные, так и противовоспалительные эффекты. Повышенный уровень растворимого ST2 может быть биомаркером стероидно-рефрактерной реакции «Трансплантат против хозяина» (РТПХ) и летальности. Увеличенный синтез IL-33 негемопозитическими клетками в желудочно-кишечном тракте у мышей после кондиционирования и у пациентов при РТПХ было показано в исследовании D.K. Reichenbach и соавт. [43]. Активация IL-33/ST2 проводилась на мышинных и человеческих аллореактивных Т-клетках, и показано, что концентрация sST2 повышалась по мере прогрессирования экспериментальной РТПХ. Блокировка IL-33/ST2-взаимодействий при трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток экзогенными инфузиями ST2-Fc характеризовалась снижением летальности при РТПХ. Данный факт указывает на то, что ST2 выступает в качестве рецептора-ловушки, модулирующего РТПХ.

Исследования показали и немаловажную роль IL-33 и ST2 в воспалительных процессах дыхательной системы. Например, уровень IL-33 коррелирует с тяжестью клинической астмы [43], так как при введении IL-33 повышается уровень цитокинов 2-го типа, которые мобилизуют эозинофилы и поляризуют макрофаги M2. Вероятно, такой же механизм присутствует и при увеличении концентрации IL-33 у пациентов с атопическим дерматитом, у которых уровень IL-33 в эпидермисе кожи достаточно высок [44].

Эндометриоз – это хроническое состояние, которое классифицируется по аномальному росту ткани эндометрия за пределами матки. Хотя патогенез этого заболевания остается неизвестным, отмечено, что у пациенток с эндометриозом наблюдается иммунная дисфункция. В своем исследовании J.E. Miller и соавт. [45] исследовали роль IL-33 как регулятора хронического воспаления, играющего критическую роль в патологии эндометриоза, с использованием образцов ткани пациентов, клеточных линий и в модели сингенной мыши. Обнаружено, что при эндометриозе в ткани наблюдается значительно более высокий уровень белка IL-33 по сравнению с эндо-

метрием здоровых фертильных органов. В сингенной мышинной модели эндометриоза инъекции IL-33 вызывали системное воспаление, что выражалось в увеличении провоспалительных цитокинов плазмы по сравнению с контрольной группой. Кроме того, эндометриотические поражения у обработанных IL-33 мышей были высокоvascularизированы и характеризовались повышенной пролиферацией. Авторы дали убедительные доказательства того, что IL-33 стимулирует воспаление, ангиогенез и пролиферацию в эндометрии.

Сigaretный дым побуждает эпителиальные клетки легких более интенсивно вырабатывать внутриклеточный IL-33, который высвобождается после повреждения клеток вирусной или бактериальной инфекцией. При этом снижается продуцирование ST2 с помощью врожденных клеток 2-го типа, но увеличивается экспрессия макрофагами и NK-клетками, что приводит к остановке продуцирования цитокинов 2-го типа с помощью IL2 и подавлению продуцирования IL-12 макрофагами [46].

Было показано, что экспрессия IL-33 и ST2 увеличивается в десневых тканях у пациентов с хроническим периодонтитом и при хронической обструктивной болезни легких, что делает их потенциальными терапевтическими мишенями. В отличие от этого IL-33 играет важную роль в терапии увеита, который является аутовоспалительным заболеванием, поражающим глаза. Лечение с использованием препаратов IL-33 уменьшало тяжесть экспериментального аутоиммунного увеита у мышей, что предполагает возможность использования рекомбинантного IL-33 для лечения аутоиммунного увеита и аутоиммунных заболеваний в целом [47].

В последние годы знания о роли IL-33, sST2 и комплекса IL-33/ST2 в патофизиологии сердечно-сосудистых заболеваний расширились, появились данные о связи этих белков с дисфункцией, фиброзом и ремоделированием миокарда. Благоприятные эффекты IL-33 реализуются через рецептор ST2L, тогда как при связывании IL-33 с sST2 происходит прерывание взаимодействия между ST2L, и антире-моделирующие эффекты устраняются [48]. Помимо своей роли в ремоделировании миокарда система IL-33/ST2, предположительно, играет дополнительную роль в развитии и прогрессировании атеросклероза.

В то же время предполагается, что комплекс IL-33/ST2L может обладать терапевтическим потенциалом для благотворного регулирования реакции миокарда на перегрузку и травму [47]. Показано, что после перенесенного ИМ экспрессия sST2 быстро повышается в течение первых 4 нед, и в отличие от

IL-33 ее уровни коррелируют с текущими процессами фиброза и воспаления. Полученные данные свидетельствуют о дифференциальной регуляции IL33 и sST2. Терапевтическая модуляция ранней экспрессии sST2 может иметь большее значение для предотвращения неблагоприятного ремоделирования после ИМ [49].

В одной из частей Фрамингемского исследования показано, что повышенный уровень sST2 в сыворотке крови связан с генетическими детерминантами и коррелирует с увеличением риска сердечно-сосудистых заболеваний [50]. С участием 2 991 лица авторам удалось установить, что уровень sST2 обусловлен генетическими факторами в большей степени, чем клиническими и экологическими. В исследовании GWAS (Genome Wide Association Studies, Полногеномный поиск ассоциаций) продемонстрированы множественные ассоциации между однонуклеотидным полиморфизмом (single nucleotide polymorphism, SNP) в различных частях гена *IL1RL1* с концентрацией sST2. Пять вариантов миссенс-мутаций *IL1RL1* продемонстрировали корреляцию с более высоким уровнем sST2, находились в экзонах, кодирующих внутриклеточный домен ST2, который отсутствует в sST2.

В исследовании с включением лиц китайской популяции Хань определена связь между полиморфизмами генов сигнального пути IL-33/ST2 и ИМ [51]. Проведен анализ ассоциации «случай – контроль» с участием 490 пациентов с ИМ и 929 лиц группы контроля. Изучали связь SNP в генах *IL33*, *IL1RL1* и *IL1RAP* (rs11792633, rs1041973, rs4624606) и риском развития ИМ. На основании ассоциативного исследования сделан вывод о том, что в сигнальном тракте IL33/ST2 минорный аллель полиморфизма rs4624606 *IL-1RAP* является потенциальным независимым фактором риска развития ИМ.

Продемонстрирована роль IL-33 как алармина при активации ответа Th2-зависимого типа в развитии ожирения, вирусных инфекций, иммунологической недостаточности, кишечного воспаления и подавлении опухолевого роста [52], при цитомегаловирусной инфекции [53].

Таким образом, в работах многих авторов показано, что иммунный рецепторный комплекс IL33/ST2 включается одним из первых при патологических изменениях как при заболеваниях, связанных с повреждением ткани, так и в ответ на микробные инвазии. Функционирование комплекса играет важную роль не только для активации реакций врожденного иммунного ответа по эффекторному пути, но и в развитии воспалительного ответа по пути активации Th2, сопровождаемого уменьшением местного вос-

палительного ответа, что может быть связано с увеличением риска адгезии микроорганизмов на клапанном аппарате сердца и развитии инфекционного эндокардита.

Так как эффекты активации сигнального комплекса IL-33/ST2 разнонаправлены и зависят от многих внешних факторов, в том числе от ткани и микроокружения, его роль в модулировании воспалительного ответа неоспорима. В настоящее время отмечается недостаточное внимание исследователей к его роли при инфекционной патологии бактериальной природы.

ЭКСПРЕССИЯ МРНК И БЕЛКОВ IL-33/ST2 ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Еще на ранних этапах изучения иммунного ответа через комплекс IL33/ST2 [54], используя метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (РТ-ПЦР), обнаружили, что ген *IL1RL1* активно экспрессируется в гематопозитических клеточных линиях. Он также активно экспрессировался именно в хелперных линиях Т-клеток в культуральных линиях лимфоцитов. Установлено, что клеточные линии мыши с лимфоцитами Th1 не экспрессируют мРНК ST2. Однако одна из клеточных линий Th2, D10, экспрессировала ST2L (трансмембранную форму) без стимуляции, тогда как совместная стимуляция PMA и A23187 индуцировала ST2 (растворимую форму) мРНК.

Эти результаты показывают, что ген *ST2* участвует в регуляции иммунной системы. Также IL-1 α , IL-1 β и антагонист рецептора не связывались с белком ST2L, что побудило авторов искать специфический лиганд ST2. В эксперименте рекомбинантный белок ST2 человека очищали и помечали FITC. В результате меченный белок ST2 человека, связанный с клетками RPMI8226, полученными из миеломы, был обнаружен среди различных линий В-клеток, что указывает на возможное участие ST2 во взаимодействии Т- и В-клеток.

Воспалительные цитокины, к которым относится комплекс IL-33/ST2, участвуют в регуляции адаптивных и неадаптивных изменений сердца. Поскольку сердечный фиброз во многом зависит от увеличения производства внеклеточного матрикса сердечными фибробластами, J. Zhu и соавт. [55] предположили, что IL-33 напрямую ингибирует профиброзную активность этих клеток. Однако концентрация IL-33 не влияла на экспрессию генов, кодирующих компоненты внеклеточного матрикса, или на пролиферацию (маркеры, типичные для фиброза). В модельном исследовании на мышах было продемонстрировано,

что IL-33 преимущественно продуцируется миокардиальными фибробластами, а не сердечными миоцитами. Также данное исследование показало, что при нокаутировании тотальной ST2 мыши более подвержены TAC-индуцированной сердечной гипертрофии.

В исследовании D. Shao и соавт. [56] было показано, что при удалении IL-33 нарушается биомеханически активная система, защищающая миокард от сердечных ремоделирующих событий, таких как гипертрофия кардиомиоцитов и сердечный фиброз при механическом стрессе.

При модуляции системы IL-33/ST2 при постинфарктной сердечной недостаточности у крыс уровень экспрессии мРНК при ИМ для IL-33 и sST2 были повышенными, но их кинетика была различной [49]. Экспрессия мРНК IL-33 была высокой сразу после острого ИМ и оставалась повышенной в течение первых 12 нед, что также сопровождалось увеличением экспрессии белка IL-33. Напротив, экспрессия мРНК sST2 показала ранний пик через 1 нед после острого ИМ, далее последовало резкое снижение в течение 4 нед. Хотя экспрессия sST2 показала ранний пик и положительную корреляцию с маркерами фиброза и воспаления, уровень экспрессии IL-33 оставался высоким в течение всего времени наблюдения и не коррелировал с этими маркерами [48].

Культивируя первичные кардиальные фибробласты человека и первичные сердечные миоциты человека, Р.Т. Veeraveedu и соавт. [57] измеряли уровень экспрессии мРНК, белка IL-33 и ST2 в клетках, а также рассматривали влияние на данные гены других цитокинов. Провоспалительные цитокины увеличивают экспрессию IL-33 в сердечных фибробластах сердца, сердечных миоцитах и сосудистых гладкомышечных клетках через пути NF-κB, MEK, что также доказывает его участие в воспалительных процессах сердечно-сосудистой системы. Кроме того, было показано, что IL-33 высвобождается во время некроза сердечных и гладкомышечных клеток человека.

В опытах *in vivo* нокадаун IL-33 в нормальных эндотелиальных клетках легочной артерии человека привел к индукции и экспрессии sST2. Это связано с действием IL-33 как ядерного супрессора для снижения экспрессии sST2 путем связывания с гомеобоксными областями и потенциального рекрутирования транскрипционных репрессорных белков. Исследование D. Shao и соавт. [56] показало, что при идиопатической легочной артериальной гипертензии происходит значительная потеря IL-33 без высвобождения из клеток.

Таким образом, с одной стороны, IL-33 усиливает иммунные реакции и воспаление, зависящие от реак-

ций клеток иммунного ответа. С другой стороны, эффекты IL-33 связаны с индукцией иммунного ответа Th2-типа через его ST-2 рецептор, кроме этого он является ядерным репрессорным фактором. В свою очередь, ST2 экспрессируется как в виде варианта ST2-мембранзависимого рецептора, активируемого IL-33, а также в виде растворимого варианта sST2, действующего как рецептор-ловушка и обладающего противовоспалительными свойствами. Несмотря на известное участие комплекса IL33/ST2 во многих патологических процессах, включая астму, ревматоидный артрит и воспалительные заболевания кишечника, а в последнее время рак и болезнь Альцгеймера, когнитивные расстройства и малярию [58], участие данного комплекса в воспалительном ответе при инфекционных заболеваниях не выяснено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопленные к настоящему моменту данные о IL-33, sST2 и рецепторного комплекса IL-33/ST2 в воспалительных и сердечно-сосудистых заболеваниях позволяют утверждать их значимую роль в воспалительном ответе при повреждении тканей, вирусной инфекции, но вопрос об участии в патогенезе инфекционного эндокардита обойден стороной. Как и все цитокины, IL-33 и ST2 более активно функционируют при малых концентрациях, и поэтому неизвестна их функциональность при изменении концентраций во время ИЭ, неизбежно сопровождающегося изменением локального цитокинового статуса и деструкцией тканей клапанного аппарата. Остается актуальной проблема количественной оценки экспрессии генов данных интерлейкинов при инфекционном поражении клапанов сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Naghavi M. Mortality and causes of death collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015; 385 (9963): 117–171. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2.
2. Данилов А.И., Козлов Р.С., Козлов С.Н., Дехнич А.В. Практика ведения пациентов с инфекционным эндокардитом в Российской Федерации. *Антибиотики и химиотерапия*. 2017; 62 (1-2): 30–34. DOI: 10.24411/0235-2990-2017-00027.
3. Milovanovic M., Volarevic V., Radosavljevic G., Jovanovic I., Pejnovic N., Arsenijevic N., Lukic M.L. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunologic Research*. 2012; 52 (1-2): 89–99. DOI: 10.1007/s12026-012-8283-9.
4. Liu X., Hammel M., He Y., Tainer J.A., Jeng U.S., Zhang L., Wang S., Wang X. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110 (37): 14918–14923. DOI: 10.1073/pnas.1308651110.

5. Kakkar R., Lee R.T. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7 (10): 827–840. DOI: 10.1038/nrd2660.
6. Резник И.И., Идов Э.М., Кисляк С.В., Зайцев Л.Н., Беллина Е.С. Современный инфекционный эндокардит: клинико-морфологическая эволюция, взаимосвязь с антифосфолипидным синдромом. *Архив внутренней медицины.* 2013; 1 (9): 49–59. DOI: 10.20514/2226-6704-2013-0-1-49-59.
7. Стасев А.Н., Рутковская Н.В., Кокорин С.Г., Левадин Ю.В. Сальмонеллезный эндокардит митрального клапана: клиническое наблюдение. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2017; 6 (2): 123–126. DOI: 10.17802/2306-1278-2017-2-123-126. (2)
8. Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Хуторная М.В., Южакин А.Е., Рутковская Н.В., Головкин А.С. Связь полиморфизмов гена *TREM-1* с инфекционным эндокардитом. *Инфекция и иммунитет.* 2015; 5 (4): 331–338. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-331-338.
9. Рахматулина М.Р., Барышков К.В., Абудуев Н.К. Проявления гонококковой инфекции и тактика терапии заболевания с учетом антибиотикочувствительности *N. gonorrhoeae* в Архангельской области. *Вестник дерматологии и венерологии.* 2014; 6: 100–106. DOI: 10.25208/0042-4609-2014-0-6-100-106.
10. Gaca J.G., Sheng S., Daneshmand M.A., O'Brien S., Rankin J.S., Brennan J.M., Hughes G.C., Glower D.D., Gammie J.S., Smith P.K. Outcomes for endocarditis surgery in North America: a simplified risk scoring system. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2011; 141: 98–106. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2010.09.016.
11. Понасенко А.В., Головкин А.С., Григорьев Е.В. Значение системы комплемента и C5a субъединицы при формировании системного воспалительного ответа в послеоперационном периоде протезирования клапанов сердца пациентов с инфекционным эндокардитом. *Фундаментальные исследования.* 2014; 1 (10): 141–146.
12. Scully I.L., Timofeyeva Y., Keeney D., Matsuka Y.V., Severina E., McNeil L.K., Nanra J., Hu G., Liberator P.A., Jansen K.U., Anderson A.S. Demonstration of the preclinical correlate of protection for *Staphylococcus aureus* clumping factor A in a murine model of infection. *Vaccine.* 2015; 33 (41): 5452–5457. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.08.029.
13. Holland T.L., Baddour L.M., Bayer A.S., Hoen B., Miro J.M., Fowler V.G. Infective endocarditis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2016; 2: 16059. DOI: 10.1038/nrdp.2016.59.
14. Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Yuzhalin A.E., Salakhov R.R., Khutorная M.V., Kutikhin A.G., Rutkovskaya N.V., Savostyanova Y.Y., Barbarash L.S. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. *Cytokine.* 2015; 71 (1): 16–21. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.08.001.
15. Moreau K., Clemenceau A., Le Moing V., Messika-Zeitoun D., Andersen P.S., Bruun N.E., Skov R.L., Couzon F., Bouchiat C., Erpelding M.L., van Belkum A., Bossé Y., Duval X., Vandenesch F. Human genetic susceptibility to native valve *Staphylococcus aureus* endocarditis in patients with *S. aureus* bacteremia: Genome-Wide Association Study. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 640. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00640.
16. Sponheim J., Pollheimer J., Olsen T., Balogh J., Hammarström C., Loos T., Kasprzycka M., Sørensen D.R., Nilsen H.R., Kuchler A.M., Vatn M.H., Haraldsen G. Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* 2010; 177 (6): 2804–2815. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100378.
17. Liew F.Y., Pitman N.I., McInnes I.B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (2): 103–110. DOI: 10.1038/nri2692.
18. Nile C.J., Barksby E., Jitprasertwong P., Preshaw P.M., Taylor J.J. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology.* 2010; 130 (2): 172–180. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03221.x.
19. Angeles-Martínez J., Posadas-Sánchez R., Llorente L., Alvarez-León E., Ramírez-Bello J., Villarreal-Molina T., Lima G., Cardoso-Saldaña G., Rodríguez-Pérez J.M., Pérez-Hernández N., Fragoso J.M., Posadas-Romero C., Vargas-Alarcón G. The rs7044343 polymorphism of the interleukin 33 gene is associated with decreased risk of developing premature coronary artery disease and central obesity, and could be involved in regulating the production of IL-33. *PLoS One.* 2017; 12 (1): e0168828. DOI: 10.1371/journal.pone.0168828.
20. Колобов В.В. Интерлейкин-33 – ключевой посредник в реализации иммунного ответа. *Цитокины и воспаление.* 2011; 10 (3): 5–9.
21. De la Fuente M., MacDonald T.T., Hermoso M.A. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26 (6): 615–623. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.017.
22. Mann D.L. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell-tolls. *Circ. Res.* 2011; 108 (9): 1133–1145. DOI: 10.1161/CIRCRESA-HA.110.226936.
23. Lott J.M., Sumpter T.L., Turnquist H.R. New dog and new tricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2015; 97 (6): 1037–1048. DOI: 10.1189/jlb.3RI1214-595R.
24. Verri W.A., Souto F.O., Vieira S.M., Almeida S.C.L., Fukuda S.Y., Xu D., Alves-Filho J.C., Cunha T.M., Guerrero A.T., Mattos-Guimaraes R.B., Oliveira F.R., Teixeira M.M., Silva J.S., McInnes I.B., Ferreira S.H., Louzada-Junior P., Liew F.Y., Cunha F.Q. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 2010; 69 (9): 1697–1703. DOI: 10.1136/ard.2009.122655.
25. Cui G., Qi H., Gundersen M.D., Yang H., Christiansen I., Sørbye S.W., Goll R., Florholmen J. Dynamics of the IL-33/ST2 network in the progression of human colorectal adenoma to sporadic colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2015; 64 (2): 181–190. DOI: 10.1007/s00262-014-1624-x.
26. Fu A.K., Hung K.W., Yuen M.Y., Zhou X., Mak D.S., Chan I.C., Cheung T.H., Zhang B., Fu W.Y., Liew F.Y., Ip N.Y. IL-33 ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *PNAS.* 2016; 113 (19): e2705–2713. DOI: 10.1073/pnas.1604032113.
27. Theoharides T.C., Zhang B., Kempuraj D., Tagen M., Vasiadi M., Angelidou A., Alysandratos K.D., Kalogeromitros D., Asadi S., Stavrianeas N., Peterson E., Leeman S., Conti P.

- IL-33 augments substance p-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107 (9): 4448–4453. DOI: 10.1073/pnas.1000803107.
28. Queiroz G.A., Costa R.S., Alcantara-Neves N.M., Barreto M.L., Carneiro V.L., Figueredo C.A. IL33 and IL1RL1 variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population. *Int. J. Immunogenet.* 2017; 44 (2): 51–61. DOI: 10.1111/iji.12306. DOI: 10.1111/iji.12306.
29. Дылева Ю.А., Груздева О.В., Акбашева О.Е., Учасова Е.Г., Барбараш О.Л. Физиологическая и патофизиологическая роль стимулирующего фактора роста ST2. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (10): 599–605. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-10-599-605.
30. Sponheim J., Pollheimer J., Olsen T., Balogh J., Hammarstrom C., Loos T., Kasprzycka M., Sørensen D.R., Nilsson H.R., Kùchler A.M., Vatn M.H., Haraldsen G. Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* 2010; 177 (6): 2804–2815. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100378.
31. Molofsky A.B., Savage A.K., Locksley R.M. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. *Immunity*. 2015; 42 (6): 1005–1019. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.06.006.
32. Sawada H., Naito Y., Hirotsu S., Akahori H., Iwasaku T., Okuhara Y., Miki K., Eguchi A., Mitsuno M., Miyamoto Y., Ohyanagi M., Tsujino T., Masuyama T. Expression of interleukin-33 and ST2 in nonrheumatic aortic valve stenosis. *International Journal of Cardiology*. 2013; 168 (1): 529–630. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.12.059.
33. Demyanets S., Speidl W.S., Tentzeris I., Jarai R., Katsaros K.M., Farhan S., Krychtiuk K.A., Wonnerth A., Weiss T.W., Huber K., Wojta J. Soluble ST2 and interleukin-33 levels in coronary artery disease: relation to disease activity and adverse outcome. *PLoS One*. 2014; 9 (4): e95055. DOI: 10.1371/journal.pone.0095055.
34. Mok M.Y., Huang F.P., Ip W.K., Lo Y., Wong F.Y., Chan E.Y., Lam K.F., Xu D. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49 (3): 520–527. DOI: 10.1093/rheumatology/kep402.
35. Hong Y.S., Moon S.J., Joo Y.B., Jeon C.H., Cho M.L., Ju J.H., Oh H.J., Heo Y.J., Park S.H., Kim H.Y., Min J.K. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Korean Medical Science*. 2011; 26 (9): 1132–1139. DOI: 10.3346/jkms.2011.26.9.1132.
36. Demyanets S., Kaun C., Pentz R., Krychtiuk K., Rauscher S., Pfaffenberger S., Zuckermann A., Aliabadi A., Gröger M., Maurer G., Huber K., Wojta J. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013; 60: 16–26. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.03.020.
37. Jans C., Boleij A. The road to infection: Host-microbe interactions defining the pathogenicity of *Streptococcus bovis*/ *Streptococcus equinus* complex members. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 603. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00603.
38. Xu J., Zheng J., Song P., Zhou Y., Guan S. IL-33/ST2 pathway in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. *Mol. Med. Rep.* 2016; 14 (2): 1704–1708. DOI: 10.3892/mmr.2016.5446.
39. Akimoto M., Hayashi J.-I., Nakae S., Saito H., Takenaga K. Interleukin-33 enhances programmed necrosis of ST2L-positive low-metastatic cells in the tumour microenvironment of lung cancer. *Cell Death Dis.* 2016; 7: e2057. DOI: 10.1038/cddis.2015.418.
40. Salmond R.J., Mirchandani A.S., Besnard A.G., Bain C.C., Thomson N.C., Liew F.Y. IL-33 induces innate lymphoid cell-mediated airway inflammation by activating mammalian target of rapamycin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130 (5): 1159–1166. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.05.018.
41. Hong K., Lee Y., Lee S., Hong S., Bae S., Hong J., Bae S., Hong J., Choi J., Jhun H., Kwak A., Kim E., Jo S., Kang T., Cho Y.S., Kim Y.G., Kim S. The inhibitory function of Fc-ST2 depends on cell type; IL-1RAcP and ST2 are necessary but insufficient for IL-33 activity. *Immunol. Res.* 2013; 56 (1): 122–130. DOI: 10.1007/s12026-013-8388-9.
42. Bulek K., Swaidani S., Qin J., Lu Y., Gulen M.F., Herjan T., Min B., Kastelein R.A., Aronica M., Kosz-Vnenchak M., Li X. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J. Immunol.* 2009; 182 (5): 2601–2609. DOI: 10.4049/jimmunol.0802729.
43. Reichenbach D.K., Schwarze V., Matta B.M., Tkachev V., Lieberknecht E., Liu Q., Koehn B.H., Pfeifer D., Taylor P.A., Prinz G., Dierbach H., Stickel N., Beck Y., Warnecke M., Junt T., Schmitt-Graeff A., Nakae S., Follo M., Wertheimer T., Schwab L., Devlin J., Watkins S.C., Duyster J., Ferrara J.L., Turnquist H.R., Zeiser R., Blazar B.R. The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD. *Blood*. 2015; 125 (20): 3183–3192. DOI: 10.1182/blood-2014-10-606830.
44. Imai Y., Yasuda K., Sakaguchi Y., Haneda T., Mizutani H., Yoshimoto T., Nakanishi K., Yamanishi K. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110 (34): 13921–13926. DOI: 10.1073/pnas.1307321110.
45. Miller J.E., Monsanto S.P., Ahn S.H., Khalaj K., Fazlebas A.T., Young S.L., Lessey B.A., Koti M., Tayade C. Interleukin-33 modulates inflammation in endometriosis. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 17903. DOI: 10.1038/s41598-017-18224-x.
46. Kearley J., Silver J.S., Sanden C., Liu Z., Berlin A.A., White N., Mori M., Pham T.H., Ward C.K., Criner G.J., Marchetti N., Mustelin T., Erjefalt J.S., Kolbeck R., Humbles A.A. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity*. 2015; 42 (3): 566–579. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.011.
47. Barbour M., Allan D., Xu H., Pei C., Chen M., Niedbala W., Fukuda S.Y., Besnard A.G., Alves-Filho J.C., Tong X., Forrester J.V., Liew F.Y., Jiang H.R. IL-33 attenuates the development of experimental autoimmune uveitis. *Eur. J. Immunol.* 2014; (44): 3320–3329. DOI: 10.1002/eji.201444671.

48. Pascual-Figal D.A., Januzzi J.L. The biology of ST2: the International ST2 Consensus Panel. *Am. J. Cardiol.* 2015; 115 (7): 3B–7B. DOI: 10.1016/j.amjcard.2015.01.034.
49. Sanchez-Mas J., Lax A., Asensio-López Mdel C., Fernandez-Del Palacio M.J., Caballero L., Santarelli G., Januzzi J.L., Pascual-Figal D.A. Modulation of IL-33/ST2 system in post-infarction heart failure: correlation with cardiac remodelling markers. *Eur. J. Clin. Invest.* 2014; 44 (7): 643–651. DOI: 10.1111/eci.12282.
50. Ho J.E., Chen W.Y., Chen M.H., Larson M.G., McCabe E.L., Cheng S., Ghorbani A., Coglianese E., Emilsson V., Johnson A.D., Walter S., Franceschini N., O'Donnell C.J.; CARDIOGRAM Consortium; CHARGE Inflammation Working Group, Dehghan A., Lu C., Levy D., Newton-Cheh C.; CHARGE Heart Failure Working Group, Lin H., Felix J.F., Schreiter E.R., Vasan R.S., Januzzi J.L., Lee R.T., Wang T.J. Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL-33/ST2 signaling. *J. Clin. Invest.* 2013; 123 (10): 4208–4218. DOI: 10.1172/JCI67119.
51. Yang J.H., Wu F.Q., Wen Q., Zhang W.C., Wang Y.E., Xiong X., Su Y.W., Cheng L.X. Association of IL33/ST2 signal pathway gene polymorphisms with myocardial infarction in a Chinese Han population. *J. Huazhong. Univ. Sci Technology Med. Sci.* 2015; 35 (1): 16–20. DOI: 10.1007/s11596-015-1382-9.
52. Schwartz C., O'Grady K., Lavelle E.C., Fallon P.G. Interleukin 33: an innate alarm for adaptive responses beyond Th2 immunity-emerging roles in obesity, intestinal inflammation, and cancer. *Eur. J. Immunol.* 2016; 46 (5): 1091–1100. DOI: 10.1002/eji.201545780.
53. Chen Y., Qian J. Increased serum levels of IL-33 and soluble ST2 in neonates with human cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* 2018; 90 (8): 1383–1388. DOI: 10.1002/jmv.25187.
54. Yanagisawa K., Naito Y., Kuroiwa K., Arai T., Furukawa Y., Tomizuka H., Miura Y., Kasahara T., Tetsuka T., Tominaga S. The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells. *The Journal of Biochemistry.* 1997; 121 (1): 95–103. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021577.
55. Zhu J., Carver W. Effects of interleukin-33 on cardiac fibroblast gene expression and activity. *Cytokine.* 2012; 58 (3): 368–379. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.02.008.
56. Shao D., Perros F., Caramori G., Meng C., Dormuller P., Chou P.C., Church C., Papi A., Casolari P., Welsh D., Peacock A., Humbert M., Adcock I.M., Wort S.J. Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014; 451 (1): 8–14. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.111.
57. Veeraveedu P.T., Sanada S., Okuda K., Fu H.Y., Matsuzaki T., Araki R., Yamato M., Yasuda K., Sakata Y., Yoshimoto T., Minamino T. Ablation IL-33 gene exacerbate myocardial remodeling in mice with heart failure induced by mechanical stress. *Biochemical Pharmacology.* 2017; 138: 73–80. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.04.022.
58. Reverchon F., Mortaud S., Sivoyon M., Maillet I., Lauge-ray A., Palomo J., Montécot C., Herzine A., Meme S., Meme W., Erard F., Ryffel B., Menuet A., Quesniaux V.F.J. Quesniaux IL-33 receptor ST2 regulates the cognitive impairments associated with experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 2017; 13 (4): e1006322. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006322.

Сведения об авторах

Асанов Максим Айдарович, мл. науч. сотрудник, НИИ КПССЗ; ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово. ORCID 0000-0002-0747-2495.

Понасенко Анастасия Валериевна, канд. мед. наук, зав. лабораторией, НИИ КПССЗ, г. Кемерово. ORCID 0000-0002-3002-2863.

(✉) **Асанов Максим Айдарович**, e-mail: asmaks988@gmail.com.

Поступила в редакцию 28.02.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Биогенные полиамины при генитальной гонококковой инфекции: факты и гипотезы

Карпунина Т.И.¹, Нестерова Л.Ю.^{2,3}

¹ Пермский государственный медицинский университет (ПГМУ) им. акад. Е.А. Вагнера Россия, 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26

² Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН), Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук Россия, 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13

³ Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ) Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

РЕЗЮМЕ

Генитальная гонорея является одним из наиболее распространенных венерических заболеваний и характеризуется существенными гендерными различиями в его клиническом течении. Лабораторное подтверждение диагноза сопряжено с большими сложностями культивирования и идентификации возбудителя, а диагностика «женской» гонореи представляет серьезную проблему еще и в связи со стертой симптоматикой инфекционного процесса. На современном этапе перспективным направлением для диагностики воспалительных заболеваний репродуктивных органов признается изучение биохимического состава влагалищной и спермальной жидкостей, имеющих богатейший компонентный состав. Биогенные полиамины, которые могут синтезироваться как про-, так и эукариотическими клетками и в значительных количествах обнаруживаться в этих секретах, являются низкомолекулярными соединениями, оказывающими разнообразные эффекты на жизненно важные структуры и функции клеток обоих типов. В этой связи качественный и количественный состав, уровень и соотношение этих компонентов в секретах, с учетом изменения соответствующих показателей в динамике, могут иметь диагностический смысл при инфекционной патологии генитального тракта. Целью обзора явилось рассмотрение накопленной к настоящему времени информации о возможной роли биогенных полиаминов в физиолого-биохимическом потенциале *Neisseria gonorrhoeae* и их участии в развитии генитальной гонококковой инфекции с учетом влияния половых различий и ряда сопутствующих факторов. Особое внимание уделено происхождению и возможной функциональной роли полиаминов в генитальном тракте мужчин и женщин. В результате, с учетом спектра, происхождения и соотношения полиаминов, доминирующих в составе соответствующих секретов, сформулирована гипотеза о том, что манифестация процесса в случае инфицирования мужчин в большей степени обусловлена реактивностью эукариотических клеток, но не метаболической активностью микробиоты их репродуктивного тракта. В то время как развитие «женской» гонореи в первую очередь определяет состояние микробиоценоза цервикально-вагинального биотопа.

Ключевые слова: генитальная гонококковая инфекция, *Neisseria gonorrhoeae*, биогенные полиамины, микробиота, биопленки, антибиотикорезистентность.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта 17-44-590404 p_a.

✉ Карпунина Тамара Исаковна, e-mail: karpuninapsma@mail.ru.

Для цитирования: Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю. Биогенные полиамины при генитальной гонококковой инфекции: факты и гипотезы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 132–141. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-132-141>.

Biogenic polyamines and genital gonococcal infection: facts and hypotheses

Karpunina T.I.¹, Nesterova L.Yu.^{2,3}

¹ E.A. Vagner Perm State Medical University
26, Petropavlovskaya Str., Perm, 614990, Russian Federation

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Perm Federal Research Center of UB RAS
13, Golev Str., Perm, 614081, Russian Federation

³ Perm State National Research University
15, Bukirev Str., Perm, 614990, Russian Federation

ABSTRACT

Genital gonorrhoea is one of the most common sexually transmitted diseases with significant gender differences in its clinical course. Laboratory verification of the diagnosis is associated with great difficulties in the cultivation and identification of the pathogen. Moreover, the diagnosis of female gonorrhoea is a serious problem due to mild symptoms of the disease. Currently, a promising trend in the diagnosis of inflammatory diseases of reproductive organs is biochemical analysis of vaginal and sperm fluids, which have a rich component composition. Biogenic polyamines can be synthesized by both pro- and eukaryotic cells. These polycations are present in semen and vaginal fluid and can have a significant effect on various cell structures and functions. In this regard, the qualitative and quantitative composition, the level and ratio of these components and their changes can have a diagnostic value for infections of the genital tract.

The aim of the review was to analyze current information on the role of biogenic polyamines in the physiological and biochemical potential of *Neisseria gonorrhoeae* and their participation in the development of genital gonococcal infection, taking into account the influence of sexual differences and a number of related factors. Special attention was paid to the origin and possible functional role of polyamines in the genital tract of men and women. As a result, taking into account the spectrum, origin and ratio of polyamines in the corresponding fluids, we formulated a hypothesis: the manifestation of the process in case of infection in men is largely determined by the reactivity of eukaryotic cells, but not the metabolic activity of the microbiota of the reproductive tract. At the same time, the development of “female” gonorrhoea is primarily determined by the state of the microbiocenosis of the cervical vaginal biotope.

Key words: genital gonococcal infection, *Neisseria gonorrhoeae*, biogenic polyamines, microbiota, biofilms, antibiotic resistance.

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

Source of financing. The research was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research and Perm Krai Administration within scientific projects 16-44-590429 r_a and 17-44-590404 r_a.

For citation: Karpunina T.I., Nesterova L.Yu. Biogenic polyamines and genital gonococcal infection: facts and hypotheses. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 132–141. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-132-141>.

ВВЕДЕНИЕ

Гонококковая инфекция (ГИ) и ее наиболее часто встречающаяся форма – острая генитальная гонорея – инфекционное заболевание, передаваемое преимущественно половым путем, возбудителем которого является *Neisseria gonorrhoeae* [1, 2]. Лабораторное

подтверждение диагноза сопряжено с большими сложностями культивирования и идентификации возбудителя, а диагностика «женской» гонореи представляет серьезную проблему еще и в связи со стертой симптоматикой инфекционного процесса. Многие исследователи отмечают, что для диагно-

стики воспалительных заболеваний репродуктивных органов актуальным и перспективным научным направлением должно стать изучение влагалищной и спермальной жидкостей [3–6], поскольку они имеют богатейший биохимический состав, по сложности сопоставимый с кровью. Даже если учитывать только белки с молекулярной массой 10–100 кДа, то еще в 1981 г. в спермоплазме здоровых фертильных мужчин их было известно более 200 [7]. Однако весь этот огромный диагностический потенциал используется лишь в малой степени из-за отсутствия данных о физиологической роли, которую играют их различные компоненты при воспалении органов репродуктивной системы [4, 8–10]. В последнее время возрастает интерес к оценке значимости уровня биогенных полиаминов (БПА), поскольку известно, что эти соединения присутствуют во всех про- и эукариотических клетках, выполняя разнообразные, в том числе протективные, функции, а их содержание и баланс являются динамической характеристикой, регистрация изменений которой может иметь диагностический смысл. Подобные сведения, освещающие участие БПА в жизнедеятельности *N. gonorrhoeae* и развитии генитальной ГИ, представлены в немногочисленных исследованиях и носят разрозненный, зачастую противоречивый характер.

Целью настоящего обзора явилось рассмотрение накопленной к настоящему времени информации о возможной роли БПА в физиолого-биохимическом потенциале *N. gonorrhoeae* и их возможном участии в развитии генитальной гонококковой инфекции с учетом влияния половых различий и ряда сопутствующих факторов.

ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА, СИНТЕЗ И ТРАНСПОРТ БПА

Биогенные полиамины относятся к классу алифатических углеводов, имеют в составе аминокислотной цепи. В биологических объектах наиболее часто обнаруживаются диамины: путресцин (1,4-диаминобутан), кадаверин (1,5-диаминопентан); триамины: спермидин, норспермидин, и тетраамины агматин и спермин [11]. В клетках эукариотических организмов содержатся в основном спермидин и спермин, а также в следовых количествах присутствует путресцин. Эти полиамины достаточно широко представлены в различных органах, тканях и биологических жидкостях организма человека, в которых они встречаются как в составе комплексов с белками и нуклеиновыми кислотами, так и в свободно циркулирующем виде. Наивысшая концентрация спермидина и спермина обнаружена в спермоплазме мужчин, где

эти соединения присутствуют в миллимолярных концентрациях [12], в то время как в вагинальном секрете женщин полиамины детектируются в микромолярных количествах [13].

В клетках прокариот, напротив, наиболее высокая концентрация путресцина и кадаверина, а спермидин присутствует в небольших количествах и практически не детектируется спермин [11, 14, 15]. Некоторые бактерии способны продуцировать диаминопропан, гомоспермидин или норспермидин [11, 16]. У разных видов микроорганизмов качественный и количественный состав полиаминов довольно значительно отличается. На этой основе некоторыми авторами предпринимаются попытки использовать полиамины в качестве хемотаксономических маркеров [16–18]. Такой подход, однако, не выглядит перспективным, поскольку состояние полиаминового пула в клетках микроорганизмов, помимо их таксономической принадлежности, зависит от возраста культуры и условий роста: состава и pH среды, температуры, степени аэрации и т.п. [19–21].

Внутриклеточное содержание полиаминов определяется несколькими параметрами: уровнем биосинтеза, активностью процессов деградации, а также интенсивностью обмена этими компонентами между клеткой и средой. Гены, кодирующие ферменты, участвующие в биосинтезе полиаминов, обнаружены в геноме многих микроорганизмов, однако активный синтез этих соединений *de novo* характерен, в основном, для грамотрицательных бактерий [22–24].

Путресцин может синтезироваться несколькими путями: непосредственно из орнитина с помощью орнитиндекарбоксилазы или из аргинина посредством аргининдекарбоксилазы с формированием агматина, а затем с участием агматинурегидролазы, или через N-карбамоилпутресцин [25, 26]. Спермидин синтезируется на основе путресцина и S-аденозилметионина при помощи ферментов S-аденозилметионин-декарбоксилазы, аминопропилтрансферазы и спермидинсинтазы [27, 28] либо на основе путресцина и аспаргатполуальдегида с участием карбоксиспермидиндекарбоксилазы и карбоксиспермидиндегидрогеназы [29–31]. Синтез кадаверина у бактерий осуществляется прямым декарбоксилированием лизина лизиндекарбоксилазой [32]. Из всех известных ферментов синтеза полиаминов у *N. gonorrhoeae* обнаружена только аргининдекарбоксилаза, катализирующая синтез агматина – предшественника путресцина из аргинина [33]. Данных об активности этого фермента у *N. gonorrhoeae* в литературе нет, что связано, вероятно, с затруднениями при культивировании данного объекта в лабораторных условиях и получении достаточного количества биомассы.

Отсутствие у гонококков других ферментов полиаминсинтезирующей системы отчасти можно объяснить спецификой мест обитания данного микроорганизма, в которых, по крайней мере в урогенитальном тракте мужчин, в больших количествах присутствуют полиамины [12, 34], и бактерии могут получать эти соединения путем транспорта. Активно транспортировать полиамины из окружающей среды способны многие грамотрицательные бактерии.

Например, в клетках *Escherichia coli* обнаружены четыре системы транспорта этих поликатионов. Две из них (транспортирующая спермин и спермидин и в меньшей степени путресцин PotDABC и путресцин-специфичная PotFGHI) являются транспортерами ABC-класса [35], каждая состоит из периплазматического субстратсвязывающего белка (PotD и PotF), двух трансмембранных белков (PotBC и PotHI) и мембрансвязанной АТФ-азы (PotA и PotG) [36, 37]. Третья транспортная система (PotE) катализирует поглощение и экскрецию путресцина [38]. Кадаверин транспортируется посредством лизин-кадаверинового антипортера CadB [39]. В отличие от энтеробактерий транспорт полиаминов у гонококков изучен недостаточно. У *N. gonorrhoeae* обнаружена транспортная система PotFGHI, которая аналогична транспортной системе *E. coli* и селективно транспортирует в клетку из среды спермин и спермидин, но не путресцин и кадаверин [40]. Есть сведения о том, что в геноме гонококков закодирован антипорт агматин/аргинин, посредством которого из клетки может выходить агматин в обмен на аргинин, что имеет важное значение в обеспечении выживания *N. gonorrhoeae* в кислой среде [33].

УЧАСТИЕ ПОЛИАМИНОВ В ОСНОВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССАХ

Тот факт, что даже при росте на минимальных средах внутриклеточный пул БПА у многих микроорганизмов достигает довольно высоких (миллимолярных) концентраций, свидетельствует о крайней необходимости этих соединений для нормального протекания процессов жизнедеятельности. Участие полиаминов в основных клеточных процессах во многом определяется особенностями их химической структуры. При физиологических значениях pH они протонированы по атомам азота и несут положительный заряд. Через ионные взаимодействия БПА могут связываться с полианионными компонентами клетки, такими как ДНК, РНК, белки [41, 42], фосфолипиды клеточной мембраны или отдельными структурами клеточной стенки [43], обеспечивая их стабильность, поддерживая структурно-функциональную целостность, в том числе опосредованно, через транспорт-

ные процессы. Показано, что в ответ на внешние воздействия меняется концентрация этих поликатионов в клеточной оболочке, что, в свою очередь, влияет на активность белков-порин и регулирует проницаемость внешней мембраны [44–46].

БПА, как известно, принимают участие в регуляции синтеза нуклеиновых кислот, в частности процесса репликации [27], а также в поддержании конформации ДНК и РНК [47, 48]. Весьма важное значение имеет их способность воздействовать на экспрессию генов на этапах транскрипции и трансляции [37, 49]. Группа генов, экспрессия которых регулируется полиаминами на уровне трансляции, называется полиаминовым модулоном [50]. Существуют данные о том, что полиамины могут оказывать влияние на фосфорилирование специфических белков, а также модулировать их деградацию [49, 51].

О необходимости полиаминов для роста бактерий рода *Neisseria* впервые было упомянуто еще в 1952 г. [52]. Позднее было показано, что полиамины, наряду с другими катионами, стабилизируют клетки *N. gonorrhoeae*, предотвращая лизис бактерий. Эти же авторы предположили необходимость их участия для нормального протекания процесса клеточного деления [53].

УЧАСТИЕ БПА В АДГЕЗИИ, БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИИ И АГРЕГАЦИИ БАКТЕРИЙ

Целый ряд исследований последних лет указывает на то, что БПА могут принимать участие в регуляции таких процессов, как микробная адгезия, биопленкообразование и агрегация [29, 54]. В последнее время растет количество данных о том, что полиамины способны влиять на формирование биопленок различными бактериальными комменсалами и патогенами, включая *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae* и др. [42, 55–57]. Показано, что влияние на этот процесс могут оказывать не только полиамины, содержащиеся в организме хозяина, но и продуцируемые самими бактериями. В частности, норспермидин – полиамин, синтезируемый исключительно бактериями, может ингибировать формирование биопленки. Однако БПА проявляют разные эффекты в зависимости от вида бактерий. Например, в лабораторных условиях норспермидин эффективно блокирует образование биопленки *B. subtilis* и других видов бактерий и может вызывать ее дисперсию за счет нарушения структуры матрикса [58], но не ингибирует образование гонококковых биопленок и не вызывает их разрушение [59].

Находясь в семенной жидкости, содержащей высокие концентрации полиаминов, клетки *N. gonorrhoeae*

должны быть адаптированы к такой среде. Экспериментально показано, что семенная жидкость и спермин препятствуют адгезии гонококков, но способствуют агрегации бактерий и образованию микроколоний [60]. Ряд исследователей указывает на то, что спермин способствует формированию биопленки [59, 61]. Эти, на первый взгляд, противоречивые эффекты могут иметь значение для успешной колонизации биотопов и распространения *N. gonorrhoeae*. Нарушение связи с поверхностью уже закрепившихся клеток может иметь значение при передаче инфекции, в частности, когда бактерии, колонизировавшие мужскую уретру, покидают ее под воздействием спермы, обеспечивая переход к половому партнеру [60].

Возможно, с одной стороны, подобные результаты явились следствием использования специфических методических подходов для изучения влияния семенной плазмы. Если биопленкообразование, как правило, изучают в статической системе на полистироловой поверхности методом, предложенным в конце прошлого века [62], то адгезию *N. gonorrhoeae* – с использованием стекол или стеклянной проточной камеры [61]. С другой стороны, показано, что специфический тип подвижности «twitching» *N. gonorrhoeae*, который облегчается в присутствии семенной жидкости, зависит от сокращения пилей Pili. Несмотря на то, что пили необходимы для адгезии, нарушение этого процесса в присутствии спермина не зависело от наличия пилей. Агрегация гонококков в семенной плазме стимулировалась также независимо от этих поверхностных структур, что было продемонстрировано с использованием мутантов, лишенных пилей [61]. Предполагается, что БПА могут существенно влиять на способность гонококков формировать биопленки не только в мужском, но и в женском урогенитальном тракте, что связано со значительным увеличением количества спермидина и спермина при попадании спермы, в которой, к примеру, может содержаться до 15 мМ спермина [63].

Существует мнение, что полиамины способствуют переходу бактерий к формированию биопленки за счет их токсического действия. В пользу этого мнения говорит тот факт, что из четырех самых распространенных биогенных полиаминов (путресцин, кадаверин, спермидин и спермин), эффективнее других способствовал формированию биопленок спермин, который в высоких концентрациях является наиболее токсичным, особенно в отношении грамположительных микроорганизмов [64, 65]. Однако экспериментально было показано, что указанные полиамины в физиологических концентрациях не влияли на жизнеспособность планктонных гонококков. С использованием мутанта с нарушением основ-

ной транспортной системы спермина и спермидина (potHI), было продемонстрировано, что транспорт полиаминов не оказывает влияния на формирование биопленки. Авторы этого исследования считают, что, скорее всего, ключевым моментом является воздействие БПА на поверхностные структуры и стимуляция ими агрегации бактерий *N. gonorrhoeae* [40].

Изучение трехмерной структуры биопленок *N. gonorrhoeae* показало, что в присутствии спермина формировались нетипичные пленки, содержащие меньше клеток и имеющие более уплотненный матрикс, в котором почти не визуализировались каналы, обеспечивающие приток питательных веществ и кислорода, а также выведение продуктов метаболизма бактерий [40, 66]. Такие биопленки, с одной стороны, могут оказаться менее жизнеспособными, с другой – замедление метаболизма из-за дефицита, в первую очередь, питательных веществ может способствовать развитию более устойчивых к неблагоприятным воздействиям персистерных форм. В то же время изучение влияния полиаминов на уже сформированные биопленки теми же авторами показало, что ни одно из этих соединений не оказывало влияния на их дисперсию [60]. Следует отметить, что лабораторные методы оценки способности микроорганизмов к формированию биопленок, особенно в случае труднокультивируемых микроорганизмов, часто не учитывают различные аспекты влияния условий среды, которые существуют *in vivo* (рН, наличие в среде различных веществ и др.). Это также может быть причиной противоречивых результатов исследований.

ПРОТЕКТИВНАЯ РОЛЬ БПА В СЕКРЕТАХ ГЕНИТАЛИЙ

Известно, что бактерии способны синтезировать полиамины конститутивно в нормальных условиях, однако многие микроорганизмы начинают активно продуцировать эти соединения в ответ на неблагоприятные воздействия окружающей среды [21, 67, 68]. Подобные публикации начали появляться еще в конце прошлого столетия, акцентируя внимание на том, что БПА при этом выполняют защитные функции. Среди стрессовых факторов, в адаптации к которым принимают участие полиамины, можно назвать различные виды голодания, тепловой и осмотический шок, окислительный стресс, изменение рН среды и другие [20, 69, 70]. Для *N. gonorrhoeae* одним из наиболее часто встречающихся видов неблагоприятных воздействий является кислая среда. Молочная кислота, присутствующая в вагинальном секрете женщин, защищает от размножения в нем патогенных форм [71, 72]. Роль полиаминов в адаптации *N. gonorrhoeae* к низким значениям рН была

впервые продемонстрирована еще в 1976 г. [73]. В недавних исследованиях показано, что путресцин и кадаверин увеличивали выживаемость гонококков в присутствии молочной кислоты, стабилизируя клеточную стенку и мембрану [33]. Эти диамины, в основном, являются продуктами жизнедеятельности микроорганизмов и в большом количестве образуются в женском урогенитальном тракте (УГТ) при вагинозе [74], что может увеличивать вероятность развития заболевания при попадании гонококков в женский организм на его фоне.

Однако не только полиамины, но и их предшественники способны защищать бактерии от действия кислоты. Экспериментально показано, что аргинин, глутамат и лизин (аминокислоты – предшественники полиаминов), увеличивают устойчивость *E. coli* и других бактерий к микробицидному воздействию низкой pH [75]. В отношении гонококков только аргинин и агматин, но не глутамат или лизин индуцировали возрастание кислотоустойчивости [33]. Вероятно, такая разница в эффектах аминокислот связана с тем, что из всех полиаминсинтезирующих ферментов в клетках *N. gonorrhoeae* присутствует только аргининдекарбоксилаза, работа которой с образованием агматина сопровождается уменьшением кислотности среды. Агматин-аргининовый антипорт способствует выходу агматина в среду в обмен на аргинин, обеспечивая устойчивость к действию кислоты [71].

Повышение кислотоустойчивости под действием аргинина имеет практическое значение, поскольку большое количество этой аминокислоты содержится в семенной жидкости ($7,3 \pm 1,5$ мМ) [76]. Считается, что после полового акта при смешивании секретов концентрация семенного аргинина уменьшается незначительно, учитывая объемы эякулята [77] и влагалищной жидкости [78]. Таким образом, очень вероятно, что количество аргинина в семенной жидкости достаточно для того, чтобы обеспечить выживаемость гонококков и колонизацию женского вагинально-цервикального биотопа [79].

Общепризнано, что состав микробиоты влагалища крайне разнообразен и может варьировать от довольно скудного микробного спектра, характеризующегося преобладанием небольшого количества видов лактобактерий, до сложных анаэробных сообществ, обуславливающих развитие бактериального вагиноза [80–83]. Бактериальный вагиноз может иметь множество неблагоприятных последствий для репродуктивного здоровья, в том числе повышенный риск заражения инфекциями, передаваемыми половым путем [84–86], вирусом иммунодефицита человека [87, 88], преждевременные роды [89], воспаленные органы малого таза [90] и цервицит [91]. При

бактериальном вагинозе наблюдается значительное увеличение содержания путресцина и кадаверина во влагалищном секрете с одновременным уменьшением содержания их предшественников – аминокислот, в особенности аргинина и орнитина. Путресцин и кадаверин в данном биотопе продуцируются, главным образом, бактериями [74, 92, 93], о чем свидетельствует ингибирование их накопления в присутствии метронидазола [94], обладающего бактерицидным действием.

Интересно отметить, что наличие различных воспалительных заболеваний урогенитального тракта мужчин сопровождается снижением количества полиаминов в эякуляте и значительным изменением их соотношения [95]. Обращает на себя внимание то, что даже при выраженной бактериоспермии, содержание «бактериальных» полиаминов не достигает значений, сопоставимых с таковыми во влагалищной жидкости. Вероятно, причиной этого является влияние кислотности на процессы метаболизма поликатионов, поскольку оптимумы pH индуцибельных ферментов их синтеза лежат в области более низких значений [19], которые характерны, например, для влагалища у женщин. Полиамины в этом случае могут быть побочными продуктами, которые образуются при защите бактерий от кислотного стресса [96, 97]. Однако показано, что с увеличением pH увеличивается летучесть короткоцепочечных полиаминов [98, 99]. Это может также служить причиной невысоких детектируемых концентраций свободных путресцина и кадаверина в спермоплазме.

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ В ПРИСУТСТВИИ БПА

В литературе есть сведения о том, что полиамины способствуют выживанию микроорганизмов при действии антибиотиков. В основном это показано на грамотрицательных бактериях *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. [69, 70, 100]. Экспериментально доказано снижение их чувствительности к различным классам антибактериальных препаратов (бета-лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны) в присутствии БПА [69, 70, 101]. Поскольку секреты урогенитального тракта, в первую очередь мужчин, богаты полиаминами, такими как спермин и спермидин, предполагается, что эти соединения могли бы защищать гонококки от действия противомикробных препаратов. В доступной литературе мы подобных данных не встретили. Показано, что полиамины защищают гонококки от катионных антимикробных пептидов (полимиксин В и LL-37), однако не наблюдается защитного эффекта в присутствии

ципрофлоксацина, спектиномицина и пенициллина [102]. Отсутствие влияния полиаминов на антибиотикочувствительность *N. gonorrhoeae* выглядит довольно неожиданно, поскольку их протективное действие связывают с такими универсальными механизмами, как деактивация активных форм кислорода, которые образуются при действии антибиотика на клетку [70], снижение проницаемости пориновых каналов [45], через которые в клетку поступают некоторые антибиотики, в частности фторхинолоны, и другими механизмами. Безусловно, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хорошо известно, что генитальная ГИ по-разному протекает у мужчин и женщин. Для «мужской» гонореи наиболее характерна яркая клиническая картина, с обильным гнойным отделяемым. Напротив, у женщин заболевание, как правило, не сопровождается патогномичной симптоматикой, нередко они узнают о ГИ, заражая своего полового партнера. Тем интереснее выглядят различия в спектре и содержании БПА в эякуляте и влагалищной жидкости. Складывается впечатление, что манифестация процесса в первом случае в большей степени обусловлена реактивностью эукариотических клеток, но не метаболической активностью микробиоты репродуктивного тракта мужчин. В то же время развитие «женской» гонореи в первую очередь определяет состояние микробиоценоза цервикально-вагинального биотопа, на что косвенно указывает происхождение полиаминов, доминирующих в составе соответствующих секретов. Представляется, что диагностическое, прогностическое и дифференцирующее значение содержания и спектра БПА в репродуктивном тракте мужчин и женщин при генитальной гонококковой инфекции, как, впрочем, и других инфекциях, передающихся половым путем, еще предстоит определить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stevens J.S., Criss A.K. Pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* in the female reproductive tract: neutrophilic host response, sustained infection, and clinical sequelae. *Curr. Opin. Hematol.* 2018; 25 (1): 13–21. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000394.
2. Hook E., Handsfield H. Gonococcal infections in adults. In: Holmes K.K., Sparling P.F., Mardh P.-A., Lemon S.M., Stamm W.E., Piot P., Wasserheit J.N. (ed.). Sexually transmitted diseases, 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1999: 451–466.
3. Липатова Н.А. Лабораторные критерии фертильности эякулята. *Клиническая лабораторная диагностика.* 1998; (5): 11–15.
4. Евдокимов В.В., Ерасова В.В., Орлова Е.В. Белковые маркеры фертильности. *Андрология и генитальная хирургия.* 2004; (4): 30–32.
5. Boe-Hansen G.B., Fedder J., Ersboll A.K., Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 2006; 21 (6): 1576–1582. DOI: 10.1093/humrep/del019.
6. Krawetz S.A., Kruger A., Lalancette C., Tagett R., Anton E., Draghici S., Diamong M.P. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum. Reprod.* 2011; 26 (12): 3401–3412. DOI: 10.1093/humrep/der329.
7. Edwards I.S. Postvasectomy testing: reducing the delay. *Med. J. Aust.* 1981; 1 (12): 649.
8. Бойко О.В., Терентьев А.А., Николаев А.А. Методические аспекты использования солянокислых спермина и спермидина для идентификации уропатогенной микрофлоры. *Проблемы репродукции.* 2010; 16 (3): 77–79.
9. Аль-Шукри С.Х., Бобков Ю.А., Галкина О.В., Горбачев А.Г., Козлов В.В., Томолян А.А. Информативность иммунологического анализа крови и эякулята в диагностике хронического простатита. *Урология.* 2002; (2): 24–27.
10. Pattinson R.C., Snyman L.C., Macdonald A.P. Evaluation of a strict protocol approach in managing women with severe disease due to abortion. *S. Afr. Med. J.* 2006; 96 (11): 1191–1194. DOI: 10.7196/SAMJ.1345.
11. Michael A.J. Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *J. Biol. Chem.* 2016; 291 (29): 14896–14903. DOI: 10.1074/jbc.R116.734780.
12. Lefèvre P.L., Palin M.F., Murphy B.D. Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr. Rev.* 2011; 32 (5): 694–712. DOI: 10.1210/er.2011-0012.
13. Mendonca K., Costa C., Ricci V., Pozzi G. Enzymatic assay to test diamines produced by vaginal bacteria. *New Microbiol.* 2015; 38 (2): 267–270.
14. Herbst E.J., Weaver R.H., Keister D.L., The gram reaction and cell composition: diamines and polyamines. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958; 75 (1): 171–177. DOI: 10.1016/0003-9861(58)90407-7.
15. Pegg A.E., Michael A.J. Spermine synthase. *Cell Mol. Life Sci.* 2010; 67 (1): 113–121. DOI: 10.1007/s00018-009-0165-5.
16. Hamana K., Matsuzaki S. Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics. *Crit. Rev. Microbiol.* 1992; 18 (4): 261–283. DOI: 10.3109/10408419209113518.
17. Hamana K., Nakagawa Y. Polyamine distribution profiles in newly validated genera and species within the *Flavobacterium-Flexibacter-Cytophaga-Sphingobacterium* complex. *Microbios.* 2001; 106 (2): 105–116.
18. Hosoya R., Hamana K., Niitsu M., Itoh T. Polyamine analysis for chemotaxonomy of thermophilic eubacteria: polyamine distribution profiles within the orders *Aquificales*, *Thermotogales*, *Thermodesulfobacteriales*, *Thermales*, *Thermoanaerobacteriales*, *Clostridiales* and *Bacillales*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2004; 50 (5): 271–287. DOI: 10.2323/jgam.50.271.
19. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 1985; 49 (1): 81–99.
20. Ткаченко А.Г., Пшеничных М.Р., Салахетдинова О.Я., Нестерова Л.Ю. Роль транспорта путресцина и калия в регуляции топологического состояния ДНК в процессе адаптации *Escherichia coli* к температурному стрессу. *Микробиология.* 1998; 67 (5): 601–606.
21. Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В. Адаптивные функции полиаминов *Escherichia coli* при сублетальных

- воздействиях антибиотиков. *Микробиология*. 2009; 78 (1): 32–41.
22. Morris D.R., Koffron K.L. Putrescine biosynthesis in *Escherichia coli* regulation through pathway selection. *J. Biol. Chem.* 1969; 244 (22): 6094–6099.
 23. Glansdorff N. Biosynthesis of arginine and polyamines. *EcoSal Plus*. 2004; 1 (1). DOI: 10.1128/ecosalplus.3.6.1.10.
 24. Michael A.J. Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. *Biochem. J.* 2016; 473 (15): 2315–2329. DOI: 10.1042/BCJ20160185.
 25. Pegg A.E. 2006 Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 2006; 281 (21): 14529–14532. DOI: 10.1074/jbc.R500031200.
 26. Burrell M., Hanfrey C.C., Murray E.J., Stanley-Wall N.R., Michael A.J. Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential role in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *J. Biol. Chem.* 2010; 285 (50): 39224–39238. DOI: 10.1074/jbc.M110.163154.
 27. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines. *Annu. Rev. of Biochem.* 1984; 53: 749–790. DOI: 10.1146/annurev.bi.53.070184.003533.
 28. Pegg A.E. S-Adenosylmethionine decarboxylase. *Essays Biochem.* 2009; 46: 25–45. DOI: 10.1042/bse0460003.
 29. Lee J., Sperandio V., Frantz D.E., Longgood J., Camilli A., Phillips M.A., Michael A.J. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 2009; 284 (15): 9899–9907. DOI: 10.1074/jbc.M900110200.
 30. Hanfrey C.C., Pearson B.M., Hazeldine S., Lee J., Gaskin D.J., Woster P.M., Phillips M.A., Michael A.J. Alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in human gut microbiota. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (50): 43301–43312. DOI: 10.1074/jbc.M111.307835.
 31. Ohnuma M., Terui Y., Tamakoshi M., Mitome H., Niitsu M., Samejima K., Kawashima E., Oshima T. N1-aminopropylagmatine, a new polyamine produced as a key intermediate in polyamine biosynthesis of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (34): 30073–30082. DOI: 10.1074/jbc.M413332200.
 32. Nagano T., Kikuchi Y., Kamio Y. High expression of the second lysine decarboxylase gene, *ldc*, in *Escherichia coli* WC196 due to the recognition of the stop codon (TAG), at a position which corresponds to the 33th amino acid residue of sigma38, as a serine residue by the amber suppressor, *supD*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000; 64 (9): 2012–2017. DOI: 10.1271/bbb.64.2012.
 33. Gong Z., Tang M.M., Wu X., Phillips N., Galkowski D., Jarvis G.A., Fan H. Arginine- and polyamine-induced lactic acid resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS One*. 2016; 11 (1): e0147637. DOI: 10.1371/journal.pone.0147637.
 34. Coffino P. Polyamines in spermiogenesis: not now, darling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97 (9): 4421–4423. DOI: 10.1073/pnas.97.9.4421.
 35. Pistocchi R., Kashiwagi K., Miyamoto S., Nukui E., Sadakata Y., Kobayashi H., Igarashi K. Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps at 19 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (1): 146–152.
 36. Igarashi K., Ito K., Kashiwagi K. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 2001; 152 (3–4): 271–278. DOI: 10.1016/s0923-2508(01)01198-6.
 37. Igarashi K., Kashiwagi K. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol. Biochem.* 2010; 48 (7): 506–512. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.01.017.
 38. Kashiwagi K., Shibuya S., Tomitori H., Kuraishi A., Igarashi K. Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (10): 6318–6323. DOI: 10.1074/jbc.272.10.6318.
 39. Soksawatmaekhin W., Kuraishi A., Sakata K., Kashiwagi K., Igarashi K. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2004; 51 (5): 1401–1412. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03913.x.
 40. Goytia M., Hawel L., Dhulipala V.L., Joseph S.J., Read T.D., Shafer W.M. Characterization of a spermine/spermidine transport system reveals a novel DNA sequence duplication in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 362 (16). DOI: 10.1093/femsle/fnv125.
 41. Bachrach U. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005; 6 (6): 559–566. DOI: 10.2174/138920305774933240.
 42. Michael A.J. Polyamine function in archaea and bacteria. *J. Biol. Chem.* 2018; 293 (48): 18693–18701. DOI: 10.1074/jbc.TM118.005670.
 43. Souza H. Fluorescence polarization studies on *Escherichia coli* membrane stability and its relation to the resistance of the cell to freeze-thawing. II. Stabilization of the membranes by polyamines. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986; 861 (2): 361–367. DOI: 10.1016/0005-2736(86)90439-6.
 44. Samartzidou H., Mehrazin M., Xu Z., Benedik M.J., Delcour A.H. Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH/H. *J. Bacteriol.* 2003; 185 (1): 13–19. DOI: 10.1128/jb.185.1.13-19.2003.
 45. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67 (4): 593–656. DOI: 10.1128/mmbr.67.4.593-656/2003.
 46. Williams K. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* 1997; 325 (2): 289–297. DOI: 10.1042/bj3250289
 47. Katz A.M., Tolokh I.S., Pabit S.A., Baker N., Onufriev A.V., Pollack L. Spermine condenses DNA, but not RNA duplexes. *Biophys. J.* 2017; 112 (1): 22–30. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.11.018.
 48. Gevrekci A.Ö. The roles of polyamines in microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 33 (11): 204. DOI: 10.1007/s11274-017-2370-y.
 49. Bae D.H., Lane D.J.R., Jansson P.J., Richardson D.R. The old and new biochemistry of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2018; 1862 (9): 2053–2068. DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.06.004.
 50. Igarashi K., Kashiwagi K. Polyamine Modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. *J. Biochem.* 2006; 139 (1): 11–16. DOI: 10.1093/jb/mvj020.
 51. Corella D., Guillén M., Hernández J.M., Hernández-Yago J. Effect of polyamine levels on the degradation of short-lived

- and long-lived proteins in cultured L-132 human lung cells. *Biochem. J.* 1998; 334 (2): 367–375.
52. Martin W.H. Jr., Pelczar M.J. Jr., Hansen P.A. Putrescine as a growth requirement for *Neisseria*. *Science.* 1952; 116 (3018): 483–484. DOI: 10.1126/science.116.3018.483.
53. Elmros T., Burman L.G., Bloom G.D. Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 1976; 126 (2): 969–976.
54. Anderson M.T., Byerly L., Apicella M.A., Seifert H.S. Seminal plasma promotes *Neisseria gonorrhoeae* aggregation and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2016; 198 (16): 2228–2235. DOI: 10.1128/JB.00165-16.
55. Patel C.N., Wortham B.W., Lines J.L., Fetherston J.D., Perry R.D., Oliveira M.A. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (7): 2355–2363. DOI: 10.1128/JB.188.7.2355-2363.2006.
56. Li B., Maezato Y., Kim S.H., Kurihara S., Liang J., Michael A.J. Polyamine-independent growth and biofilm formation, and functional spermidine/spermine N-acetyltransferases in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* 2019; 111 (1): 159–175. DOI: 10.1111/mmi.14145.
57. Wotanis C.K., Brennan W.P., Angotti A.D., Villa E.A., Zayner J.P., Mozina A.N., Rutkovsky A.C., Sobe R.C., Bond W.G., Karatan E. Relative contributions of norspermidine synthesis and signaling pathways to the regulation of *Vibrio cholerae* biofilm formation. *PLoS One.* 2017; 12 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0186291.
58. Oppenheimer-Shaanan Y., Steinberg N., Kolodkin-Gal I. Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. *Trends Microbiol.* 2013; 21 (11): 594–601. DOI: 10.1016/j.tim.2013.08.005.
59. Goytia M., Dhulipala V.L., Shafer W.M. Spermine impairs biofilm formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013; 343 (1): 64–69. DOI: 10.1111/1574-6968.12130.
60. Anderson M.T., Byerly L., Apicella M.A., Seifert H.S. Seminal plasma promotes *Neisseria gonorrhoeae* aggregation and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2016; 198 (16): 2228–2235. DOI: 10.1128/JB.00165-16.
61. Anderson M.T., Dewenter L., Maier B., Seifert H.S. Seminal plasma initiates a *Neisseria gonorrhoeae* transmission state. *MBio.* 2014; 5 (2): e01004–01013. DOI: 10.1128/mBio.01004-13.
62. O'Toole G.A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 1998; 30 (2): 295–304. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.
63. Bachrach U. Metabolism and function of spermine and related polyamines. *Annu. Rev. Microbiol.* 1970; 24: 109–134. DOI: 10.1146/annurev.mi.24.100170.000545.
64. Peng Y.C., Lu C., Li G., Eichenbaum Z., Lu C.D. Induction of the pho regulon and polyphosphate synthesis against spermine stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 2017; 104 (6): 1037–1051. DOI: 10.1111/mmi.13678.
65. Yao X., Lu C.D. Characterization of *Staphylococcus aureus* responses to spermine stress. *Curr. Microbiol.* 2014; 69 (3): 394–403. DOI: 10.1007/s00284-014-0603-y.
66. Greiner L.L., Edwards J.L., Shao J., Rabinak C., Entz D., Apicella M.A. Biofilm formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* 2005; 73 (4): 1964–1970. DOI: 10.1128/IAI.73.4.1964-1970.2005.
67. Kanjee U., Gutsche I., Alexopoulos E., Zhao B., El Bakouri M., Thibault G., Liu K., Ramachandran S., Snider J., Pai E.F., Houry W.A. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *EMBO J.* 2011; 30 (5): 931–944. DOI: 10.1038/emboj.2011.5.
68. Kanjee U., Gutsche I., Ramachandran S., and Houry W. A. The enzymatic activities of the *Escherichia coli* basic aliphatic amino acid decarboxylases exhibit a pH zone of inhibition. *Biochemistry.* 2011; 50 (43): 9388–9398. DOI: 10.1021/bi201161k.
69. Nastro H.G., Algranati I.D. Effect of polyamines on plasmid mediated kanamycin resistance and kanamycin phosphotransferase gene expression in *Escherichia coli*. *Cell Mol. Biol.* 1996; 42 (5): 711–717.
70. Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nesterova L.Y. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. *Res. Microbiol.* 2012; 163 (2): 83–91. DOI: 10.1016/j.resmic.2011.10.009.
71. Gong Z., Luna Y., Yu P., Fan H. Lactobacilli inactivate *Chlamydia trachomatis* through lactic acid but not H₂O₂. *PLoS One.* 2014; 9 (9): e107758. DOI: 10.1371/journal.pone.0107758.
72. Aldunate M., Tyssen D., Johnson A., Zakir T., Sonza S., Moench T. Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68 (9): 2015–2025. DOI: 10.1093/jac/dkt156.
73. Elmros T., Sandstrom G., Burman L. Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae* relation between mechanical stability and viability. *Brit. J. Vener. Dis.* 1976; 52 (4): 246–249. DOI: 10.1136/sti.52.4.246.
74. Chen K.C., Forsyth P.S., Buchanan T.M., Holmes K.K. Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with nonspecific vaginitis. *J. Clin. Invest.* 1979; 63 (5): 828–835. DOI: 10.1172/JCI109382.
75. Kanjee U., Houry W.A. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2013; 67: 65–81. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155708.
76. Zini A., O'Bryan M.K., Schlegel P.N. Nitric oxide synthase activity in human seminal plasma. *Urology.* 2001; 58 (1): 85–89. DOI: 10.1016/s0090-4295(01)01001-9.
77. Owen D.H., Katz D.F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J. Androl.* 2005; 26 (4): 459–469. DOI: 10.2164/jandrol.04104.
78. Mitchell C., Paul K., Agnew K., Gaussman R., Coombs R.W., Hitti J. Estimating volume of cervicovaginal secretions in cervicovaginal lavage fluid collected for measurement of genital HIV-1 RNA levels in women. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (2): 735–736. DOI: 10.1128/JCM.00991-10.
79. Richard H.T., Foster J.W. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* 2003; 52: 167–186. DOI: 10.1016/s0065-2164(03)01007-4.
80. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Marrazzo J.M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353 (18): 1899–1911. DOI: 10.1056/NEJMoa043802.
81. Hillier S., Marrazzo J.M., Holmes K.K. Bacterial vaginosis. In: Holmes K.K., Sparling P.A. (ed). Sexually transmitted diseases, 4rd ed. New York: McGraw-Hill, 2008: 737–768.

82. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S., McCulle S.L., Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C.O., Brotman R.M., Davis C.C., Ault K., Peralta L., Forney L.J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108 (1): 4680–4687. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.
83. Srinivasan S., Hoffman N.G., Morgan M.T., Matsen F.A., Fiedler T.L., Hall R.W., Ross F.J., McCoy C.O., Bumgarner R., Marrazzo J.M., Fredricks D.N. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One*. 2012; 7 (6): e37818. DOI: 10.1371/journal.pone.0037818.
84. Buve A., Jespers V., Crucitti T., Fichorova R.N. The vaginal microbiota and susceptibility to HIV. *AIDS*. 2014; 28 (16): 2333–2344. DOI: 10.1097/qad.0000000000000432.
85. Allsworth J.E., Peipert J.F. Severity of bacterial vaginosis and the risk of sexually transmitted infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011; 205 (2): 113. e1–6. DOI: 10.1016/j.ajog.2011.02.060.
86. Schwabke J.R., Desmond R. Risk factors for bacterial vaginosis in women at high risk for sexually transmitted diseases. *Sex Transm. Dis.* 2005; 32 (11): 654–658. DOI: 10.1097/01.olq.0000175396.10304.62.
87. Taha T.E., Hoover D.R., Dallabetta G.A., Kumwenda N.I., Mtshabalala L.A., Yang L.P., Liomba G.N., Broadhead R.L., Chipangwi J.D., Miotti P.G. Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS*. 1998; 12 (13): 1699–1706. DOI: 10.1097/00002030-199813000-00019.
88. Hummel R., Fernandes A.D., Macklaim J.M., Dickson R.J., Changalucha J., Gloor G.B., Reid G. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV. *PLoS One*. 2010; 5 (8): e12078. DOI: 10.1371/journal.pone.0012078.
89. Hillier S.L., Krohn M.A., Cassen E., Easterling T.R., Rabe L.K., Eschenbach D.A. The role of bacterial vaginosis and vaginal bacteria in amniotic fluid infection in women in preterm labor with intact fetal membranes. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20 (2): 276–278. DOI: 10.1093/clinids/20.Supplement 2.S276.
90. Haggerty C.L., Hillier S.L., Bass D.C., Ness R.B. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39 (7): 990–995. DOI: 10.1086/423963.
91. Marrazzo J.M., Wiesenfeld H.C., Murray P.J., Busse B., Meyn L., Krohn M., Hillier S.L. Risk factors for cervicitis among women with bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 2006; 193 (5): 617–624. DOI: 10.1086/500149.
92. Srinivasan S., Morgan M.T., Fiedler T.L., Djukovic D., Hoffman N.G., Raftery D., Marrazzo J.M., Fredricks D.N. Metabolic signatures of bacterial vaginosis. *MBio*. 2015; 6 (2). DOI: 10.1128/mBio.00204-15.
93. Wolrath H., Forsum U., Larsson P.G., Borén H. Analysis of bacterial vaginosis-related amines in vaginal fluid by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39 (11): 4026–4031. DOI: 10.1128/JCM.39.11.4026-4031.2001.
94. Chen K.C., Amsel R., Eschenbach D.A., Holmes K.K. Biochemical diagnosis of vaginitis: determination of diamines in vaginal fluid. *J. Infect. Dis.* 1982; 145 (3): 337–345. DOI: 10.1093/infdis/145.3.337.
95. Богданов Ю.А., Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю., Ахова А.В. О диагностической значимости содержания полиаминов в эякуляте инфертильных мужчин при асимптомных воспалительных процессах. *Андрология и генитальная хирургия*. 2013; 14 (3): 19–22. DOI: 10.17650/2070-9781-2013-3-19-22.
96. Meng S.Y., Bennett G.N. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J. Bacteriol.* 1992; 174 (8): 2659–2669. DOI: 10.1128/jb.174.8.2659-2669.1992.
97. Iyer R., Williams C., Miller C. Arginine -agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2003; 185 (22): 6556–6561. DOI: 10.1128/jb.185.22.6556-6561.2003.
98. Sobel J.D. Bacterial vaginosis. *Ann. Rev. Med.* 2000; 51: 349–56. DOI: 10.1146/annurev.med.51.1.349.
99. Giacomini G., Calcinai A., Moretti D., Cristofani R. Accuracy of cervical/vaginal cytology in the diagnosis of bacterial vaginosis. *Sex Transm. Dis.* 1998; 25 (1): 24–27. DOI: 10.1097/00007435-199801000-00006.
100. Kwon D.H., Lu C.D. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50 (5): 1615–1622. DOI: 10.1128/AAC.50.5.1615-1622.2006.
101. Kwon D.H., Lu C.D. Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51 (6): 2070–2077. DOI: 10.1128/AAC.01472-06.
102. Goytia M., Shafer W.M. Polyamines can increase resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to mediators of the innate human host defense. *Infect. Immun.* 2010; 78 (7): 3187–3195. DOI: 10.1128/IAI.01301-09.

Сведения об авторах

Карпунина Тамара Исаковна, д-р биол. наук, профессор, кафедра микробиологии и вирусологии, ПГМУ, г. Пермь. ORCID 0000-0003-2511-4656.

Нестерова Лариса Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория адаптации микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН, Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь; кафедра физиологии растений и микроорганизмов, ПГНИУ, г. Пермь. ORCID 0000-0003-2885-2777.

(✉) **Карпунина Тамара Исаковна**, e-mail: karpuninapsma@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Технологии виртуальной реальности в комплексной медицинской реабилитации пациентов с детским церебральным параличом

Карякин Н.Н., Шейко Г.Е., Воловик М.Г., Белова А.Н.

Приволжский исследовательский медицинский университет (ПИМУ)
Россия, 603155, г. Нижний Новгород, Верхне-Волжская наб., 18/1

РЕЗЮМЕ

Обзор посвящен вопросам применения технологий виртуальной реальности (VR) в медицинской реабилитации пациентов с детским церебральным параличом (ДЦП). Обобщены современные данные касательно использования VR в восстановлении двигательных, координаторных функций, а также коррекции других расстройств, сопутствующих двигательным нарушениям у пациентов с ДЦП. Анализ работ, представленных в отечественной и зарубежной литературе, показывает, что в настоящее время нельзя однозначно говорить об эффективности VR в реабилитации пациентов с ДЦП. Это связано с рядом методологических недостатков проанализированных работ (небольшой размер изучаемой выборки, отсутствие контроля результатов в отдаленный период). Тем не менее использование технологий VR с целью улучшения различных функций у пациентов с ДЦП является перспективным методом медицинской реабилитации.

Ключевые слова: виртуальная реальность, реабилитация, детский церебральный паралич.

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

Источники финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Карякин Н.Н., Шейко Г.Е., Воловик М.Г., Белова А.Н. Технологии виртуальной реальности в комплексной медицинской реабилитации пациентов с детским церебральным параличом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 142–152. <https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2020-2-142–152>.

Virtual reality technologies in complex medical rehabilitation of patients with cerebral palsy

Karyakin N.N., Sheiko G.E., Volovik M.G., Belova A.N.

Privolzhskiy Research Medical University
18/1, Verkhne-Volzhska Emb., Nizhny Novgorod, 603155, Russian Federation

ABSTRACT

The review highlights the issue of applying virtual reality (VR) technologies in medical rehabilitation of patients with cerebral palsy (CP). This review generalizes the current evidence on the use of virtual reality in restoration of motor and coordination functions, as well as in correction of other diseases associated with motor disorders in patients with CP. The analysis of national and international research shows that at present it is impossible to speak unambiguously about the efficiency of VR in rehabilitation of patients with CP. This is explained by some

methodological shortcomings of the analyzed works (small size of the studied samples, lack of control over the results in the long term). However, the use of VR technologies for improving various functions in patients with CP is a promising method of medical rehabilitation.

Key words: virtual reality, rehabilitation, cerebral palsy.

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

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

For citation: Karyakin N.N., Sheiko G.E., Volovik M.G., Belova A.N. Virtual reality technologies in complex medical rehabilitation of patients with cerebral palsy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 142–152. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-142-152>.

ВВЕДЕНИЕ

Детский церебральный паралич (ДЦП) относится к группе стабильных нарушений движения и поддержания позы, ведущих к двигательным дефектам, вследствие непрогрессирующего повреждения и (или) аномалии развивающегося головного мозга у плода или новорожденного ребенка [1–3]. ДЦП представляет актуальную проблему современной медицины, так как является основной неврологической причиной детской инвалидности во всем мире, затрагивающей семью, образование и социальную жизнь ребенка [4]. Распространенность ДЦП составляет 2–3,6 случая на 1 000 детей [5]. Грамотный выбор методов и сроков реабилитации позволяет социально адаптировать детей с данной патологией и улучшить прогноз их двигательного и психического развития [2].

На данный момент существует множество методов медицинской реабилитации больных с ДЦП, эффективность которых зависит от реабилитационного потенциала пациента, а также комплекса подобранных процедур [6]. Среди основных реабилитационных мероприятий на данный момент выделяют следующие: ортезирование; физическая реабилитация (массаж, лечебная гимнастика, аппаратная кинезиотерапия, роботизированная механотерапия), в том числе основанная на принципе биологической обратной связи; хирургические ортопедические вмешательства на конечностях; хирургическая коррекция деформаций позвоночника у детей с ДЦП; ботулинотерапия [7]. Основной целью в реабилитации больных ДЦП является помощь ребенку в достижении максимально возможного уровня физической, когнитивной, психологической и социальной независимости [2].

Тем не менее сохраняется актуальность разработки и внедрения новых эффективных и безопасных методов реабилитации больных с ДЦП, нацеленных

на восстановление двигательной активности. При этом крайне важно использовать методы лечения, которые будут не только эффективными, но интересными для детей, вызывать вовлеченность пациента в процесс реабилитации, что, несомненно, должно сказаться и на результате [8]. Мотивация и активное участие детей в процессе реабилитации играют ключевую роль [9].

В настоящее время все большую популярность приобретают технологии виртуальной реальности (VR), которые, по различным данным, способны значительно улучшить результаты реабилитационного лечения [10, 11]. Технология VR является компьютерной симуляцией реальной среды и призвана обеспечить чувство присутствия с помощью 3D-изображения и анимации, а также позволить взаимодействовать с различными объектами данной среды [12, 13].

Технологии VR берут начало своего применения в 1950-х гг., как правило, с развлекательной целью. В середине 1960-х гг. потенциал их использования был признан исследователями из самых разных областей, в том числе в медицине [14]. В дальнейшем технологии VR показали положительные результаты в лечении акрофобии [15], зуда [16], болевых синдромов [17], посттравматического стрессового расстройства, депрессии и бессонницы [18]. Также был выявлен высокий потенциал VR в реабилитации пациентов с ДЦП [19], у детей с расстройствами аутистического спектра [20–22], пациентов с болезнью Паркинсона [23], Альцгеймера [24] и рассеянным склерозом [25]. Высокая эффективность технологии VR в медицинской реабилитации обусловлена достижением эффекта погружения, что позволяет отвлечь внимание пациента от боли, дискомфорта, снизить тревожность или неудовлетворенность лечением [26].

Ощущение погружения в VR обеспечивается с помощью использования очков, специальных шлемов, проекторов, перчаток с сенсорами, а также язы-

ка кодирования Virtual Reality Modeling Language (VRML), предназначенного для описания трехмерных изображений. Участие или погружение пациента в ВР может быть реализовано в следующих вариантах: активном, когда пользователь управляет виртуальным образом (аватаром) или конкретным объектом; пассивном, когда производится просмотр видеороликов без активного управления [27]. ВР в отличие от других форм визуализации (видеоигры, телевидение) позволяет взаимодействовать с различными объектами в реальном времени [28].

Пользователь в искусственно созданной виртуальной среде может почувствовать опыт, аналогичный событиям и действиям в реальной жизни [29]. Пациент может видеть, ощущать объекты и события, манипулировать ими и перемещать их в виртуальном пространстве. Таким образом создается «эффект присутствия» [30]. Наибольшая эффективность применения ВР с позиций доказательной медицины выявлена при восстановлении функции ходьбы [31] и манипулятивной функции верхней конечности [32], что достигается за счет создания виртуальной среды, максимально приближенной к реальной, а также формирования мотивации к активному участию пациента в реабилитационных мероприятиях [32, 33]. Именно активное вовлечение пациента в процесс тренировки в виртуальной среде, в ходе которой можно осознавать и исправлять свои ошибки при выполнении движений, позволяет достичь высоких результатов в обучении больного двигательным навыкам [34, 35]. ВР-тренировка способствует эффективному оттачиванию движений в том контексте, в котором они должны применяться в жизни благодаря трем ключевым элементам, необходимым для улучшения моторных функций: повторение стимуляции, сенсорная обратная связь, мотивация пациентов [26, 35].

Восстановление двигательного дефицита при использовании ВР в нейрореабилитации связано с активизацией механизмов пластичности мозга, в том числе с изменениями в первичной сенсомоторной коре и дополнительной двигательной области [35, 36]. Это знание позволяет расширять спектр нозологий, при которых с помощью ВР удается достигнуть значимых результатов [37, 38].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВР-ТЕХНОЛОГИЙ В НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИИ У БОЛЬНЫХ С ДЦП

Одним из перспективных направлений в коррекции двигательных и сопутствующих нарушений у пациентов с ДЦП является использование ВР в качестве дополнительного способа реабилитации [39]. Применение ВР у детей с ДЦП быстро набрало попу-

лярность, поскольку компьютерные технологии являются мотивирующими для детей и молодежи [40]. Стоит заметить, что недостаточная мотивация может помешать пациенту раскрыть свой функциональный потенциал [9, 41]. ВР позволяет выполнять сложные движения в безопасной среде, предоставляет возможность активного обучения [2, 9].

Ряд исследований указывает на положительное влияние ВР на реорганизацию мозговых структур, нейропластичность, двигательные способности пациента, зрительную перцепцию, социальные особенности поведения и личностные качества [2, 19, 42]. Положительная особенность применения ВР заключается в том, что учитывается реальная ежедневная деятельность пациента [43].

Существует множество различных систем ВР, среди них Virtual Rehab, Caren, Nirvana, Tyromotion, MiTii и др. Одной из самых распространенных является система Virtual Rehab – реабилитационная платформа, использующая коммерчески доступные сенсоры Microsoft Kinect и Leap Motion, а также технологию видеоигр, предназначенную для восстановления двигательных функций конечностей. ВР-терапия с применением сенсоров Microsoft Kinect и Nintendo Wii доказала свою эффективность в улучшении выполнения физических упражнений и повышении физической активности [44].

Оборудование для ВР отличается высокой стоимостью и сложностью, что предопределяет использование данных систем только в условиях клиники. Тем не менее разрабатываются игровые системы для домашнего пользования: Tyromotion Pablo для тренировки кисти и пальцев; Тумо для тренировки равновесия и силы; The Interactive Rehabilitation Exercise System (IREX) с технологией погружения и контроля жестов; системы You Grabber и You Kicker для тренировки движений верхней и нижней конечностей. Превращение лечения в игру повышает внимание ребенка к выполнению тех или иных упражнений по сравнению с обычным лечением [45, 46] и, что особенно важно, с возможностью использования ВР-технологий на дому [47].

В настоящее время активно разрабатываются и внедряются в реабилитационную практику игры с использованием ВР для пациентов с ДЦП, которые будут терапевтически релевантными и в то же время интересными для самих пациентов [48]. Во многих исследованиях применения ВР в реабилитации детей с ДЦП оценивается эффективность в зависимости от достигаемой цели: восстановление функции верхней и (или) нижней конечности, постурального контроля и равновесия; улучшение физической подготовки и тренировка сердечно-сосудистой системы [42, 49].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВР-ТЕХНОЛОГИЙ В ВОССТАНОВЛЕНИИ ФУНКЦИИ ВЕРХНЕЙ КОНЕЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ДЦП

Одной из наиболее приоритетных задач восстановления бытовой и социальной активности пациентов с ДЦП является улучшение базовых моторных навыков верхней конечности, таких как способность координировать движения двух рук, достигнуть объект и манипулировать им [50].

J.W. Yoo и соавт. провели исследование, в котором оценивали эффективность использования биологической обратной связи с применением ВР по электромиографии (ЭМГ-биофидбэк) у пациентов ($n = 18$) с различными формами ДЦП (средний возраст $9,5 \pm 1,9$ года) для улучшения функции верхней конечности. Все пациенты с ДЦП прошли один 30-минутный сеанс ЭМГ-биофидбэк, а затем через 1 нед еще один 30-минутный сеанс ЭМГ-биофидбэк и ВР. Результаты оценивали по ряду тестов: диапазон движения локтевого сустава, тест «коробка и кубик», сила бицепса. После применения ЭМГ-биофидбэка совместно с ВР выявлялось статистически значимое улучшение по всем тестам ($p < 0,05$). Данное исследование является первым клиническим испытанием, которое продемонстрировало эффективность применения ЭМГ-биофидбэк совместно с ВР у пациентов с ДЦП для улучшения функции верхней конечности [51].

G. Asar и соавт. изучили эффективность применения ВР (Nintendo Wii) для улучшения функции верхней конечности у пациентов с гемипаретической формой ДЦП ($n = 30$) с уровнем двигательных нарушений I–II по Международной шкале классификации моторных функций пациента (Global Motor Function Classification System, GMFCS). Пациенты были разделены на две группы по 15 человек в зависимости от получаемого комплекса реабилитационных мероприятий. В первой группе (средний возраст $9,5 \pm 3,0$ года) выполнялось традиционное неврологическое лечение (30 мин) с применением технологии ВР (теннис, бокс, бейсбол – по 5 мин каждая). Во второй группе (средний возраст $9,7 \pm 2,9$ года) – только традиционное неврологическое лечение (45 мин).

Все пациенты получали 45-минутное лечение два раза в неделю в течение 6 нед. Функция верхних конечностей до и после лечения оценивались с помощью теста навыков верхней конечности (Quality of Upper Extremity Skills Test, QUEST), функционального теста кисти Джебсона – Тейлора (Jebesen–Taylor Hand Function Test), детского теста ABILHAND и Меры функциональной независимости (Pediatric

Functional Independence Measure (self-care)). Результаты исследования продемонстрировали более выраженное улучшение функции верхней конечности у пациентов с гемиплегической формой ДЦП, которым применялось традиционное неврологическое лечение совместно с ВР [52].

Кроме того, был проведен ряд пилотных исследований, где была определена высокая эффективность использования систем ВР в улучшении функции верхней конечности у пациентов с гемиплегической формой ДЦП [47, 53]. Одной из наиболее популярных систем для восстановления функции верхней конечности и планирования движений является программа MiTi (move it to improve it – двигайся, чтобы стать лучше), использующая интерактивную компьютерную игру, которая управляется с помощью движений кистей и тела. Система предусматривает дистанционную настройку и проверку прогресса, а также возможность придать серии игр индивидуальный характер. В настоящее время в университете Квинсленда (Австралия) проводятся рандомизированные клинические испытания системы ВР MiTi для оценки эффективности в улучшении функции верхней конечности, а также для того, чтобы глубже понять центральные нейроваскулярные механизмы, обуславливающие изменения функций верхней конечности, планирования движений и исполнительской функции [54].

Несмотря на положительные результаты применения ВР для улучшения функции верхней конечности у больных ДЦП, имеются противоречивые данные. Так, в систематическом обзоре C. Rathinam и соавт. из шести проанализированных работ только в четырех наблюдалось улучшение. В двух других никаких изменений после включения ВР в реабилитационные мероприятия не отмечалось [55].

Таким образом, на данный момент невозможно утверждать о высокой эффективности применения технологии ВР для восстановления функции верхней конечности в реабилитации пациентов с ДЦП. Крайне важно проводить контроль отдаленных результатов, в частности оценку применения навыков, полученных в процессе реабилитации в реальных жизненных ситуациях и действиях.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВР-ТЕХНОЛОГИЙ В ВОССТАНОВЛЕНИИ ФУНКЦИИ НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ (ХОДЬБЫ) У ПАЦИЕНТОВ С ДЦП

Восстановление функции нижних конечностей у пациентов с ДЦП является ключевой и наиболее сложной задачей медицинской реабилитации. Целью исследований, связанных коррекцией двигательных

нарушений нижних конечностей при ДЦП, как правило, является улучшение ходьбы [9].

C. Gagliardi и соавт. провели пилотное исследование по оценке эффективности иммерсивной (от англ. *immersive* – создающий эффект присутствия, погружения) ВР, применяемой для улучшения ходьбы у пациентов с ДЦП. В исследование были включены 16 детей (средний возраст $(11 \pm 2,4)$ года) со спастической тетраплегией, посещающих общеобразовательную школу. Реабилитация была сосредоточена на восстановлении навыков ходьбы и выносливости с использованием интерактивной лаборатории анализа походки в реальном времени (*Gait Real-time Analysis Interactive Lab, GRAIL*). Все пациенты прошли 18 сеансов терапии за 4 нед. Эффективность применения системы ВР GRAIL оценивалась с использованием функциональных и инструментальных методов, включая анализ походки и применения опросника «оценка глобальных моторных функций» (*Gross Motor Function Measure 88, GMFM-88*). Спустя 4 нед после начала реабилитационных мероприятий с применением технологии ВР наблюдалось улучшение характера ходьбы (длина шага слева и справа ($p = 0,001$; $0,003$); скорость ходьбы ($p = 0,001$)), выносливости (6-минутный тест ходьбы ($p = 0,026$)), глобальных моторных функций (*GMFM-88* ($p = 0,041$)), а также других кинематических и кинетических параметров [56].

A.T.C. Booth и соавт. провели систематический обзор и метаанализ работ с 1980 по 2017 г., посвященных оценке эффективности применения технологии ВР для улучшения походки у детей с ДЦП. Всего в данную работу было включено 41 исследование, из них 11 контролируемых рандомизированных исследований. Было определено, что применение технологии ВР для функциональной тренировки походки у пациентов с ДЦП приводит к клиническим значимым положительным результатам. Установлено, что функциональная тренировка походки оказывает умеренное положительное влияние на скорость ходьбы по сравнению со стандартной физиотерапией ($p = 0,04$). Также выявлены более слабые, но относительно последовательные доказательства того, что функциональная тренировка походки с применением ВР также может улучшить ходьбу и общие двигательные функции, связанные с ней. Авторы утверждают, что функциональная тренировка походки с применением ВР является безопасным, осуществимым и эффективным методом улучшения ходьбы у детей с ДЦП. Кроме того, добавление методов ВР и биологической обратной связи к реабилитационным мероприятиям у пациентов с ДЦП может повысить мотивацию пациента и улучшить результаты лечения [57].

Тем не менее также существуют противоречивые данные касательно эффективности технологий ВР в улучшении ходьбы у пациентов с ДЦП. Например, D. Levas и соавт. провели пилотное нерандомизированное контролируемое исследование, в которое были включены две группы пациентов с различными формами ДЦП. В первой группе ($n = 5$) пациентам с ДЦП выполнялся один сеанс в день ВР в течение 5 дней в условиях стационара, далее в домашних условиях в течение 6 нед применялись активные видеоигры. Во второй группе ($n = 6$) использовались только активные видеоигры в домашних условиях в течение 6 нед. У всех пациентов оценивалась ходьба с помощью 6-минутного теста ходьбы (*6-minute Walk Test, 6MWT*) и глобальные моторные функции по шкале *GMFM-88*.

По результатам данного исследования различий между группами не выявлено. В группе, где применялись активные видеоигры в домашних условиях в течение 6 нед, отмечалось статистически значимое улучшение показателей по *GMFM-88* ($p = 0,042$). В первой группе, где применялась ВР в условиях клиники и активные видеоигры в домашних условиях, выявлено улучшение по *6MWT* ($p = 0,043$). Несмотря на это, значения по *6MWT* через 2 мес вернулись к исходному уровню. Таким образом, авторы делают вывод, что ни методы ВР, ни активные видеоигры не улучшили двигательные функции у пациентов с ДЦП [58].

Тем не менее сохраняется актуальность применения технологии ВР для восстановления функции нижней конечности. В настоящий момент уже разработаны протоколы, по которым проводятся клинические исследования эффективности технологий ВР в восстановлении функции нижних конечностей (ходьбы) у пациентов с ДЦП [59, 60]. При этом данные протоколы, что крайне важно, предусматривают оценку отдаленных результатов реабилитационных мероприятий.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВР-ТЕХНОЛОГИЙ В ВОССТАНОВЛЕНИИ ФУНКЦИИ ПОСТУРАЛЬНОГО КОНТРОЛЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ РАВНОВЕСИЯ (БАЛАНС, КООРДИНАЦИЯ) У ПАЦИЕНТОВ С ДЦП

Постуральный контроль, координация движений и равновесие являются ключевыми факторами, обеспечивающими большинство функциональных навыков, в особенности ходьбу и поддержание положения тела в пространстве. Основной причиной нарушения постурального контроля является усиление коактивации мышц агонистов и антагонистов, а так-

же снижение регуляции постурального сокращения мышц к специфике ситуации [61]. В последние годы часть исследований касательно применения ВР были сосредоточены на оценке улучшения постурального контроля и координации движений у пациентов с ДЦП [62, 63].

Первым исследованием с применением ВР для восстановления постурального контроля является работа J.E. Deutsch и соавт., в которой представлен клинический пример с ретро- и проспективным наблюдением. В исследование был включен ребенок 13 лет со спастической диплегией, которому проведено лечение с использованием игровой системы Nintendo Wii в течение 11 сеансов по 60–90 мин на протяжении 4 нед. По результатам наблюдения отмечалось улучшение постурального контроля, зрительного восприятия и функциональной мобильности [64].

В работе С. Gordon и соавт. применялась система Nintendo Wii в качестве метода реабилитации детей с дискинетической формой ДЦП. Всего в исследовании были включены шесть пациентов в возрасте 6–12 лет. Выполнялось по два реабилитационных сеанса в неделю на протяжении 6 нед. В результате использования системы ВР у всех детей отмечалось улучшение постурального контроля и двигательных функций [8].

В исследовании D. Sharan и соавт. приняли участие 16 человек, из них восемь пациентов с ДЦП входили в исследуемую группу (средний возраст $(8,9 \pm 3,2)$ года) и восемь детей без патологии – в контрольную (средний возраст $(10,4 \pm 4,4)$ года). Для реабилитации применялась система ВР Nintendo Wii sports и Wii fit. Оценка двигательной активности производилась с использованием системы классификации мануальных способностей для детей с церебральным параличом (Manual Ability Classification System, MACS) и педиатрической шкалы баланса (Pediatric Balance Score, PBS). В результате проведенного исследования положительный эффект был отмечен по шкале PBS. В отношении мануальных навыков различий по сравнению с контрольной группой не выявлено. Таким образом, исследователи показали, что использование систем ВР Nintendo Wii sports и Wii fit оказывает положительное влияние на функцию поддержания равновесия пациента с ДЦП [29]. Также существуют другие работы, в которых применение технологий ВР продемонстрировали высокую эффективность в улучшении функции постурального контроля и поддержания равновесия у детей с ДЦП [65, 66].

В 2018 г. D. Cano Porrás и соавт. провели систематический обзор 97 статей, 68 из которых опубликованы в 2013 г. и позже. В данном обзоре делается

вывод, что применение технологий ВР имеет положительный эффект на восстановление равновесия и походки, а также приносит дополнительные преимущества в сочетании с традиционной реабилитацией [67]. Также существуют данные касательно положительного эффекта от совместного применения транскраниальной стимуляции и ВР на поддержание равновесия [68].

Таким образом, включение ВР-технологий в реабилитационные мероприятия с целью улучшения постурального контроля и равновесия у пациентов с ДЦП имеет положительные перспективы.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВР-ТЕХНОЛОГИЙ В УЛУЧШЕНИИ ФИЗИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ И ТРЕНИРОВКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С ДЦП

Активные видеоигры, которые получили в последнее время большую популярность среди детей и подростков, считаются оптимальной альтернативой пассивным компьютерным играм. Физическая активность и физическая подготовленность у детей с ДЦП снижены по сравнению с их здоровыми сверстниками, и большую часть времени они проводят сидя, в том числе перед экраном монитора [69].

В нескольких исследованиях изучалось влияние активных игр с применением методов ВР на физическую активность у детей с ДЦП при домашнем использовании. Данные работы показали, что активные игры умеренно улучшают физическую активность, а также снижают время, проведенное сидя перед экраном монитора [70, 71].

ВЛИЯНИЕ ВР-ТЕХНОЛОГИИ НА СОПУТСТВУЮЩИЕ ДЦП СИНДРОМЫ

Большинство детей с ДЦП страдают от нескольких сопутствующих расстройств в дополнение к двигательным нарушениям. К данным расстройствам относятся поведенческие, когнитивные нарушения, а также неспособность к обучению, что, в свою очередь, оказывает влияние на общие двигательные функции. Примерно у 40% пациентов с ДЦП диагностируется синдром гиперактивности и дефицита внимания [2]. Существует ряд исследований, которые показали положительное влияние применения технологий ВР у пациентов с ДЦП на когнитивные функции и поведенческие расстройства [72, 73].

M. Pourazar и соавт. провели рандомизированное контролируемое исследование по оценке эффективности применения ВР для улучшения времени реакции у детей с ДЦП. Тридцать мальчиков от 7 до 12 лет были включены в исследование и разделены

на две группы (исследуемая и контрольная). У всех пациентов исходно и через 1 сут проводили измерение времени реакции (Simple Reaction Time, SRT), а также оценку дискриминантного времени реакции (Discriminative Reaction Time, DRT). В исследуемой группе между двумя измерениями проводили сеанс ВР с использованием приставки Xbox. По результатам исследования было показано, что у пациентов с ДЦП после сеанса уменьшается время реакции. Авторы считают, что системы ВР являются перспективным инструментом в реабилитационном процессе для улучшения времени реакции у детей с ДЦП [74].

На данный момент рассматривается возможность применения технологий ВР для коррекции орально-лицевых нарушений у детей с ДЦП. Например, M.L. Martín-Ruiz и соавт. считают, что выполнение реабилитационных мероприятий с применением метода ВР под названием SONRIE может улучшить процесс глотания, управление мышцами лица, а также речь детей с ДЦП. Следующие шаги сосредоточены на валидации SONRIE для проведения процесса реабилитации челюстно-лицевой мускулатуры у детей с ДЦП [75].

J.W. Shin и соавт. изучили влияние традиционного неврологического лечения и программы обучения ВР на координацию движений глаз и рук у детей с ДЦП. В исследование были включены 16 пациентов с диплегической формой ДЦП. В контрольной группе ($n = 8$) пациенты выполняли лечебную физкультуру в течение 45 мин два раза в неделю на протяжении 8 нед. В исследуемой группе ($n = 8$) пациенты выполняли лечебную физкультуру (30 мин) и тренировку с использованием подходов ВР (15 мин) два раза в неделю. Результаты исследования показали значительное улучшение координации движений глаз совместно с верхними конечностями в исследуемой группе. Авторы утверждают, что хорошо разработанная программа обучения с использованием ВР может улучшить координацию глаз и верхних конечностей у детей с ДЦП [76].

Таким образом, применение технологий ВР у больных ДЦП позволяет не только улучшить функцию конечностей, ходьбу, постуральный контроль и равновесие, но и оказать положительное влияние на такие социально значимые функции, как поведение, мимика, время реакции, координация движений рук и глаз и др.

НЕДОСТАТКИ ПРИМЕНЕНИЯ ВР-ТЕХНОЛОГИЙ

Несмотря на положительные результаты исследований по оценке эффективности технологий ВР в реабилитации пациентов с ДЦП, существует ряд не-

достатков, связанных с их применением. До сих пор многие системы ВР не адаптированы для пациентов с ДЦП с выраженной спастикой (степень спастичности 2 DRT,4 по шкале Эшворта). В данном случае речь идет об играх, где требуется использование пульта дистанционного управления. На данный момент разрабатываются игры, которые способны индивидуально адаптироваться к сниженным функциям пациента с ДЦП [77]. К примеру, компания Sony (Япония) разработала сенсорную перчатку для игровой приставки SonyPlay Station 3, а также несколько игр, которые используются в технологиях ВР у пациентов с ДЦП с дисфункцией верхних конечностей [78]. Также существует «Система интерактивных реабилитационных упражнений» (The Interactive Rehabilitation Exercise System, IREX), в которой используется технология обнаружения и захвата движения, что облегчает взаимодействие пациента с игровой системой [79].

Кроме того, большинство игр для ВР, доступных в продаже, могут быть слишком сложны для пациентов с ДЦП, а специальные программы, адаптированные под определенные двигательные нарушения, требуют применения дополнительных технических устройств, а также отличаются высокой стоимостью [9].

Также стоит отметить, что существующие программы ВР содержат ограниченное количество игр, что снижает мотивацию к длительному обучению. В своем исследовании S.G. Owners и соавт. отмечали сокращение времени, проведенного за игрой, спустя 6 нед использования. Длительность тренировки с использованием Nintendo Wii fit снижалась на 82% за первые 6 нед использования [80].

Помимо этого, существует ряд факторов, ограничивающих применение технологий ВР. Например, D. Levas и соавт. провели опрос канадских специалистов по физиотерапии и трудотерапии о клиническом использовании системы ВР в реабилитационных мероприятиях, а также о факторах, препятствующих ее применению. Всего был опрошен 1 071 респондент. Факторами, препятствующими использованию, являлись нехватка денежных средств, помещений с необходимой площадью, времени, персонала и пациентов с соответствующей патологией [81].

Стоит отметить, что недостатком многих работ, касающихся применения ВР-технологий в реабилитации детей с ДЦП, является небольшое число пациентов, включенных в исследование, что, скорее всего, связано с рядом ограничений: этический аспект их применения, а также недоверие родителей к новым методам реабилитации, эффективность которых еще до конца не определена [46, 81].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технологии виртуальной реальности только начинают свой путь интеграции в комплекс реабилитационных мероприятий у пациентов с ДЦП. Технологии ВР создают трехмерную виртуальную среду и способны обеспечить визуальную, аудио- и тактильную обратную связь для полного погружения пациента. Таким образом, они открывают новые возможности в медицинской реабилитации пациентов с ДЦП, так как виртуальная среда предоставляет оптимальные условия для улучшения двигательных функций, постурального контроля, равновесия, общей двигательной активности и сопутствующих синдромов, а интерактивные игры повышают мотивацию к терапии.

Потенциальная роль виртуальной моторной реабилитации многообещающая, но ранние свидетельства недостаточны. На данный момент имеются противоречивые данные касательно применения ВР-технологий в реабилитации пациентов с ДЦП, что, вероятно, связано с размером изучаемой выборки, сроками наблюдения, а также оцениваемыми показателями исхода. Необходима дальнейшая разработка подходов ВР, подробное исследование эффективности и безопасности данного метода реабилитации, в особенности влияния на повседневную функциональную активность пациентов с ДЦП.

ЛИТЕРАТУРА

- Kantak S.S., Stinear J.W., Buch E.R., Cohen L.G. Rewiring the brain: potential role of the premotor cortex in motor control, learning, and recovery of function following brain injury. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2012; 26 (3): 282–292. DOI: 10.1177/1545968311420845.
- Mintaze K.G., Ozgun K.K., Cemil O., Duygu T. Virtual reality in rehabilitation of children with cerebral palsy. In book: *Cerebral palsy – challenges for the future*. 2014: 273–300. DOI: 10.5772/57486.
- Meyer-Heim A., van Hedel H.J. Robot-assisted and computer-enhanced therapies for children with cerebral palsy: current state and clinical implementation. *Seminars in Pediatric Neurology*. 2013; 20 (2): 139–145. DOI: 10.1016/j.spen.2013.06.006.
- Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Кузенкова Л.М., Куренков А.Л., Клочкова О.А., Мамедъяров А.М., Каримова Х.М., Бурсагова Б.И., Вишнева Е.А. Детский церебральный паралич у детей. Клинические рекомендации, 2017: 62.
- Oskoui M., Coutinho F., Dykeman J., Jette N., Pringsheim T. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev. Med. Child Neurol*. 2013; 55 (6): 509–519. DOI: 10.1111/dmcn.12080.
- Полякова А.Г. Реабилитационный прогноз на базе интегративной оценки адаптационного потенциала больного с ограниченными возможностями. *Медицинский альманах*. 2018; 5 (56): 84–88. DOI: 10.21145/2499-9954-2018-5-84-88.
- Abbaskhanian A., Rashedi V., Delpak A., Vameghi R., Gharib M. Rehabilitation interventions for children with cerebral palsy: a systematic review. *Pediatr. Rev*. 2015; 3 (1): 1–8. DOI: 10.5812/jpr.361.
- Gordon C., Roopchand-Martin S., Gregg A. Potential of the Nintendo Wii as a Rehabilitation Tool for Children with Cerebral Palsy in a Developing Country: A Pilot Study. *Physiotherapy*. 2012; 98 (3): 238–242. DOI: 10.1016/j.physio.2012.05.011.
- Tatla S.K., Sauve K., Virji-Babul N., Holsti L., Butler C., van der Loos H.F. Evidence for outcomes of motivational rehabilitation interventions for children and adolescents with cerebral palsy: an American Academy for Cerebral Palsy and Developmental Medicine Systematic Review. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 2013; 55 (7): 593–601. DOI: 10.1111/dmcn.12147.
- Dascal J., Reid M., Ishak W.W., Spiegel B., Recacho J., Rosen B., Danovitch I. Virtual Reality and Medical Inpatients: A Systematic Review of Randomized, Controlled Trials. *Innov. Clin. Neurosci*. 2017; 14 (1–2): 14–21.
- Hung Y.C., Gordon A.M. Virtual reality training for children with unilateral cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol*. 2018; 60 (4): 334–335. DOI:10.1111/dmcn.13699.
- Riener R., Harders M. Virtual reality in medicine. London: Springer, 2012: 1–2. DOI: 10.1007/978-1-4471-4011-5.
- Jung E.Y., Park D.K., Lee Y.H., Jo H.S., Lim Y.S., Park R.W. Evaluation of practical exercises using an intravenous simulator incorporating virtual reality and haptics device technologies. *Nurse Educ. Today*. 2012; 32 (4): 458–463. DOI: 10.1016/j.nedt.2011.05.012.
- Andolsek D. Virtual reality in education and training. *International Journal of Instructional Media*. 1995; 22 (2): 145–151.
- Rothbaum B.O., Hodges L.F., Kooper R., Opdyke D., Williford J.S., North M. Effectiveness of computer-generated (virtual reality) graded exposure in the treatment of acrophobia. *Am. J. Psychiatry*. 1995; 152 (4): 626–628. DOI: 10.1176/ajp.152.4.626.
- Mochizuki H., Schut C., Nattkemper L.A., Yosipovitch G. Brain mechanism of itch in atopic dermatitis and its possible alteration through non-invasive treatments. *Allergol. Int*. 2017; 66 (1): 14–21. DOI: 10.1016/j.alit.2016.08.013.
- Jones T., Moore T., Choo J. The impact of virtual reality on chronic pain. *PLoS ONE*. 2016; 11 (12): e0167523. DOI: 10.1371/journal.pone.0167523.
- Lewis G.N., Rosie J.A. Virtual reality games for movement rehabilitation in neurological conditions: how do we meet the needs and expectations of the users? *Disabil. Rehabil*. 2012; 34 (22): 1880–1886. DOI: 10.3109/09638288.2012.670036.
- Weiss P.L., Tirosh E., Fehlings D. Role of virtual reality for cerebral palsy management. *J. Child Neurol*. 2014; 29 (8): 1119–1124. DOI: 10.1177/0883073814533007.
- Forbes P.A.G., Pan X., Hamilton A.F. de C. Reduced mimicry to virtual reality avatars in autism spectrum disorder. *J. Autism. Dev. Disord*. 2016; 46 (12): 3788–3797. DOI: 10.1007/s10803-016-2930-2.
- Duffield T.C., Parsons T.D., Landry A., Karam S., Otero T., Mastel S., Hall T. Virtual environments as an assessment modality with pediatric ASD populations: a brief report. *Child*

- Neuropsychology* September. 2017; 24 (8): 1129–1136. DOI: 10.1080/09297049.2017.1375473.
22. Zapata-Fonseca L., Froese T., Schilbach L., Vogeley K., Timmermans B. Sensitivity to social contingency in adults with high-functioning Autism during computer-mediated. *Embodied Interaction Behav. Sci.* 2018; 8 (2): 22. DOI: 10.3390/bs8020022.
 23. Dockx K., Bekkers E.M.J., van den Bergh V., Ginis P., Rochester L., Hausdoff J.M., Mirelman A., Nieuwboer A. Virtual reality for rehabilitation in Parkinson's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2016; 12: CD010760. DOI: 10.1002/14651858.CD010760.pub2.
 24. Garcia-Betances R.I., Waldmeyer M.T.A., Fico G., Cabrera-Umpierrez M.F. A succinct overview of virtual reality technology use in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2015; 7: 80. DOI: 10.3389/fnagi.2015.00080.
 25. Massetti T., Trevizan I.L., Arab C., Favero F.M., Ribeiro-Papa D.C., de Mello Monteiro C.B. Virtual reality in multiple sclerosis – a systematic review. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2016; 8: 107–112. DOI: 10.1016/j.msard.2016.05.014.
 26. Teo W.P., Muthalib M., Yamin S., Hendy A., Bramstedt K., Kotsopoulos E., Perrey S., Ayaz H. Does a Combination of Virtual Reality, Neuromodulation and Neuroimaging Provide a Comprehensive Platform for Neurorehabilitation? A Narrative Review of the Literature. *Front. Hum. Neurosci.* 2016; 10: 284. DOI: 10.3389/fnhum.2016.00284. eCollection 2016.
 27. Iamsakul K., Pavlovic A.V., Calderon J.I., Sanderson L.M. Project heaven preoperative training in virtual reality. *Surg. Neurol. Int.* 2017; 8: 59. DOI: 10.4103/sni.sni_371_16.
 28. Basso Moro S., Biscconti S., Muthalib M., Spezialetti M., Cutilini S., Ferrari M., Placidi G., Quaresima V. A semi-immersive virtual reality incremental swing balance task activates prefrontal cortex: a functional near-infrared spectroscopy study. *Neuroimage.* 2014; 85: 451–460. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.031.
 29. Sharan D., Ajeesh P.S., Rameshkumar R., Mohandoss M., Rivas P. Virtual reality based therapy for post operative rehabilitation of children with cerebral palsy. *Work.* 2012; 41 (Suppl. 1): 3612–3615. DOI: 10.3233/WOR-2012-0667-3612.
 30. Fehlings D., Switzer L., Findlay B., Knights S. Interactive computer play as “motor therapy” for individuals with cerebral palsy. *Seminars in Pediatric Neurology.* 2013; 20 (2): 127–138. DOI: 10.1016/j.spen.2013.06.003.
 31. Moreira M.C., de Amorim Lima A.M., Ferraz K.M., Benedetti Rodrigues M.A. Use of virtual reality in gait recovery among post stroke patients – a systematic literature review. *Disabil. Rehabil. Assist. Technol.* 2013; 8 (5): 357–362. DOI: 10.3109/17483107.2012.749428.
 32. Piggott L., Wagner S., Ziat M. Haptic neurorehabilitation and virtual reality for upper limb paralysis: a review. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2016; 44 (1–2): 1–32. DOI: 10.1615/CritRev-BiomedEng.2016016046.
 33. Dimbwadyo-Terrer I., Gil-Agudo A., Segura-Fragoso A., de los Reyes-Guzmán A., Trincado-Alonso F., Piazza S., Polonio-López B. Effectiveness of the virtual reality system Toyra on upper limb function in people with tetraplegia: a pilot randomized clinical trial. *Biomed. Res. Int.* 2016; 2016 (6): 1–12. DOI: 10.1155/2016/6397828.
 34. Parsons T.D. Virtual reality for enhanced ecological validity and experimental control in the clinical, affective and social neurosciences. *Front. Hum. Neurosci.* 2015; 9: 660. DOI: 10.3389/fnhum.2015.00660.
 35. Faria A.L., Andrade A., Soares L., Badia S.B. Benefits of virtual reality based cognitive rehabilitation through simulated activities of daily living: a randomized controlled trial with stroke patients. *J. Neuroeng. Rehabil.* 2016; 13 (1): 96. DOI: 10.1186/s12984-016-0204-z.
 36. Yeh S.C., Huang M.C., Wang P.C., Fang T.Y., Su M.C., Tsai P.Y., Rizzo A. Machine learning-based assessment tool for imbalance and vestibular dysfunction with virtual reality rehabilitation system. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2014; 16 (3): 311–318. DOI: 10.1016/j.cmpb.2014.04.014.
 37. Pozeg P., Palluel E., Ronchi R., Solcà M., Al-Khodairy A.W., Jordan X., Kassouha A., Blanke O. Virtual reality improves embodiment and neuropathic pain caused by spinal cord injury. *Neurology.* 2017; 89 (18): 1894–1903. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004585.
 38. Chen L., Lo W.L.A., Mao Y.R., Ding M.H., Lin Q., Li H., Zhao J.L., Xu Z.Q., Bian R.H., Huang D.F. Effect of Virtual reality on postural and balance control in patients with stroke: a systematic literature review. *BioMed Research International.* 2016; 2016: 8. DOI: 10.1155/2016/7309272.
 39. Ravi D.K., Kumar N., Singhi P. Effectiveness of virtual reality rehabilitation for children and adolescents with cerebral palsy: an updated evidence-based systematic review. *Physiotherapy.* 2017; 103 (3): 245–258. DOI: 10.1016/j.physio.2016.08.004.
 40. Winkels D.G., Kottink A.I., Temmink R.A., Nijlant J.M.M., Buurke J.H. Wii-habilitation of upper extremity function in children with cerebral palsy. An explorative study. *Developmental Neurorehabilitation.* 2013; 16 (1): 44–51. DOI: 10.3109/17518423.2012.713401.
 41. Chen Y., Fanchiang H.D., Howard A. Effectiveness of Virtual Reality in Children with Cerebral Palsy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trails. *Phys. Ther.* 2018; 98 (1): 63–77. DOI: 10.1093/ptj/pzx107.
 42. Matijevic V., Secic A., Masic V., Sunic M., Kolak Z., Znika M. Virtual reality in rehabilitation and therapy. *Acta Clin. Croat.* 2013; 52 (4): 453–457.
 43. Robert M.T., Levin M.F. Validation of reaching in a virtual environment in typically developing children and children with mild unilateral cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol.* 2018; 60 (4): 382–390. DOI: 10.1111/dmcn.13688.
 44. Clutterbuck G., Auld M., Johnston L. Active Exercise Interventions Improve Gross Motor Function of Ambulant/Semi-Ambulant Children with Cerebral Palsy: a Systematic Review. *Disabil. Rehabil.* 2018; 5: 1–21. DOI: 10.1080/09638288.2017.1422035.
 45. Howcroft J., Klejman S., Fehlings D., Wright F.V., Zabjek K., Andrysek J., Biddiss E. Active video game play in children with cerebral palsy: potential for physical activity promotion and rehabilitation therapies. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.* 2012; 93 (8): 1448–1456. DOI: 10.1016/j.apmr.2012.02.033.
 46. Ni L., Fehlings D., Biddiss E. Clinician and child assessment of virtual reality therapy games for motor rehabilitation of ce-

- rebral palsy. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2014; 95 (10): e105. DOI: 10.1016/j.apmr.2014.07.323.
47. Chen Y.P., Garcia-Vergara S., Howard A.M. Effect of a Home-Based Virtual Reality Intervention for Children with Cerebral Palsy Using Super Pop VR Evaluation Metrics: A Feasibility Study. *Rehabil. Res. Pract.* 2015; 2015: 812348. DOI: 10.1155/2015/812348.
 48. Ni L.T., Fehlings D., Biddiss E. Design and evaluation of virtual reality-based therapy games with dual focus on therapeutic relevance and user experience for children with cerebral palsy. *Games Health J.* 2014; 3 (3): 162–171. DOI: 10.1089/g4h.2014.0003.
 49. Ren K., Gong X.M., Zhang R., Chen X.H. Effects of virtual reality training on limb movement in children with spastic diplegia cerebral palsy. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*. 2016; 18 (10): 975–979.
 50. Bodimeade H., Whittingham K., Lloyd O., Boyd R.N. Executive Functioning in Children with Unilateral Cerebral Palsy: Cross-Sectional Study Protocol. *BMJ Open*. 2013; 3 (4): e002500. DOI: 10.1136/bmjopen-2012-002500.
 51. Yoo J.W., Lee D.R., Cha Y.J., You S.H. Augmented effects of EMG biofeedback interfaced with virtual reality on neuromuscular control and movement coordination during reaching in children with cerebral palsy. *NeuroRehabilitation*. 2017; 40 (2): 175–185. DOI: 10.3233/NRE-161402.
 52. Acar G., Altun G.P., Yurdalan S., Polat M.G. Efficacy of neurodevelopmental treatment combined with the Nintendo® Wii in patients with cerebral palsy. *J. Phys. Ther. Sci.* 2016; 28 (3): 774–780. DOI: 10.1589/jpts.28.774.
 53. Do J.H., Yoo E.Y., Jung M.Y., Park H.Y. The effects of virtual reality-based bilateral arm training on hemiplegic children's upper limb motor skills. *NeuroRehabilitation*. 2016; 38 (2): 115–127. DOI: 10.3233/NRE-161302.
 54. Boyd R.N., Mitchell L.E., James S.T., Ziviani J., Sakzewski L., Smith A., Rose S., Cunningham R., Whittingham K., Ware R.S., Comans T.A., Scuffham P.A. Move it to improve it (Mitii): study protocol of a randomised controlled trial of a novel web-based multimodal training program for children and adolescents with cerebral palsy. *BMJ Open*. 2013; 3 (4): 1–21.
 55. Rathinam C., Mohan V., Peirson J., Skinner J., Nethaji K.S., Kuhn I. Effectiveness of virtual reality in the treatment of hand function in children with cerebral palsy: a systematic review. *J. Hand Ther.* 2018; S0894-1130(17)30107-2. DOI: 10.1016/j.jht.2018.01.006.
 56. Gagliardi C., Turconi A.C., Biffi E., Maghini C., Marelli A., Cesareo A., Diella E. Immersive Virtual Reality to Improve Walking Abilities in Cerebral Palsy: A Pilot Study. *Ann. Biomed. Eng.* 2018; 46 (9): 1376–1384. DOI: 10.1007/s10439-018-2039-1.
 57. Booth A.T.C., Buizer A.I., Meyns P., Lansink I.O., Steenbrink F., van der Kroft M. The efficacy of functional gait training in children and young adults with cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev. Med. Child. Neurol.* 2018; 60 (9): 866–883. DOI: 10.1111/dmcn.13708.
 58. Levac D., McCormick A., Levin M.F., Brien M., Mills R., Miller E., Sveistrup H. Active Video Gaming for Children with Cerebral Palsy: Does a Clinic-Based Virtual Reality Component Offer an Additive Benefit? A Pilot Study. *Phys. Occup. Ther. Pediatr.* 2018; 38 (1): 74–87. DOI: 10.1080/01942638.2017.1287810.
 59. Pavão S.L., Arnoni J.L., de Oliveira A.K., Rocha N.A. Impact of a Virtual Reality-Based Intervention on Motor Performance and Balance of a Child with Cerebral Palsy: a Case Study. *Rev. Paul. Pediatr.* 2014; 32 (4): 389–394. DOI: 10.1016/j.rpped.2014.04.005.
 60. Hilderley A.J., Fehlings D., Lee G.W., Wright F.V. Comparison of a Robotic-Assisted Gait Training Program with a Program of Functional Gait Training for Children with Cerebral Palsy: Design and Methods of a Two Group Randomized Controlled Cross-Over Trial. *Springerplus*. 2016; 5 (1): 1886. DOI: 10.1186/s40064-016-3535-0.
 61. Mendoza S.M., Gómez-Conesa A., Montesinos M.D.H. Association between Gross Motor Function and Postural Control in Sitting in Children with Cerebral Palsy: a Correlational Study in Spain. *BMC Pediatr.* 2015; 15: 124. DOI: 10.1186/s12887-015-0442-4.
 62. Gatica-Rojas V., Cartes-Velásquez R., Guzmán-Muñoz E., Mendez-Redolledo G., Soto A., Pacheco A., Amigo C., Albornoz-Verdugo M., Elgueta-Cancino E.L. Effectiveness of a Nintendo Wii Balance Board Exercise Programme on Standing Balance of Children with Cerebral Palsy: A Randomised Clinical Trial Protocol. *Contemp. Clin. Trials Commun.* 2017; 6: 17–21. DOI: 10.1016/j.conctc.2017.02.008.
 63. Mao Y., Chen P., Li L., Huang D. Virtual reality training improves balance function. *Neural. Regen. Res.* 2014; 9 (17): 1628–1634. DOI: 10.4103/1673-5374.141795.
 64. Deutsch J.E., Borbely M., Filler J., Huhn K., Guarrera-Bowly P. Use of a low-cost, commercially available gaming console (Wii) for rehabilitation of an adolescent with cerebral palsy. *Physical Therapy*. 2008; 88 (10): 1196–1207. DOI: 10.2522/ptj.20080062.
 65. Meyns P., Pans L., Plasmans K., Heyrman L., Desloovere K., Molenaers G. The Effect of Additional Virtual Reality Training on Balance in Children with Cerebral Palsy after Lower Limb Surgery: A Feasibility Study. *Games Health J.* 2017; 6 (1): 39–48. DOI: 10.1089/g4h.2016.0069.
 66. Tarakci D., Ersoz Huseyinsinoglu B., Tarakci E., Razak Ozdincler A. Effects of Nintendo Wii-Fit® video games on balance in children with mild cerebral palsy. *Pediatr. Int.* 2016; 58 (10): 1042–1050. DOI: 10.1111/ped.12942.
 67. Cano Porras D., Siemonsma P., Inzelberg R., Zeiling G., Plotnik M. Advantages of virtual reality in the rehabilitation of balance and gait: systematic review. *Neurology*. 2018; 90 (22): 1017–1025. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005603.
 68. Lazzari R.D., Politti F., Belina S.F., Santos C.A., Cimolin V. Effect of Transcranial Direct Current Stimulation Combined with Virtual Reality Training on Balance in Children with Cerebral Palsy: A Randomized, Controlled, Double-Blind, Clinical Trial. *J. Mot. Behav.* 2017; 49 (3): 329–336. DOI: 10.1080/00222895.2016.1204266.
 69. Grondhuis S.N., Aman M.G. Overweight and obesity in youth with developmental disabilities: a call to action. *J. Intellect. Disabil. Res.* 2014; 58 (9): 787–799. DOI: 10.1111/jir.12090.
 70. Mitchell L., Ziviani J., Oftedal S., Boyd R. The effect of virtual reality interventions on physical activity in children and adolescents with early brain injuries including cerebral palsy.

- Developmental Medicine and Child Neurology*. 2012; 54 (7): 667–671.
71. Ainsworth B.E., Watson K.B., Ridley K., Pfeiffer K.A., Herrmann S.D., Crouter S.E., McMurray R.G., Butte N.F., Bassett D.R., Trost S.G., Berrigan D, Fulton J.E. Utility of the Youth Compendium of Physical Activities. *Res. Q. Exerc. Sport*. 2018; 89 (3): 273–281. DOI: 10.1080/02701367.2018.1487754.
72. Ritterband-Rosenbaum A., Christensen M.S., Nielsen J.B. Twenty weeks of computer training improves sense of agency in children with spastic cerebral palsy. *Res. Dev. Dis*. 2012; 33 (4): 1227–1234.
73. Encarnação P., Alvarez L., Rios A., Maya C., Adams K., Cook A. Using virtual robot-mediated play activities to assess cognitive skills. *Disabil. Rehabil. Assist. Technol*. 2014; 9 (3): 231–241. DOI: 10.3109/17483107.2013.782577.
74. Pourazar M., Mirakhori F., Hemayattalab R., Bagherzadeh F. Use of Virtual Reality Intervention to Improve Reaction Time in Children with Cerebral Palsy: A Randomized Controlled Trial. *Dev. Neurorehabil*. 2017; 21 (8): 1–6: 515–520. DOI: 10.1080/17518423.2017.1368730.
75. Martín-Ruiz M.L., Máximo-Bocanegra N., Luna-Oliva L. A virtual environment to improve the detection of oral-facial malfunction in children with cerebral palsy. *Sensors (Basel)*. 2016; 16 (4): 444. DOI: 10.3390/s16040444.
76. Shin J.W., Song G.B., Hwangbo G. Effects of conventional neurological treatment and a virtual reality training program on eye-hand coordination in children with cerebral palsy. *J. Phys. Ther. Sci*. 2015; 27 (7): 2151–2154. DOI: 10.1589/jpts.27.2151.
77. Meyer-Heim A., van Hedel H.J. Robot-assisted and computer-based neurorehabilitation for children: the story behind. *Praxis*. 2014; 103 (15): 883–892. DOI: 10.1024/1661-8157/a001725.
78. Stansfield S., Dennis C., Larin H., Gallagher C. Movement-based VR gameplay therapy for a child with cerebral palsy. *Stud. Health Technol. Inform*. 2015; 219: 153–157. DOI: 10.3233/978-1-61499-595-1-153.
79. Rosie J.A., Ruhen S., Hing W.A., Lewis G.N. Virtual rehabilitation in a school setting: is it feasible for children with cerebral palsy? *Disabil. Rehabil. Assist. Technol*. 2015; 10 (1): 19–26. DOI: 10.3109/17483107.2013.832414.
80. Owens S.G., Garner J.C. 3rd, Loftin J.M., van Blerk N., Ermin K. Changes in physical activity and fitness after 3 months of home Wii Fit™ use. *J. Strength. Cond. Res*. 2011; 25 (11): 3191–3197. DOI: 10.1519/JSC.0b013e3182132d55.
81. Levac D., Glegg S., Colquhoun H., Miller P., Noubary F. Virtual reality and active videogame-based practice, learning needs, and preferences: A Cross-Canada survey of physical therapists and occupational therapists. *Games Health J*. 2017; 6 (4): 217–228. DOI: 10.1089/g4h.2016.0089.

Сведения об авторах

Карякин Николай Николаевич, д-р мед наук, доцент, ректор ПИМУ, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0001-8958-6199.

Шейко Геннадий Евгеньевич, канд. мед. наук, ассистент, кафедра медицинской реабилитации, ПИМУ, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0003-0402-7430.

Воловик Михаил Григорьевич, д-р мед наук, вед. науч. сотрудник, отделение функциональной диагностики, ПИМУ, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0002-5459-2545.

Белова Анна Наумовна, д-р мед наук, профессор, зав. кафедрой медицинской реабилитации, ПИМУ, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0001-9719-6772.

(✉) **Шейко Геннадий Евгеньевич**, e-mail: sheikogennadii@yandex.ru.

Поступила в редакцию 27.03.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Электроспиннинг для дизайна материалов медицинского назначения

**Кретов Е.И., Заполоцкий Е.Н., Таркова А.Р., Прохорихин А.А.,
Бойков А.А., Малаев Д.У.**

*Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) им. акад. Е.Н. Мешалкина
Россия, 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15*

РЕЗЮМЕ

Рассмотрены достижения в области получения скаффолдов для тканевой инженерии методом электроспиннинга. При правильном подборе параметров электроспиннинга, таких как вязкость раствора, тип растворителя, напряжение, расстояние от иглы до коллектора и т.д., можно получить материалы с высокой степенью пористости и необходимым размером пор, подходящим для оптимальной инфильтрации клеток. Данные тканеподобные материалы можно получать как из синтетических и природных полимеров, так и их смесей. Исходя из свойств, присущих конкретной ткани – сосудистой, костной, сердечной и т.д., подбираются материалы для синтеза скаффолда, обеспечивающие необходимые механические характеристики, структуру, скорость деградации и биосовместимость. Многие исследователи функционализировали волокна путем добавления биологически активных веществ или наночастиц. В обзоре также рассмотрены особенности внеклеточного матрикса различных видов тканей и подходы, которые применяются для имитации ткани в каждом конкретном случае. Заселение скаффолдов клетками перед трансплантацией является наиболее распространенным подходом для повышения биосовместимости скаффолда с тканями реципиента.

Ключевые слова: тканевая инженерия, нановолокна, электроспиннинг, скаффолды, внеклеточный матрикс, имплантаты.

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-75-30009.

Для цитирования: Кретов Е.И., Заполоцкий Е.Н., Таркова А.Р., Прохорихин А.А., Бойков А.А., Малаев Д.У. Электроспиннинг для дизайна материалов медицинского назначения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 153–162. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-153-162>.

Electrospinning for the design of medical supplies

Kretov E.I., Zapolotsky E.N., Tarkova A.R., Prokhorikhin A.A., Boykov A.A., Malaev D.U.

*E. Meshalkin National Medical Research Center
15, Rechkunovskaya Str., Novosibirsk, 630055, Russian Federation*

ABSTRACT

In this review, various achievements in the field of development of tissue-engineered scaffolds with the electrospinning approach were observed. Through the appropriate selection of electrospinning parameters, such as solution viscosity, the type of solvent, voltage, the distance between a tip and a collector etc., scaffolds with a high degree of porosity and pore size applicable for optimal cell infiltration can be obtained. These tissue-like materials can be produced from both synthetic and natural polymers and their mixtures. Based on the characteristics specific for the desirable tissue – vascular, bone or cardiac – materials providing the required mechanical properties, architecture, degradation kinetics and biocompatibility are selected for scaffold synthesis. In different studies, electrospun fibers were modified by adding biologically active agents or nanoparticles. This article also describes the particularities of the extracellular matrix of different tissues and approaches used for specific tissue imitation.

✉ Бойков Андрей Александрович, e-mail: fimarik@gmail.com.

Repopulation of the matrices with autologous cells before transplantation is the most commonly used method to improve the biocompatibility of the scaffold and the recipient.

Key words: tissue engineering, nanofibers, electrospinning, scaffolds, extracellular matrix, implants.

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

Source of financing. This work was financially supported by the Russian Science Foundation grant No. 17-75-30009.

For citation: Kretov E.I., Zapolotsky E.N., Tarkova A.R., Prokhorikhin A.A., Boykov A.A., Malaev D.U. Electrospinning for the design of medical supplies. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 153–162. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-153-162>.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что некоторые органы и ткани организма человека способны саморегенерироваться. Для условий, когда саморегенерация ограничена, были разработаны подходы тканевой инженерии по созданию искусственных тканей для регенерации или замены органа [1–3]. Метод электроспиннинга – новое направление в данной области, позволяющее создать имплантируемый скаффолд (протез) с требуемыми физико-химическими характеристиками [4]. Получаемая пористая структура способствует активной миграции клеток в стенку протеза, формированию питающей кровеносной сети и внутреннего эндотелиального слоя. Электроспиннинговый скаффолд должен иметь структуру, схожую с внеклеточным матриксом замещаемой ткани, чтобы обеспечить условия для адгезии, роста и пролиферации клеток [5, 6]. Наряду с этим имплантируемый протез также должен обладать биосовместимостью, подходящим размером пор для инфильтрации клеток и механической целостностью [7, 8]. Как правило, такие протезы производят из биодеградируемых материалов, рассматривая их как временную поддерживающую конструкцию на период роста клеток и регенерации ткани, и учитывают, чтобы скорость деградации скаффолда совпадала со скоростью формирования новой ткани.

ПРОЦЕСС ЭЛЕКТРОСПИННИНГА. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ

Основными элементами аппарата электроспиннинга являются игла, через которую подается раствор полимера, и коллектор, предназначенный для сбора поступающего полимера. Данные элементы объединены в одну электрическую цепь. По мере роста электрического напряжения, на конце иглы преодолеваются силы поверхностного натяжения раствора полимера, в результате чего образуется конус Тейлора – конусообразная капля полимера [9, 10]. Как только напряжение становится достаточным, с вершины ко-

нуса в направлении коллектора устремляется струя полимера, диаметр которой зависит от множества условий. В воздухе часть растворителя испаряется и струя расщепляется, в результате чего на коллекторе собирается чистый полимер в виде хаотично или направленно уложенных волокон размерами в нано- или микрометровом диапазоне. Получаемый материал имеет вид тонкой, волокнистой, пористой мягкой ткани или тонкого эластичного покрытия.

Конструктивно установки электроспиннинга схожи, различия вызваны лишь дизайном исполнения (горизонтальный, вертикальный и т.д.). Кроме того, установки «двойного» электроспиннинга могут снабжаться элементами, управляющими формированием нитей и тканевых материалов [11]. Интересна технология «коаксиального» электроспиннинга, позволяющая получать комбинированные (типа «провод с оплеткой») нити [12, 13].

На процесс электроспиннинга влияют как свойства раствора (вязкость, электропроводность, концентрация полимера, поверхностное натяжение), так и контролируемые переменные: скорость подачи раствора или расплава полимера, величина электрического напряжения, расстояние между иглой и коллектором, температура и влажность [14, 15].

Вязкость, электропроводность и поверхностное натяжение растворов полимеров зависят от концентрации и свойств используемого полимера и растворителя. Обычно вязкость растворов в процессах электроспиннинга находится в диапазоне 1–20 пуаз (Пз) и зависит от концентрации (обычно в пределах 10–30%) и молекулярной массы полимера [16, 17]. Оптимальные растворители должны иметь невысокую вязкость и температуру кипения (например, ДХМ, ТГФ, ДМФА, вода, метанол, гексафторизопропанол и т.д.); также используются смеси растворителей [18–20]. Поверхностное натяжение растворов определяется природой растворителя и полимера (обычно порядка 10²–10³ дин/см), хотя на практике данный фактор контролируется редко.

Основные контролируемые параметры – скорость подачи полимера (0,1–10 мл/ч), величина электрического напряжения (1–60 кВ), расстояние между иглой и коллектором (10–50 см), диаметр иглы (18–27 G), скорость вращения приемного коллектора (0–3 000 об./мин) – определяются экспериментально. В подавляющем большинстве случаев температуру и влажность воздуха в установке электроспиннинга учитывать не требуется.

Технология электроспиннинга пригодна для изготовления полимерных нитей, клубков и пленок из растворимых или расплавляемых полимеров и позволяет создавать волокнистые материалы с заданными пространственными характеристиками (диаметр, пространственная ориентация и сцепление волокон, пористость, наличие «каналов» для клеточной пролиферации). Благодаря этому создаются и изучаются материалы для клеточной и тканевой инженерии: различные скаффолды для нервной ткани, кожи, костной ткани и т.д.; перевязочные материалы, средства доставки лекарственных препаратов [21–23].

ИЗГОТОВЛЕНИЕ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ

Возможность комбинировать преимущества синтетических и природных полимеров с помощью электроспиннинга делает этот метод особенно привлекательным для дизайна сосудистых графтов, требующих высокую механическую прочность на разрыв и достаточную эластичность (модуль Юнга) [24]. Кроме того, включение в состав скаффолда природных полимеров с большим количеством сайтов для связывания клеток может способствовать образованию непрерывного монослоя эпителиальных клеток в просвете и пролиферации других типов клеток в матрице графта. Метод электроспиннинга обеспечивает точный контроль состава, размера и направленности волокон, что влияет на пористость материала, распределение пор по размерам и архитектуру скаффолдов [25]. Важно отметить, что направленные нановолокна могут использоваться для ориентации клеток в определенном направлении для обеспечения необходимой анизотропии, которая встречается в некоторых органах, включая кровеносные сосуды [26].

Группой авторов [27] были получены трубчатые каркасы из сополимера поли-L-лактида и поли-ε-капролактона диаметром 3 мм, которые были имплантированы кроликам в нижние поверхностные эпигастральные вены на 7 нед. Выявлено, что каркасы выдерживали хирургический процесс, сохраняли структурную целостность и проходимость в течение всего периода наблюдения. Кроме того, эндотелиальные клетки, полученные из коронарной артерии человека, ровно рас-

пределялись и хорошо распространялись по полости каркаса в течение 10 дней после нанесения.

Сосудистые трансплантаты, получаемые из раствора рекомбинантного человеческого тропоэластина и поликапролактона, в работе [28] были подобраны так, чтобы имитировать механические свойства внутренней грудной артерии человека (модуль упругости, податливость, проницаемость и давление на разрыв). Адгезия клеток и их пролиферация были исследованы с использованием эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Непокрытый клетками каркас был имплантирован кроликам и изъят через один месяц с последующим исследованием механических характеристик. В случае трансплантатов состава эластин/поликапролактон наблюдались повышенная сосудистая совместимость и эндотелизация при пониженном прикреплении тромбоцитов по сравнению с трансплантатами без эластина. Добавление тропоэластина существенно улучшало адгезию и пролиферацию клеток.

Непокрытые клетками трансплантаты из полиуретан-мочевины имплантировали в аорту крыс в срок до 24 нед [29]. Внутренняя часть трансплантатов была покрыта не тромбогенным сополимером 2-метакрилоилоксиэтил фосфорилхолина, что привело к пониженной адгезии тромбоцитов и улучшенной проходимости по сравнению с непокрытыми трансплантатами. Механические свойства трансплантатов были также совместимы с показателями нативных артерий. Многочисленные эксперименты *in vivo* с использованием композитных двуслойных трансплантатов из полиуретан-мочевины с нанесенными мышечными стволовыми клетками крыс при введении в их аорту [30, 31] показали более высокую проходимость для трансплантатов с нанесенными клетками по сравнению с трансплантатами без клеток.

Сосудистые трансплантаты из биоразлагаемого полиуретана имплантировали в брюшную аорту крысам в сроки – 7 дней, 1, 6 и 12 мес [32]. Проводилось сравнение с коммерчески доступными трансплантатами из ePTFE. Во всех случаях не наблюдалось отторжения имплантатов организмом или их деградации. При длительном сроке имплантации уровень проходимости имплантатов составил 100%. Имплантат, извлеченный через 12 мес, по-прежнему остался механически стабильным и полностью интегрировался в окружающие ткани.

Метод эмульсионного электроспиннинга был использован для изготовления гепарин-наполненных нановолокон поли (L-лактид-со-капролактон) (PLCL), используемых в качестве стенового покрытия. На модели кроликов было получено, что покрытый таким образом стент эффективно отделял область аневризмы от кровотока [33]. В другой работе

J. Wang и соавт. [34] для ускорения эндотелизации смешивали фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) с гепарином и загружали полученную смесь в сердцевину нановолокон PLCL. Выделение гепарина и VEGF из каркасов PLCL-HeP-VEGF продолжалось более 30 дней, что усиливало пролиферацию свинных подвздошных эндотелиальных клеток на стенке.

W. Feng и соавт. методом коаксиального электроспиннинга получили стенты, покрытые наполненными гепарином и розувастатином кальция нановолокнами PLCL [35]. Покрытый стент продемонстрировал повышенную антикоагулянтную способность, а эндотелиальные клетки хорошо пролиферировали на покрытом стенте благодаря длительному высвобождению розувастатина кальция и гепарина (более 45 дней) из коаксиальных нановолокон PLCL.

В другой похожей работе X. Chen и соавт. посредством эмульсионного электроспиннинга инкапсулировали в нановолокно PLCL гепарин и VEGF для создания сосудистых трансплантатов [36]. Гепарин и VEGF демонстрировали замедленное высвобождение в течение 29 дней, что придало исследуемому трансплантату хорошую способность к антикоагуляции и привело к росту эндотелия.

Похожим образом обогащенный тромбоцитами фактор роста (PRGF) в концентрации 20 мг/мл добавляли в PLCL с целью получения раствора для электроспиннинга, из которого готовили трубчатый трансплантат с диаметром волокон 4 нм. Данный подход способствовал быстрому проникновению клеток в трансплантат и росту эндотелия [37].

Группой авторов [38] было исследовано высвобождение меченного тритием паклитаксела (3H-PTX) из матриц, предназначенных для покрытия сосудистых стентов и полученных методом электроспиннинга из растворов поликапролактона (PCL) с паклитакселом (PTX) и человеческим сывороточным альбумином (HSA) в гексафтороизопропаноле (HFIP). Было показано, что 3D-матрицы могут полностью высвободить PTX практически без потери веса. Примерно 27% PTX было высвобождено в первый день, еще 8% – в течение следующих 26 дней. С учетом токсичности PTX и скорости его диффузии через артериальную стенку ожидается, что минимальная цитостатическая доза препарата в стенке артерии будет поддерживаться в течение не менее 3 мес.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ И ЛЕЧЕНИЯ РАН

Высокая пористость, малые размеры пор и большая площадь поверхности электроспиннинговых покровных материалов делают их подходящими для использования в раневых повязках, где они обе-

спечивают эффективную защиту от бактериальной инфекции поврежденной поверхности кожи и возможность дренажа раневых жидкостей и газов через повязку. Электроспиннинговые покрытия могут также работать как платформы для доставки биологически активных веществ, таких как противомикробные средства для борьбы с инфекциями и средства для улучшения заживления ран [39, 40].

Основная составляющая внеклеточного матрикса кожи – волокна коллагена, обеспечивающие механическую и структурную целостность кожи, имеют диаметр в диапазоне 50–500 нм [41, 42]. Соответственно, любой материал для регенерации кожи также должен иметь диаметр волокон в нанометровом диапазоне. Из числа природных полимеров с этой целью часто применяются коллаген, фиброин, желатин и хитозан/хитин. Так, группой авторов [43] методом электроспиннинга были получены нановолокна коллагена диаметром в диапазоне 100–1 200 нм. Механические свойства коллагеновой матрицы были сравнимы с таковыми для коммерчески доступных материалов для регенерации поврежденных тканей. В экспериментах на крысах полученные матрицы проявили высокую эффективность при лечении ран на ранних стадиях.

Фиброин, выделяемый из коконов шелкопряда, отличается отличной биосовместимостью, высокой прочностью, медленной деградацией и минимальной воспалительной реакцией [44]. Однако образующийся при электроспиннинге материал имеет малый размер пор, что препятствует должной инфильтрации клеток. Группа исследователей получала волокна из смеси фиброина шелка и полиэтиленоксида с одновременным нанесением кристаллов NaCl в процессе электроспиннинга [45]. Наблюдалась хорошая адгезия и инфильтрация 3Т3 фибробластов на матрице. В экспериментах на крысах по лечению ран данный скаффолд закрывал раны быстрее и деградировал более эффективно, чем коммерчески доступный регенеративный материал MatriDerm.

Синтетические полимеры (полигликолид, полилактид, полоксамер, поликапролактон, полистирол, поливинилпирролидон и др.) также находят применение для регенерации кожи. Группой авторов [46] было проведено сравнительное исследование волокон, полученных из поликапролактона, смеси хитозан/полиэтиленоксид и желатина при электроспиннинге их растворов в уксусной кислоте. В тестах *in vitro* материал состава хитозан/полиэтиленоксид характеризовался низкой адгезией и пролиферацией клеток, в то время как в ходе исследования *in vivo* на крысах оказал наибольшее влияние на процесс лечения, эффективно блокируя стягивание раны и усиливая ее эпителизацию. Скаффолд из поликапро-

лактона также плохо показал себя в экспериментах *in vitro*, однако отлично действовал как физический барьер против стягивания раны. В случае использования желатина наблюдались наилучшие результаты *in vitro*, при этом поведение *in vivo* было сравнимо с контрольной группой (регенерация раны без применения скаффолда).

Методом электроспиннинга раствора полиуретана получали нановолокна со средним диаметром 250–300 нм [47]. Исследование по лечению ран с помощью полиуретановой мембраны проводилось на морских свинках, контрольная группа получала лечение коммерческим продуктом Tegaderm. Наблюдалась хорошая, однородная адгезия нановолокнистой мембраны на поверхности раны без накопления жидкости. Одновременно не было выявлено ее токсического воздействия или проницаемости для экзогенных микроорганизмов.

M.R. El-Aassar и соавт. [48] разработали электроспиннинговые композитные покрытия для нанесения на рану, содержащие поливиниловый спирт (PVA)/плуроник F127 (Plur)/полиэтиленмин (PEI) и наночастицы диоксида титана (TiO₂ NP). В этом исследовании наночастицы TiO₂ использовались в качестве противомикробного агента. Антибактериальные тесты показали, что изготовленные нановолокна PVA-Plur-PEI/TiO₂ проявляют лучшую бактерицидную активность, чем нановолокна PVA-Plur-PEI.

F. Lv и соавт. [49] сообщили об электроспиннинговом каркасе из поликапролактона (PCL)/желатина, содержащем биокерамические частицы на основе силиката (Nagelschmidite, NAGEL, Ca₇P₂Si₂O₁₆) и предназначенном для заживления ран. С помощью процесса совместного электроспиннинга биокерамические частицы NAGEL были равномерно распределены в волокнах PCL/желатина, и при разрушении каркаса кремнийсодержащие ионы (силикаты) постепенно высвобождались из волокна. Клеточные тесты (на примерах эндотелиальных клеток пупочной вены (HUVECs) и кератиноцитов человека (HaCaTs)) показали, что каркасы могут значительно способствовать адгезии, пролиферации и миграции клеток. Участки раны, восстановленные данными каркасами, продемонстрировали желаемые результаты заживления в аспектах ангиогенеза, отложения коллагена, реэпителизации и ингибирования реакции воспаления.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ, СУХОЖИЛИЙ И СВЯЗОК

Ключевыми моментами при использовании скаффолдов, полученных методом электроспиннинга для регенерации костной ткани, являются наличие системы связанных между собой пор, должные меха-

нические свойства, контролируемая скорость деградации и размер волокон, соответствующий строению внеклеточного матрикса кости [50]. Внеклеточный матрикс кости представляет собой нанокомпозит, состоящий из волокон коллагена, неорганических нанокристаллитов и факторов роста [51].

Исследовалась возможность получения скаффолдов для регенерации костной ткани из поликапролактона [52]. Нановолокнистая матрица из поликапролактона, получаемая в процессе электроспиннинга из хлороформного раствора, состояла из хаотично ориентированных волокон с диаметрами, варьирующимися в диапазоне 100 нм – 5 мкм.

Скаффолды с нанесенными мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга крыс культивировались с остеогенными добавками в биореакторе в течение 4 нед с последующей имплантацией в их сальник. После изъятия скаффолды сохранили первоначальный размер и форму, были жесткими и внешне выглядели как кость. По всему объему матрицы наблюдалось формирование клеток и внеклеточного матрикса с образованием ткани, подобной костной.

Гидроксиапатит (НА), как основная минеральная составляющая костного матрикса, находит широкое применение в медицине при воссоздании костной ткани [53], однако его применение ограничено присущей ему высокой хрупкостью. Одним из решений данной проблемы является получение композитных материалов с полимерами [54–56]. Так, нановолокнистая сеть из коллагена и гидроксиапатита (содержание НА порядка 20%) была получена при электроспиннинге раствора их нанокомпозита [57]. Биосовместимость нановолокон была исследована с помощью остеобластических клеток мышей. Клетки были жизнеспособны и показали хорошие параметры роста как в случае нановолокон коллагена, так и в случае нанокомпозита.

Скаффолды из волокон фиброина шелка, содержащие человеческий рекомбинантный морфогенетический белок кости (BMP-2) и (или) наночастицы гидроксиапатита, полученные методом электроспиннинга, использовались для формирования костной ткани *in vitro* из человеческих мезенхимальных стволовых клеток костного мозга [58]. BMP-2 перенес процесс электроспиннинга в водной среде и сохранил биоактивность. Клетки культивировались на скаффолдах в течение 31 дня в остеогенной среде. Скаффолд поддерживал процессы роста и остеогенной дифференцировки клеток. Совместное нанесение на волокна BMP-2 и гидроксиапатита продемонстрировало в результате самый высокий уровень осаждения кальция и повышение уровней транскрипции BMP-2 по сравнению с другими системами. Тем не менее BMP-2 имеет недостатки, связанные с быстрым

ферментативным гидролизом, нежелательным разрастанием костной ткани, иммунными реакциями и высокой стоимостью [59]. Недавно в качестве альтернативных биологически активных молекул большое внимание привлекли пептиды, полученные из BMP-2 [60], оказывающие положительное влияние на остеогенную дифференцировку стволовых клеток и образование костной ткани в дефектах [61].

Так, К. Ye и соавт. [62] разработали наноразмерные 3D-каркасы из нано-гидроксиапатита/PLLA/желатина (nHA/PLA/GEL) с иммобилизованными на них производными BMP-2 пептидов, способных к замедленному высвобождению. Исследования *in vitro* показали, что каркасы nHA/PLA/GEL-PEP стимулировали активность щелочной фосфатазы костных мезенхимальных стволовых клеток (BMSCs) и экспрессию генов, связанную с остеогенной дифференцировкой. Кроме того, на модели *in vivo* этот каркас способствовал образованию костной ткани в дефектах черепной кости крысы. Отсюда утверждается, что данный каркас обладает большим потенциалом для восстановления костных дефектов [62].

Нативные связки и сухожилия имеют широкий диапазон механических свойств. Поэтому для успешного создания тканей, замещающих данные поврежденные структуры, решающую роль играют механические свойства скаффолда [63]. Разработаны гибридные нано-микроволокнистые скаффолды методом электроспиннинга раствора полилактид-ко-гликолида на уже готовый скаффолд, сплетенный из волокон того же полимера [64]. Стромальные клетки костного мозга свиней наносились на гибридные скаффолды, в качестве контрольной группы использовались сплетенные скаффолды без нановолокон, на которые были нанесены клетки, суспендированные в фибриновом геле. Такие показатели, как адгезия клеток, пролиферация и экспрессия коллагена I типа и декорина, были выше для группы с гибридными скаффолдами. Ограничением для использования таких нано-микроволокнистых скаффолдов являются их механические свойства, которые не соответствуют характерным для нативных сухожилий и связок.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ

Тканевая инженерия и клеточная терапия сейчас рассматриваются как альтернативные терапевтические подходы для стимулирования регенерации инфарктной ткани. Сердечные скаффолды могут заменять или поддерживать функцию сердечной мышцы с возможностью обеспечения клеточной и лекарственной терапии после инфаркта миокарда [65, 66].

Для получения сердечных скаффолдов используют как синтетические, так и природные полимеры.

В работе [67] описано получение методом электроспиннинга матриц разного состава: поли-L-лактид; 75% полилактид-ко-гликолид (лактид/гликолид = 10/90) смешанный с 25% поли-L-лактида; 85% полилактид-ко-гликолид (лактид/гликолид = 75/25) смешанный с 15% сополимера полиэтиленгликоля с поли-D,L-лактидом. При культивировании кардиомиоцитов на полученных матрицах было выявлено, что кардиомиоциты были чувствительны к составу материалов с предпочтением к относительно гидрофобным поверхностям. Плотность кардиомиоцитов на гидрофильных и быстро разлагающихся поверхностях была ниже. Матрицы из поли-L-лактида показали лучшие параметры по адгезии клеток.

В работе [68] описано получение композитных волокон, ядро которых состоит из полиглицерин себаката, а внешняя часть из фибриногена. Волокна имели средний диаметр $1\ 076 \pm 212$ нм. Показано, что полученные волокна имели модуль Юнга, сравнимый с таковым для нативной сердечной мышцы. Неонатальные кардиомиоциты, которые культивировались на этих скаффолдах, продемонстрировали нормальную экспрессию специфичных белков.

Ряд скаффолдов с направленными и хаотично ориентированными волокнами был получен методом электроспиннинга из смеси полиглицерин себакат/желатин с различными соотношениями компонентов [69]. На адгезию, пролиферацию и дифференцировку фибробластов и кардиомиоцитов влияли химический состав и жесткость скаффолда, а на выравнивание и организацию клеток – направленное или хаотичное расположение волокон. Скаффолды с направленными волокнами, содержащие 33% полиглицерин себаката, позволили добиться оптимальных синхронных сокращений кардиомиоцитов при значительно улучшенной организации клеток в заданных направлениях.

Некоторые проводящие и биосовместимые полимеры, такие как полианилин и полипиррол, использовались для изготовления проводящих сердечных скаффолдов. В частности, был изготовлен скаффолд из направленных проводящих волокон полианилина и сополимера полимолочной и полигликолевой кислот [70]. Культивированные на волокнах клетки образовывали кластеры, причем все кардиомиоциты в пределах кластера сокращались синхронно, что подразумевает полностью развитую межклеточную связь.

Другим подходом для улучшения физических и биологических свойств скаффолда является покрытие его поверхности нановолокнами. В некоторых случаях скаффолды, покрытые электроспиннинговыми нановолокнами, после удаления клеток с поверхности

скаффолда проявляли лучшие механические свойства и кинетику деградации по сравнению со скаффолдом до модификации [71]. Так, например, группа исследователей провела эксперимент по получению гибридных створок сердечного клапана состава биоматрица/полимер [72]. Створки сердечного клапана свиньи были очищены от клеток и методом электроспиннинга покрыты смесью факторов роста из фибробластов/хитозана/поли-4-гидроксипропирилата. Далее створки клапана были засеяны мезенхимальными стволовыми клетками крыс и культивированы в течение 14 дней. В результате гибридный скаффолд продемонстрировал хорошее заселение клетками и значительный прирост их массы, образование 4-гидроксипролина и коллагена, а также имел механические свойства, сравнимые со свойствами нативного клапана.

В недавней работе [73] методом электроспиннинга был разработан волокнистый каркас клапана из поликарбонат-полиуретана, имитирующий по форме нативный клапан сердца. По замыслу авторов, бесклеточный, медленно разрушающийся эластомерный клапанный имплантат должен постепенно заселяться эндогенными клетками с образованием новой клапанной ткани внутри сердца. Ортопедические имплантации в виде легочного клапана у овец демонстрировали устойчивую функциональность до 12 мес, в то время как полимерный имплантат постепенно заменялся слоистым коллагеном и эластичной матрицей по мере клеточной резорбции полимера.

Что касается медицинских биостойких имплантов, то для материалов, получаемых методом электроспиннинга, область применения пока не определена. К имплантам, особенно к искусственным клапанам сердца, предъявляются повышенные эксплуатационные требования: долговечные эластичность, износостойкость, биостабильность, не говоря уже о гемосовместимости и стойкости к кальцификации. На сегодняшний день биологические искусственные клапаны сердца с подвижными элементами из животного обработанного перикарда демонстрируют наибольшие успехи в практике, хотя и в этом случае сложно достичь длительного срока безотказной службы клапана (обычно не более 10 лет) [74]. Биомиметические искусственные клапаны сердца с подвижной основой из искусственных материалов (полимеров типа PTFE, полиуретанов и проч.) рассматриваются в настоящий момент как перспективные, но нуждающиеся в более глубоком изучении, нежели уже известные механические или биологические [74]. Поэтому технологию электроспиннинга следует рассматривать больше как вспомогательную при производстве комбинированных биостойких материалов. Например, микроволокна электроспиннин-

га можно использовать как армирующий компонент при создании соответствующего композита (протеза клапана, сосуда, графта) с импрегнированной полимерной матрицей, или модифицировать поверхностный слой изделия нановолокнами для лучшей эпителизации там, где это требуется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачей тканевой инженерии является восстановление функций поврежденной ткани. Метод электроспиннинга позволяет получать полимерные скаффолды для нужд данного направления. Путем варьирования параметров электроспиннинга можно получать материалы с необходимым диаметром волокон, размером пор и пористостью. Кроме того, электроспиннинг позволяет получать волокна из различных полимеров, как синтетического, так и природного происхождения. Данная технология дает возможность комбинировать преимущества синтетических и природных полимеров для получения биосовместимых скаффолдов с механическими свойствами, соответствующими нативным тканям. Подбор условий и материалов для электроспиннинга осуществляется в зависимости от свойств внеклеточного матрикса замещаемой ткани. Однако к настоящему моменту количество исследований *in vivo* для тканеинженерных материалов, полученных методом электроспиннинга, еще недостаточно, чтобы говорить об универсальности применения этой технологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur. Spine J.* 2008; 17 (Suppl. 4): 467–479. DOI: 10.1007/s00586-008-0745-3.
2. Rustad K.C., Sorkin M., Levi B., Longaker M.T., Gurtner G.C. Strategies for organ level tissue engineering. *Organogenesis.* 2010; 6 (3): 151–157. DOI: 10.4161/org.6.3.12139.
3. Idaszek J., Kijenska E., Lojkowski M., Swieszkowski W. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. *Appl. Surf. Sci.* 2016; 388 (Pt B): 762–774. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.03.038.
4. Попова И.В., Степанова А.О., Сергеевичев Д.С., Акулов А.Е., Захарова И.С., Покушалов Е.А., Лактионов П.П., Карпенко А.А. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электроспиннинга в эксперименте *in vitro* и *in vivo*. *Патология кровообращения и кардиохирургия.* 2015; 19 (4): 63–71. DOI: 10.21688/1681-3472-2015-4-63-71.
5. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today.* 2011; 14 (3): 88–95. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
6. Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T., Sakthi Kumar D. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int. J. Polym. Sci.* 2011; 2011. Article 290602. DOI: 10.1155/2011/290602.

7. Hutmacher D.W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001; 12 (1): 107–124. DOI: 10.1163/156856201744489.
8. Lanza R., Langer R., Vacanti J.P. Principles of tissue engineering. New York: Academic Press; 2011.
9. Bhattacharyya P., Rutledge G. Electrospinning and polymer nanofibers: Process fundamentals. In: Comprehensive biomaterials: Vol. 1: Metallic, ceramic and polymeric biomaterials. P. Ducheyne (ed.). Netherlands: Elsevier; 2011: 497–512. DOI: 10.1016/B978-0-08-100691-7.00165-8.
10. Reneker D.H., Yarin A.L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer.* 2008; 49 (10): 2387–2425. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.02.002.
11. Arras M.M., Grasl C., Bergmeister H., Schima H. Electrospinning of aligned fibers with adjustable orientation using auxiliary electrodes. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2012; 13 (3): 035008. DOI: 10.1088/1468-6996/13/3/035008.
12. Díaz J.E., Fernández-Nieves A., Barrero A., Márquez M., Loscertales I.G. Fabrication of structured micro and nanofibers by coaxial electrospinning. *Journal of Physics: Conference Series.* 2008; 127 (1): 012008. DOI: 10.1088/1742-6596/127/1/012008.
13. Qin X. Coaxial electrospinning of nanofibers. In: Electrospun nanofibers. M. Afshari (ed.). Woodhead Publishing; 2017: 41–71. DOI: 10.1016/B978-0-08-100907-9.00003-9.
14. Suwantong O. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. *Polym. Adv. Technol.* 2016; 27: 1264–1273. DOI: 10.1002/pat.3876.
15. Peng S., Jin G., Li L., Li K., Srinivasan M., Ramakrishna S., Chen J. Multi-functional electrospun nanofibres for advances in tissue regeneration, energy conversion & storage, and water treatment. *Chem. Soc. Rev.* 2016; 45 (5): 1225–1241. DOI: 10.1039/c5cs00777a.
16. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng.* 2006; 12 (5): 1197–1211. DOI: 10.1089/ten.2006.12.1197.
17. Ramakrishna S. An introduction to electrospinning and nanofibers. Singapore: World Scientific Publishing; 2005. DOI: 10.1142/9789812567611_0003.
18. Pillay V., Dott C., Choonara Y.E., Tyagi C., Tomar L., Kumar P., du Toit L.C., Ndesendo V.M.K. A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. *J. Nanomater.* 2013; 2013. Article 789289. DOI: 10.1155/2013/789289.
19. Subbiah T., Bhat G.S., Tock R.W., Parameswaran S., Ramkumar S.S. Electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* 2005; 96 (2): 557–569. DOI: 10.1002/app.21481.
20. Megelski S., Stephens J.S., Chase D.B., Rabolt J.F. Micro and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules.* 2002; 35 (22): 8456–8466. DOI: 10.1021/ma020444a.
21. Baptista A.C., Ferreira I., Borges J.P. Electrospun fibers in composite materials for medical applications. *J. Composites Biodegradable Polymer.* 2013; 1 (1): 56–65. DOI: 10.12974/2311-8717.2013.01.01.7.
22. Liao S., Chan C.K., Ramakrishna S. Electrospun nanofibers: Work for medicine? *Front Mater. Sci. China.* 2010; 4 (1): 29–33. DOI: 10.1007/s11706-010-0009-0.
23. Manea L.R., Hristian L., Leon A.L., Popa A. Recent advances of basic materials to obtain electrospun polymeric nanofibers for medical applications. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2016; 145: 032006. DOI: 10.1088/1757-899X/145/3/032006.
24. L’Heureux N., Dusserre N., Marini A., Garrido S., de la Fuente L., McAllister T. Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts – from research to clinical practice. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2007; 4 (7): 389–395. DOI: 10.1038/ncpcardio0930.
25. Rayatpisheh S., Heath D.E., Shakouri A., Rujitanaroj P.-O., Chew S.Y., Chan-Park M.B. Combining cell sheet technology and electrospun scaffolding for engineered tubular, aligned, and contractile blood vessels. *Biomaterials.* 2014; 35 (9): 2713–2719. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.035.
26. Li Y., Huang G., Zhang X., Wang L., Du Y., Lu T.J., Xu F. Engineering cell alignment *in vitro*. *Biotechnol. Adv.* 2014; 32 (2): 347–365. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.007.
27. He W., Ma Z., Teo W.E., Dong Y.X., Robless P.A., Lim T.C., Ramakrishna S., Tubular nanofiber scaffolds for tissue engineered small-diameter vascular grafts. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009; 90 (1): 205–216. DOI: 10.1002/jbm.a.32081.
28. Wise S.G., Byrom M.J., Waterhouse A., Bannon P.G., Weiss A.S., Ng M.K. A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. *Acta Biomater.* 2011; 7 (1): 295–303. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.07.022.
29. Soletti L., Nieponice A., Hong Y., Ye S., Stankus J.J., Wagner W.R., Vorp D.A. *In vivo* performance of a phospholipid-coated bioerodable elastomeric graft for small-diameter vascular applications. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2011; 96 (2): 436–448. DOI: 10.1002/jbm.a.32997.
30. Nieponice A., Soletti L., Guan J., Hong Y., Gharaibeh B., Maul T.M., Huard J., Wagner W.R., Vorp D.A. *In vivo* assessment of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable elastomeric scaffold and muscle-derived stem cells in a rat model. *Tissue Eng. Part A.* 2010; 16 (4): 1215–1223. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0427.
31. He W., Nieponice A., Soletti L., Hong Y., Gharaibeh B., Crisan M., Usas A., Peault B., Huard J., Wagner W.R., Vorp D.A. Pericyte-based human tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials.* 2010; 31: 8235–8244. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.034.
32. Bergmeister H., Seyidova N., Schreiber C., Strobl M., Grasl C., Walter I., Messner B., Baudis S., Fröhlich S., Marchetti-Deschmann M., Griesser M., di Franco M., Krssak M., Liska R., Schima H. Biodegradable, thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements. *Acta Biomater.* 2015; 11: 104–113. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.09.003.
33. Wu C., An Q., Li D., Jing W., He L., Chen H., Yu L., Wei Z., Mo X. A novel heparin loaded poly(l-lactide-co-caprolactone) covered stent for aneurysm therapy. *Mater. Lett.* 2014; 116: 39–42. DOI: 10.1016/j.matlet.2013.10.018.
34. Wang J., An Q., Li D., Wu T., Chen W., Sun B., El-Hamshary H., Al-Deyab S.S., Zhu W., Mo X. Heparin and vascular endothelial growth factor loaded poly(l-lactide-co-caprolactone) nanofiber covered stent-graft for aneurysm treatment. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2015; 11: 1947–1960. DOI: 10.1166/jbn.2015.2138.

35. Feng W., Liu P., Yin H., Gu Z., Wu Y., Zhu W., Liu Y., Zheng H., Mo X. Heparin and rosuvastatin calcium loaded poly(l-lactide-co-caprolactone) nanofiber covered stent-graft for aneurysm treatment. *New J. Chem.* 2017; 41: 9014–9023. DOI: 10.1039/c7nj01214d.
36. Chen X., Wang J., An Q., Li D., Liu P., Zhu W., Mo X. Electrospun poly(l-lactic acid-co-ε-caprolactone) fibers loaded with heparin and vascular endothelial growth factor to improve blood compatibility and endothelial progenitor cell proliferation. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2015; 128: 106–114. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.023.
37. Yin A., Bowlin G.L., Luo R., Zhang X., Wang Y., Mo X. Electrospun silk fibroin/poly(l-lactide-ε-caplacton) graft with platelet-rich growth factor for inducing smooth muscle cell growth and infiltration. *Regen. Biomater.* 2016; 3: 239–245. DOI: 10.1093/rb/rbw026.
38. Kuznetsov K.A., Stepanova A.O., Kvon R.I., Douglas T.E.L., Kuznetsov N.A., Chernonosova V.S., Zaporozhchenko I.A., Kharkova M.V., Romanova I.V., Karpenko A.A., Laktionov P.P. Electrospun produced 3D matrices for covering of vascular stents: paclitaxel release depending on fiber structure and composition of the external environment. *Materials.* 2018; 115: 2176. DOI: 10.3390/ma11112176.
39. Sadri M., Arab-Sorkhi S., Vatani H., Bagheri-Pebdeni A. New wound dressing polymeric nanofiber containing green tea extract prepared by electrospinning. *Method. Fibers Polym.* 2015; 16 (8): 1742–1750. DOI: 10.1007/s12221-015-5297-7.
40. Gizaw M., Thompson J., Faglie A., Lee S.-Yu., Neuenschwander P., Chou S.-F. Electrospun fibers as a dressing material for drug and biological agent delivery in wound healing applications. *Bioengineering.* 2018; 5 (1): e9. DOI: 10.3390/bioengineering5010009.
41. Zhong S.P., Zhang Y.Z., Lim C.T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2010; 2 (5): 510–525. DOI: 10.1002/wnan.100.
42. Sell S.A., Wolfe P.S., Garg K., McCool J.M., Rodriguez I.A., Bowlin G.L. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polym.* 2010; 2 (4): 522–553. DOI: 10.3390/polym2040522.
43. Rho K.S., Jeong L., Lee G., Seo B.M., Park Y.J., Hong S.D., Roh S., Cho J.J., Park W.H., Min B.M. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials.* 2006; 27 (8): 1452–1461. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.004.
44. Vepari C., Kaplan D.L. Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* 2007; 32: 991–1007. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
45. Lee O.J., Ju H.W., Kim J.H., Lee J.M., Ki C.S., Kim J.H., Moon B.M., Park H.J., Sheikh F.A., Park C.H. Development of artificial dermis using 3D electrospun silk fibroin nanofiber matrix. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2014; 10 (7): 1294–1303. DOI: 10.1166/jbn.2014.1818.
46. Gomes S.R., Rodrigues G., Martins G.G., Roberto M.A., Mafrá M., Henriques C.M., Silva J.C. *In vitro* and *in vivo* evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: a comparative study. *Mater. Sci. Eng. C.* 2015; 46: 348–358. DOI: 10.1016/j.msec.2014.10.051.
47. Khil M.S., Cha D.I., Kim H.Y., Kim I.S., Bhattara N. Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B. Appl. Biomater.* 2003; 67 (2): 675–679. DOI: 10.1002/jbm.b.10058.
48. El-Aassar M.R., El Fawal G.F., El-Deeb N.M., Hassan H.S., Mo X. Electrospun polyvinyl alcohol/ pluronic F127 blended nanofibers containing titanium dioxide for antibacterial wound dressing. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016; 178: 1488–1502. DOI: 10.1007/s12010-015-1962-y.
49. Lv F., Wang J., Xu P., Han Y., Ma H., Xu H., Chen S., Chang J., Ke Q., Liu M. A conductive bioceramic/polymer composite biomaterial for diabetic wound healing. *Acta Biomater.* 2017; 60: 128–143. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.07.020.
50. Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012; 30 (10): 546–554. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005.
51. Jang J.H., Castano O., Kim H.W. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61 (12): 1065–1083. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.008.
52. Shin M., Yoshimoto H., Vacanti J.P. *In vivo* bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng.* 2004; 10 (1–2): 33–41. DOI: 10.1089/107632704322791673.
53. Hench L.L. Bioceramics: From concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 1991; 74 (7): 1485–1510. DOI: 10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x.
54. Bonfield W. Composites for bone replacement. *J. Biomed. Eng.* 1988; 10 (6): 522–526. DOI: 10.1016/0141-5425(88)90110-0.
55. Ural E., Kesenci K., Fambri L., Migliaresi C., Piskin E. Poly(D,L-lactide/e-caprolactone)/hydroxyapatite composites as bone filler: Preparation and characterization. *Biomaterials.* 2000; 21: 2147–2154. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00098-3.
56. Kikuchi M., Koyama Y., Yamada T., Imamura Y., Okada T., Noriaki S., Akita K., Takakuda K., Junzo T. Development of guided bone regeneration membrane composed of b-tricalcium phosphate and poly(L-lactide-co-glycolide-co-ε-caprolactone) composites. *Biomaterials.* 2004; 25 (28): 5979–5986. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.001.
57. Song J.H., Kim H.E., Kim H.W. Electrospun fibrous web of collagen-apatite precipitated nanocomposite for bone regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008; 19 (8): 2925–2932. DOI: 10.1007/s10856-008-3420-7.
58. Li C., Vepari C., Jin H.-J., Kim H.J., Kaplan D.L. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27 (16): 3115–3124. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.022.
59. Shimer A.L., Öner F.C., Vaccaro A.R. Spinal reconstruction and bone morphogenetic proteins: Open questions. *Injury.* 2009; 40: S32–38. DOI: 10.1016/s0020-1383(09)70009-9.
60. Suzuki Y., Tanihara M., Suzuki K., Saitou A., Sufan W., Nishimura Y. Alginate hydrogel linked with synthetic oligopeptide derived from BMP-2 allows ectopic osteoinduction *in vivo*. *J. Biomed. Mater. Res. Part B. Appl. Biomater.* 2015; 50: 405–409. DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(20000605)50:3<405::aid-jbm15>3.0.co;2-z.
61. Weng L., Boda S.K., Wang H., Teusink M.J., Shuler F.D., Xie J. Novel 3D hybrid nanofiber aerogels coupled with BMP-2

- peptides for cranial bone regeneration. *Adv. Healthc. Mater.* 2018; 7: 1701415. DOI: 10.1002/adhm.201701415.
62. Ye K., Liu D., Kuang H., Cai J., Chen W., Sun B., Xia L., Fang B., Morsi Y., Mo X. Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds displaying bone morphogenetic protein-2-derived peptides for the promotion of osteogenic differentiation of stem cells and bone regeneration. *J. Colloid Interface Sci.* 2019; 534: 625–636. DOI: 10.1016/j.jcis.2018.09.071.
63. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.* 2004; 84 (2): 649–698. DOI: 10.1152/physrev.00031.2003.
64. Sahoo S., Ouyang H., Goh J.C.-H., Tay T.E., Toh S.L. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006; 12 (1): 91–99. DOI: 10.1089/ten.2006.12.91.
65. Jawad H., Ali N., Lyon A., Chen Q., Harding S., Boccaccini A. Myocardial tissue engineering: a review. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007; 1 (5): 327–342. DOI: 10.1002/term.46.
66. Pavo N., Charwat S., Nyolczas N., Jakab A., Murlasits Z., Bergler-Klein J., Nikfardjam M., Benedek I., Benedek T., Pavo I.J., Gersh B.J., Huber K., Maurer G., Gyöngyösi M. Cell therapy for human ischemic heart diseases: critical review and summary of the clinical experiences. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2014; 75: 12–24. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.06.016.
67. Zong X., Bien H., Chung C.-Y., Yin L., Fang D., Hsiao B.S., Chu B., Entcheva E. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials.* 2005; 26 (26): 5330–5338. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.052.
68. Ravichandran R., Venugopal J.R., Sundarajan S., Mukherjee S., Sridhar R., Ramakrishna S. Expression of cardiac proteins in neonatal cardiomyocytes on PGS/fibrinogen core/shell substrate for Cardiac tissue engineering. *Int. J. Cardiol.* 2013; 167 (4): 1461–1468. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.04.045.
69. Kharaziha M., Nikkha M., Shin S., Annabi N., Masoumi N., Gaharwar A.K., Camci-Unal G., Khademhosseini A. PGS: Gelatin nanofibrous scaffolds with tunable mechanical and structural properties for engineering cardiac tissues. *Biomaterials.* 2013; 34: 6355–6366. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.045.
70. Hsiao C., Bai M., Chang Y., Chung M., Lee T., Wu C., Maiti B., Liao Z.-X., Li R.-K., Sung H.-W. Electrical coupling of isolated cardiomyocyte clusters grown on aligned conductive nanofibrous meshes for their synchronized beating. *Biomaterials.* 2013; 34: 1063–1072. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.065.
71. Jana S., Tefft B., Spoon D., Simari R. Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. *Acta Biomater.* 2014; 10 (7): 2877–2893. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.03.014.
72. Hong H., Dong N., Shi J., Chen S., Guo C., Hu P., Qi H. Fabrication of a novel hybrid heart valve leaflet for tissue engineering: an *in vitro* study. *Artif. Organs.* 2009; 33: 554–558. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2009.00742.x.
73. Kluin J., Talacua H., Smits A.I.P.M., Emmert M.Y., Bruggmans M.C.P., Fioretti E.S., Dijkman P.E., Söntjens S.H.M., Duijvelshoff R., Dekker S., Janssen-van den Broek M.W.J.T., Lintas V., Vink A., Hoerstrup S.P., Janssen H.M., Dankers P.Y.W., Baaijens F.P.T., Bouten C.V.C. *In situ* heart valve tissue engineering using a bioresorbable elastomeric implant – from material design to 12 months follow-up in sheep. *Biomaterials.* 2017 May; 125: 101–117. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.007.
74. Bezuidenhout D., Williams D. F., Zilla P. Polymeric heart valves for surgical implantation, catheter-based technologies and heart assist devices. *Biomaterials.* 2015; 36: 6–25. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.09.013.

Вклад авторов

Кретов Е.И. – окончательное утверждение рукописи для публикации. Заполоцкий Е.Н. – разработка концепции и дизайна, написание текста рукописи. Таркова А.Р. – окончательное утверждение рукописи для публикации. Прохорихин А.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Бойков А.А. – сбор, анализ и интерпретация данных. Малаев Д.У. – сбор, анализ и интерпретация данных.

Сведения об авторах

Кретов Евгений Иванович, канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, Центр интервенционной кардиологии, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-7109-9074.

Заполоцкий Евгений Николаевич, канд. хим. наук, мл. науч. сотрудник, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск. ORCID 0000-0001-7792-1500.

Таркова Александра Романовна, канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-4291-6047.

Прохорихин Алексей Андреевич, аспирант, Центр интервенционной кардиологии, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-3247-8290.

Бойков Андрей Александрович, аспирант, Центр интервенционной кардиологии, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-3129-5572.

Малаев Дастан Урматович, аспирант, Центр интервенционной кардиологии, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск. ORCID 0000-0001-6032-788X.

(✉) **Бойков Андрей Александрович**, e-mail: fimarik@gmail.com.

Поступила в редакцию 05.04.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Мониторинг антибиотикорезистентности: обзор информационных ресурсов

Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г.

*Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии (НИИАХ),
Смоленский государственный медицинский университет (СГМУ)
Россия, 214019, г. Смоленск, ул. Крупской, 28*

РЕЗЮМЕ

В последние десятилетия проблема антибиотикорезистентности занимает одну из ключевых позиций в системах общественного здравоохранения во всем мире и требует особого внимания со стороны медицинского сообщества. Для отслеживания динамики чувствительности микроорганизмов, с целью своевременной коррекции антимикробной терапии, важную роль играют системы мониторинга антибиотикорезистентности. Полученные в рамках мониторинга эпидемиологические данные также используются в фармацевтической промышленности при создании новых лекарственных препаратов и модификации разработанных ранее антимикробных субстанций. В статье рассматриваются некоторые из зарубежных и российских систем мониторинга, созданные в разное время. Следует отметить, что при разработке используются данные на уровне отдельных регионов, а ряд проектов представляет информацию в глобальном масштабе. Результаты проведенного сравнительного анализа имеющихся систем выявили как положительные стороны, так и параметры, которые требуют модернизации. При этом в наибольших изменениях нуждается процесс стандартизации сбора исходных данных для программ мониторинга. Большинство систем лимитировано по спектру рассматриваемых микроорганизмов и антимикробных препаратов. Важным моментом для функционирования систем мониторинга является поиск оптимального способа визуализации выходных данных при помощи таблиц, интерактивных карт и графиков. Значительное количество проектов требует дальнейшей проработки вариантов представления результатов. Возрастающая частота резистентных микроорганизмов требует постоянного мониторинга, являющегося важной составляющей современных концепций сдерживания антибиотикорезистентности.

Ключевые слова: системы анализа, антибиотикорезистентность, антимикробные препараты, эпидемиологический надзор.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г. Мониторинг антибиотикорезистентности: обзор информационных ресурсов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 163–170. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-163-170>.

Antimicrobial resistance monitoring: a review of information resources

Kuzmenkov A.Yu., Vinogradova A.G.

*Research Institute of Antimicrobial Therapy, Smolensk State Medical University
28, Krupskaya Str., Smolensk, 214019, Russian Federation*

✉ Виноградова Алина Геннадьевна, e-mail: alina.vinogradova@antibiotic.ru.

ABSTRACT

In the last decades, the problem of antibiotic resistance occupies one of the key positions in the global public health system and requires attention from the medical community. Antimicrobial resistance monitoring systems play an important role in tracking the changes in antimicrobial susceptibility for timely correction of antimicrobial therapy. The pharmaceutical industry applies epidemiological data obtained through such monitoring to the creation of new medicines and modification of the antimicrobial substances developed earlier. The article describes some of the international and Russian monitoring systems created at different times. It should be noted that during development, regional-level data are used, while a number of projects present information on a global scale. The completed comparative analysis of available systems revealed both positive aspects and parameters in need of renovation. At the same time, the standardization of collecting basic data for monitoring programs requires significant changes. The majority of systems are able to examine only a limited range of microorganisms and antimicrobials. An important point in the functioning of monitoring systems is a search for the optimal way to visualize output data in tables, interactive maps, and graphics. A significant amount of projects demand further work on the result presentation options. Constant monitoring is a significant component in modern concepts of antibiotic resistance control due to the increasing occurrence of resistant organisms.

Key words: analytical systems, antibiotic resistance, antimicrobials, surveillance.

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 they received no funding for the study.

For citation: Kuzmenkov A.Yu., Vinogradova A.G. Antimicrobial resistance monitoring: a review of information resources. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 163–170. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-163-170>.

ВВЕДЕНИЕ

Впервые сообщения о возникновении устойчивости микроорганизмов при применении антимикробных препаратов (АМП) стали появляться в 40-х гг. XX в. Изначально регистрировались случаи резистентности к действию пенициллинов, затем по мере внедрения в клиническую практику различных АМП, устойчивость к одному или нескольким препаратам выработали фактически все известные патогены [1]. Вследствие этого ключевым элементом борьбы с возникшей угрозой является мониторинг антибиотикорезистентности. К его основным составляющим относят непрерывный сбор, анализ и интерпретацию информации, связанной с антибиотикорезистентностью. Безукоризненной в работе может считаться система наблюдения, обладающая способностью постоянно отслеживать динамику резистентности к антибиотикам среди всех клинически значимых изолятов, исследуемых в лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ). Информация о показателях резистентности может быть применима для научно-исследовательских программ инфекционного контроля и рационального использования антибиотиков, кроме того используется при разработке практических мер, направленных на снижение уровня антибиотикорезистентности [2].

Программы мониторинга антибиотикорезистентности способны указать регионы, где проблема

имеет широкое распространение, географические объекты с интенсивными темпами нарастания резистентности и виды микроорганизмов, которые представляют максимальную угрозу для общественного здравоохранения [3–5]. Более того, система наблюдения относится к способам раннего предупреждения, и ее эффективность связана со скоростью получения информации заинтересованными лицами, которые при этом смогли принять ответные действия. В то же время доступ к актуальной и корректной информации в отношении уровня устойчивости возбудителей к АМП способствует формированию адекватной реакции на частные сообщения о случаях возникновения антибиотикорезистентности при несправедливой оценке ожидаемой эффективности препарата, что в итоге может усложнить проведение антимикробной терапии [2, 6].

При разработке системы мониторинга антибиотикорезистентности преследуются ряд ключевых целей: выявление, анализ, прогнозирование изменений в показателях антибиотикорезистентности и вспышек инфекций, обусловленных микроорганизмами с измененной устойчивости; установление новых механизмов резистентности, а также сопоставление активности новых антибиотиков до и после их внедрения в клиническую практику. Кроме того, важным звеном является возможность обучения как медицинского персонала, пациентов, так и обще-

ственности в целом. Следует отметить, что около 30 лет с момента обнаружения нечувствительных микроорганизмов понятия мониторинга антибиотикорезистентности в современном его представлении не существовало, поскольку все ограничивалось отдельными публикациями, описывающими случаи выявленной неэффективности АМП.

ЗАРУБЕЖНЫЕ ПРОГРАММЫ МОНИТОРИНГА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Косвенно о возникновении систем мониторинга антибиотикорезистентности можно говорить начиная с 1970 г., когда несколько клиник США сообщили о случаях возникновения внутрибольничных инфекций [7]. При этом ее непосредственной задачей был сбор данных о нозокомиальных инфекциях и чувствительности микроорганизмов к АМП. Эта локальная система впоследствии стала основой программы «Национальная система надзора за нозокомиальными инфекциями» США [8, 9].

Модернизация программ мониторинга антибиотикорезистентности безоговорочно свидетельствует о выходе качества организации на новый уровень. В настоящее время в работе современных инициатив по мониторингу антибиотикорезистентности можно определить уровни функционирования: локальный, региональный, национальный и международный. Наряду с этим уровни могут носить иерархичный характер, а для систем могут быть применены различные источники финансирования [10, 11]. Например, микробиологические лаборатории ряда европейских стран, работающих по вопросам антибиотикорезистентности, должны не менее одного раза в год предоставлять заинтересованным организациям и поставщикам медицинских услуг итоговые данные своих наблюдений [12]. Вместе с тем локальное наблюдение проводится лабораториями ЛПУ, планомерно предоставляющими отчет о чувствительности микроорганизмов. Разработка региональных, национальных и международных систем наблюдения осуществляется в США, Европе и других странах [8, 13, 14].

В группу национальных инициатив по мониторингу антибиотикорезистентности относится «Система активного бактериологического надзора» (ABC system, США), создание которой проводилось в рамках программы по исследованию инфекций в сотрудничестве с CDC (Centers for Disease Control and Prevention, США) для оценки тяжести инвазивных бактериальных процессов, в значительном проценте случаев проявляющихся как сепсис и менингит [4]. На сайте данного проекта опубликованы отчеты о частоте возникновения инфекций, вызван-

ных стрептококками различных групп, *H. influenzae*, MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*), *N. meningitidis*, кроме того содержится информация по некоторым демографическим показателям [15]. Оценка динамики и уровня развития инфекционных заболеваний на территории нескольких американских штатов проводится с помощью как молекулярных, так и микробиологических методов с последующим включением в рассмотренную систему.

Кроме того, созданы программы NNIS system (США) и «Глобальная система надзора за возникающими инфекциями» (GEIS, США) [16, 17]. Следует отметить, что отчет NNIS объединяет информацию из 300 клиник за период с 1992 по 2004 г., содержит частотные данные по нозокомиальным инфекциям и различные демографические параметры [18]. Одним из существенных недостатков является предоставление ограниченной информации по антибиотикорезистентности, включающей только определенный ряд возбудителей.

В начале 2000-х гг. произошло объединение нескольких систем в единую «Национальную сеть безопасности здравоохранения» (NHSN, США). Итоговые данные этой программы за 2006–2008 гг. предоставляют информацию об инфекционных процессах, обусловленных различными вариантами медицинских вмешательств и использованием устройств диагностического и терапевтического назначения [19]. С целью вывода своевременных и корректных данных NHSN сформировала онлайн-систему мониторинга антибиотикорезистентности при катетер-ассоциированной инфекции мочевыводящих путей, катетер-ассоциированной инфекции кровотока, а также инфекции области хирургического вмешательства [20]. Структурными элементами приложения являются: вводная страница, содержащая информацию о методах сбора данных, суммарные показатели антибиотикорезистентности; карта и интерактивная таблица по выбранным микроорганизмам. Кроме того, графическое отображение показателей чувствительности в соответствии с возрастом пациента, типом оперативного вмешательства и ЛПУ доступно пользователю в дополнительном разделе. Рассмотренная система не лишена недостатков, основными из которых является лимитированный выбор спектра антимикробных препаратов и микроорганизмов, отсутствие возможности выбора локализации инфекции и типа отделения. База данных, принятая за основу работы NHSN, не обновляется на регулярной основе, последнее обновление датируется 2015 г.

При непосредственной финансовой поддержке системы общественного здравоохранения Англии

(Public Health England, PHE) было разработано несколько проектов по мониторингу антибиотикорезистентности: «Система эпиднадзора второго уровня» (SGSS) и проект надзора за резистентностью (BSAC). Особенностью SGSS является предоставление итоговой информации в виде отчета о частотных характеристиках выделенных микроорганизмов и их чувствительности к антибактериальным препаратам. В то же время недостатком данной системы является запрет работы для незарегистрированных пользователей. Кроме того, информация, содержащаяся в этой системе, не может быть представлена интерактивно и не включает показатели по отдельным центрам [10]. В проекте BSAC принимают участие ряд стран: Англия, Уэльс, Шотландия, Северная Ирландия и Республика Ирландия [6]. Результатами работы этой системы являются формирование публикаций и веб-портал с функционирующими фильтрами, посредством выбора которых пользователь получает информацию о распределении штаммов с различным уровнем чувствительности, распределении минимальной подавляющей концентрации, а также о генетических маркерах резистентности. К слабым местам в проработке относится отсутствие графического и картографического представления данных, не предоставляется возможность рассмотрения данных на первичных уровнях агрегации.

CDC провели исследование деятельности 10 стран в отношении антибиотикорезистентности в рамках укрепления ресурсов в области надзора, реагирования и контроля возникающих инфекционных заболеваний. Выполнение мероприятий зависит от страны, в рамках которой они проводятся. Исследовательский проект на территории Египта включал университет и несколько государственных больниц с целью наблюдения за нозокомиальными инфекциями и антибиотикорезистентностью. В Таиланде и ряде стран Африки, таких как Кения, систематический надзор за антибиотикорезистентностью был выполнен на основе анализа популяции [21].

Международными проектами по мониторингу резистентности к антибактериальным препаратам относятся: Европейская система по наблюдению за антимикробной резистентностью (EARS-Net) [13], Latinoамериканская сеть по надзору за устойчивостью к антибиотикам (ReLAVRA – испанский акроним) [22], система эпиднадзора за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Восточной Европе (CAESAR) [23], Азиатская сеть по надзору за резистентными патогенами (ANSORP) [24], Система контроля и надзора за антибиотикорезистентностью в Средиземноморском регионе (ARMed) [25, 26], Система надзора за антибиотико-

резистентностью гонококков (GASP) [27], международное исследование «Антибиотикорезистентность детских инфекций в странах с низким уровнем дохода» (BIRDY) [28, 29], CDDEP (The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy) – ResistanceMap [30], Глобальная система надзора за антибиотикорезистентностью (GLASS) [31].

EARS-Net была организована в 1999 г. при финансовой поддержке Европейского центра по контролю заболеваний (ECDC). Собранные данные EARS-Net о резистентности, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium* опубликованы в отчете 2018 г., где в качестве клинического материала выбраны кровь или спинномозговая жидкость, тестирование проводилось к выборочным АМП [13, 32]. Необходимо отметить, что за основу ежегодно сформированного отчета приняты данные, которые датируются предыдущим годом, кроме того за последний трехлетний промежуток показана динамика устойчивости микроорганизмов в виде таблиц и карт, имеющих градиентную окраску. Результаты мониторинга в формате pdf также представлены интерактивной системой. Основные отрицательные характеристики заключаются в ограниченном спектре микроорганизмов и антибактериальных препаратов, доступ к результатам мониторинга отсрочен.

Европейские страны, не включенные в EARS-Net, и ряд стран Центральной Азии входят в систему Эпиднадзора за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Восточной Европе (CAESAR), работа которой осуществляется при финансовой поддержке Европейского регионального бюро Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Национального института общественного здравоохранения и окружающей среды Нидерландов, Министерства здравоохранения, социального обеспечения и спорта Нидерландов, Европейского общества клинической микробиологии и инфекционных болезней. Впервые ежегодный доклад CAESAR опубликован в 2014 г. и включал девять стран-участниц, представивших результаты тестирования восьми видов микроорганизмов (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* и *E. faecium*), клиническим материалом была кровь и ликвор. Структура отчета представлена вводной информацией о проекте, странах-участницах и специфике сбора данных. Результаты чувствительности микроорганизмов к АМП оформлены в виде таблиц, индивидуально для каждой страны [23]. Система, таким образом, недостаточна в выборе показателей сравнения, нет установления параметров локализации инфекции и типа

отделения, возможности представления данных лимитированы; кроме того, итоговые данные содержат определенное количество микроорганизмов, мониторинг по которым доступен в отсроченном порядке.

Совместными усилиями ВОЗ и Панамериканской организации здравоохранения была основана Латиноамериканская сеть по надзору за устойчивостью к антибиотикам (ReLAVRA). В работу включено 19 стран, которые ежегодно осуществляют передачу своих данных по антибиотикорезистентности. Отдельные публикации и официальный веб-портал представляют результаты. Недостатками могут считаться лимитированные возможности визуализации данных и выбора интересующих пользователя параметров, не предоставлен углубленный анализ данных [22].

Азиатская сеть по надзору за резистентными патогенами (ANSORP) создана по инициативе профессора Чжэ Хун Сун (медицинский центр Samsung, Сонгюнган, Сеул, Южная Корея). Главной задачей проекта является выполнение международных проспективных исследований по резистентности к АМП в Азиатском регионе. Первоначальный проект, разработанный группой ANSORP, затрагивал вопрос мониторинга устойчивости пневмококков. Ресурс проходит обновление через определенные временные промежутки, формируются отчеты о результатах проспективных исследований. С 2018 г. стала функционировать рабочая группа исследователей по сбору изолятов и обработке данных среди пациентов педиатрического профиля [24]. При этом, поскольку формат представления данных ограничен отчетами, возникают ожидаемые затруднения: в своевременном представлении данных для пользователя, видовом охвате микроорганизмов. Визуальная составляющая также относится к недостаточно доработанным сторонам проекта.

На протяжении четырехлетнего периода при спонсорстве директората Европейской комиссии по общим исследованиям функционировала Система контроля и надзора за антибиотикорезистентностью в Средиземноморском регионе (ARMed). В программе принимали участие девяти стран: Кипр, Иордания, Египет, Мальта (координатор), Марокко, Тунис, Алжир, Ливан и Турция. Оценивались показатели чувствительности инвазивных штаммов: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *E. faecium* и *E. faecalis*, а также адекватность назначения и приема антибактериальных препаратов. Ввиду прекращения внешнего финансирования в настоящее время ARMed приостановила свою работу [25].

CDDEP ResistanceMap – веб-сайт, разработанный при поддержке негосударственной организации

«Центр по динамике заболеваний, экономике и политике» (США).

Ресурс представляет данные о потреблении АМП и антибиотикорезистентности в формате регионов мира и по отдельным странам [30]. В работу включена информация о 12 видах микроорганизмов. Визуальное представление данных возможно в нескольких вариантах: интерактивной карты, тренда и столбчатой диаграммы. Система объединяет результаты работы из нескольких источников – Австралийской группы по резистентности к антибиотикам (AGAR), Европейской системы по мониторингу устойчивости к антибиотикам (EARS-Net), Канадского альянса антимикробной резистентности (CARA), Частного высокоспециализированного центра медицинской помощи (Кения), Системы надзора за общественным здоровьем (ESR, Новая Зеландия) и т.д. [30]. Несмотря на большой объем информационного материала, выбранного для формирования базы данных ResistanceMap, потенциальную эффективность системы снижают рамки отбора микроорганизмов и варианты представления данных, а также отсроченная публикация данных, обусловленная зависимостью от первоисточников.

Одна из ключевых позиций глобального плана действий по антибиотикорезистентности, принятого на сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения в 2015 г., принадлежит мероприятиям, направленным на укрепление доказательной базы в данной области [31]. При этом основными способами являются постоянное проведение исследований и наблюдений в глобальном масштабе. Рассмотренный план предусматривает развитие Глобальной системы надзора за антибиотикорезистентностью (GLASS). Для данного проекта по направлениям развития составлена дорожная карта на пять лет. В течение этого периода проводится мониторинг антибиотикорезистентности, основанный на клинических, микробиологических данных о приоритетных бактериальных возбудителях, целевое значение участников проекта к его окончанию должно достигнуть 40% от общего числа стран, входящих в ВОЗ [33, 34].

Наряду с национальными и международными организациями общемедицинского профиля, ряд фармацевтических компаний оказывают материальную поддержку для создания и поддержания работы систем мониторинга антибиотикорезистентности. В качестве примера можно назвать Alexander Project, MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection), SENTRY и TRUST [35–39].

Среди таких систем известен проект SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends), спонсируемый Merck & Co., Inc. (США). Ключевая

цель данной системы заключается в оценке *in vitro* чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к 12 препаратам при интраабдоминальных инфекциях и инфекциях мочевыводящих путей. Сайт предназначен для специалистов, работающих за пределами США [11]. Итоги работы доступны в виде интерактивной карты, публикации и постеров, начиная с 2009 г. Ограничение набора АМП и видов микроорганизмов, отображение суммарной информации без возможности детального пояснения, сужают спектр потенциального применения SMART.

ATLAS – система, созданная при поддержке компании Pfizer (США), представляет собой многокомпонентный ресурс, включающий базу данных, которая объединяет информацию из трех источников: данные программы надзора TEST (Tigecycline Evaluation Surveillance Trial), AWARE (Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance Evaluation) и INFORM (International Network for Optimal Resistance Monitoring); на текущий момент входят в состав данные свыше 630 тыс. изолятов. Пользователю доступен выбор параметров, где можно отфильтровать данные по видам микроорганизмов, антибактериальному препарату, географическому региону и году наблюдения. Выходная информация представлена в виде тепловой карты, тренда или в табличном варианте [40]. Точечная оценка показателей (в рамках городов) недоступна, и осуществление множественного сравнения также не представляется возможными, что подчеркивает необходимость дальнейшего развития проекта.

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ СИСТЕМ МОНИТОРИНГА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В Российской Федерации при непосредственном участии Научно-исследовательского института антимикробной химиотерапии (НИИАХ), Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) и под управлением Научно-методического центра развития по мониторингу антибиотикорезистентности РФ регулярно осуществляются проекты по мониторингу антибиотикорезистентности на национальном уровне [41]. Начиная с 90-х гг. XX в. проводились разнонаправленные проекты, такие как «РЕЗОРТ», «РЕВАНШ», «МАРАФОН», «Пегас», «START», «НОТА», «MARS», «STENT», «SPARS», «Дармис», «NPRS» [42]. Результаты работы были представлены электронными отчетами с визуальным подкреплением

в виде таблиц и графиков. Публикация по времени отставала на несколько месяцев и имела статический характер без возможности адаптации материала в соответствии с интересами пользователя.

С 2016 г. функционирует онлайн-платформа анализа данных резистентности к антимикробным препаратам в России – AMRmap. Значительное отличие – широкий набор инструментов для визуализации с возможностью выбора формата: графики, таблицы, интерактивные карты. Графическая мощь распространяется от столбчатой диаграммы до редко встречающихся вариантов – матриц и графов. Необходимо выделить внедренную систему фильтров, позволяющих получать результат как в масштабе федеральных округов, так и городов. Разработаны методы по оценке ассоциированной устойчивости и отображении имеющихся генетических детерминант устойчивости [43]. База данных, положенная в основу сайта, включает результаты многоцентровых проспективных исследований антибиотикорезистентности, проводимых НИИАХ и МАКМАХ, охватывает период с 1997 г. по настоящее время, при этом полученные изоляты повторно тестируются в центральной лаборатории НИИАХ. Несмотря на постоянные обновления, в дальнейшей проработке нуждается процесс формирования входных данных с улучшением общей цикличности внедрения данных в платформу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постоянная качественная работа систем мониторинга является важным подспорьем в контроле антибиотикорезистентности. Наибольшая эффективность при практическом применении возможна в условиях постоянного пополнения и расширения критериев, формирующих базу данных. Оптимальным является вариант проведения мониторинга, основанного на многоцентровых исследованиях, с внедрением в проект всех типов учреждений. На текущий момент локальные данные поступают преимущественно из крупных больниц, которые отражают показатели резистентности за счет большего количества пациентов. Таким образом, постоянное включение новых участников в процесс мониторинга антибиотикорезистентности, при неснижаемом качестве и интенсивности обработки протоколов исследований, сможет более точно охарактеризовать картину устойчивости микроорганизмов. Полученные данные при этом будут совершенствовать системы мониторинга, а представленная информация своевременно оптимизирует фармакотерапию с использованием антибактериальных препаратов в глобальном и национальном масштабе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ferri M., Ranucci E., Romagnoli P., Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017; 57 (13): 2857–2876. DOI: 10.1080/10408398.2015.1077192.
2. Masterton R. The Importance and Future of Antimicrobial Surveillance Studies. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47 (S1): S21–31. DOI: 10.1086/590063.
3. Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules.* 2018; 23 (4): e795. DOI: 10.3390/molecules23040795.
4. Sabtu N., Enoch D.A., Brown N.M. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? *Br. Med. Bull.* 2015; 116: 105–113. DOI: 10.1093/bmb/ldv041.
5. Karp B.E., Tate H., Plumblee J.R., Dessai U., Whichard J.M., Thacker E.L. et al. National antimicrobial resistance monitoring system: two decades of advancing public health through integrated surveillance of antimicrobial resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* 2017; 14 (10):545–557. DOI: 10.1089/fpd.2017.2283.
6. The British society for antimicrobial chemotherapy. Resistance surveillance project. URL: <http://www.bsacsurv.org/> (accessed date: 15.03.2019).
7. Hughes J.M. Nosocomial infection surveillance in the United States: historical perspective. *Infect. Control.* 1987; 8 (11): 450–453. DOI: 10.1017/s0195941700069769.
8. Horan T.C., Emori T.G. Definitions of key terms used in the NNIS system. *Am. J. Infect. Control.* 1997; 25 (2): 112–116. DOI: 10.1016/s0196-6553(97)90037-7.
9. Li Y., Gong Z., Lu Y., Hu G., Cai R., Chen Z. Impact of nosocomial infections surveillance on nosocomial infection rates: a systematic review. *Int. J. Surg.* 2017; 42: 164–169. DOI: 10.1016/j.ijssu.2017.04.065.
10. Public health England. Second generation surveillance system (SGSS). URL: <https://sgss.phe.org.uk/> (accessed date: 23.03.2019)
11. MSD. SMART: study for monitoring antimicrobial resistance trends. URL: <http://www.globalsmartsite.com/> (accessed date: 23.03.2019).
12. Johnson A.P. Surveillance of antibiotic resistance. *Philos Trans R Soc Lond B. Biol. Sci.* 2015; 370 (1670): 20140080. DOI: 10.1098/rstb.2014.0080.
13. ECDC. European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-Net). URL: <http://ecdc.europa.eu/en/health-topics/antimicrobial-resistance-and-consumption/antimicrobial-resistance/EARS-Net/Pages/EARS-Net.aspx> (accessed date: 20.03.2019).
14. Tacconelli E., Sifakis F., Harbarth S., Schrijver R., van Mourik M., Voss A. et al. Surveillance for control of antimicrobial resistance. *Lancet Infect. Dis.* 2018; 18 (3): e99–106. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30485-1.
15. CDC. Surveillance reports. URL: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/surv-reports.html> (accessed date: 19.03.2019).
16. Meyer W.G., Pavlin J.A., Hospenthal D., Murray C.K., Jerke K., Hawksworth A. et al. Antimicrobial resistance surveillance in the AFHSC-GEIS network. *BMC Public Health.* 2011; 11 (Suppl. 2): S8. DOI: 10.1186/1471-2458-11-S2-S8.
17. Chandrasekera R.M., Lesho E.P., Chukwuma U., Cummings J.F., Waterman P.E. The state of antimicrobial resistance surveillance in the military health system: a review of improvements made in the last 10 years and remaining surveillance gaps. *Mil. Med.* 2015; 180 (2): 145–150. DOI: 10.7205/MILMED-D-14-00297.
18. National nosocomial infections surveillance system. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control.* 2004; 32 (8): 470–485. DOI: 10.1016/S0196655304005425.
19. Edwards J.R., Peterson K.D., Mu Y., Banerjee S., Allen-Bridson K., Morrell G. et al. National healthcare safety network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. *Am. J. Infect. Control.* 2009; 37 (10): 783–805. DOI: 10.1016/j.ajic.2009.10.001.
20. CDC. Antibiotic resistance patient safety atlas – data on antibiotic-resistant healthcare-associated infections. URL: <http://www.gis.cdc.gov/grasp/PSA/MapView.html> (accessed date: 19.03.2019).
21. Harbarth S., Balkhy H.H., Goossens H., Jarlier V., Kluytmans J., Laxminarayan R. et al. Antimicrobial resistance: one world, one fight! *Antimicrob. Resist Infect Control.* 2015; 4 (1): 49. DOI: 10.1186/s13756-015-0091-2.
22. PAHO. Antimicrobial resistance. URL: <http://www.paho.org/antimicrobialresistance> (accessed date: 19.03.2019).
23. World Health Organization. Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Copenhagen: WHO regional office for Europe: World Health Organization, 2015: 59.
24. ANSORP. Asian network for surveillance of resistant pathogens. URL: http://www.ansorp.org/06_ansorp/ansorp_01.htm (accessed date: 19.03.2019).
25. Borg M.A., Cookson B.D., Zarb P., Scicluna E.A., ARMed steering group & collaborators. Antibiotic resistance surveillance and control in the Mediterranean region: report of the ARMed consensus conference. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2009; 3 (9): 654–659. DOI: 10.3855/jidc.210.
26. Ricciardi W., Giubbini G., Laurenti P. Surveillance and control of antibiotic resistance in the Mediterranean region. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2016; 8 (1): e2016036. DOI: 10.4084/MJHID.2016.036.
27. Gratrix J., Kamruzzaman A., Martin I., Smyczek P., Read R., Bertholet L. et al. Surveillance for Antimicrobial resistance in gonorrhoea: the alberta model, 2012–2016. *Antibiot. (Basel).* 2018; 7 (3): 63. DOI: 10.3390/antibiotics7030063.
28. Nadimpalli M., Delarocque-Astagneau E., Love D.C., Price L.B., Huynh B-T., Collard J.-M. et al. Combating global antibiotic resistance: emerging one health concerns in lower – and middle-income countries. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 66 (6): 963–969. DOI: 10.1093/cid/cix879.
29. MSF. Médecins sans frontières (MSF): resistance. URL: <http://www.msf.org/search?keyword=resistance> (accessed date: 20.03.2019).
30. CDDEP. ResistanceMap. Antibiotic resistance. URL: <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php> (accessed date: 21.03.2019).
31. WHO. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS). URL: <http://www.who.int/antimicrobial-resis->

- tance/global-action-plan/surveillance/glass/en/ (accessed date: 21.03.2019).
32. ECDC. European centre for disease prevention and control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Stockholm: ECDC, 2018: 108.
 33. WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance. URL: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/> (accessed date: 21.03.2019).
 34. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Health Organization, 2014: 257.
 35. Biedenbach D.J., Moet G.J., Jones R.N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance Program (1997–2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 50 (1): 59–69. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2004.05.003.
 36. Farrar J., Davies S. Report released on antibiotic resistance. *Nature*. 2016; 537 (7619): 167. DOI: 10.1038/537167a.
 37. Felmingham D., White A.R., Jacobs M.R., Appelbaum P.C., Poupard J., Miller L.A. et al. The Alexander project: the benefits from a decade of surveillance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56: 3–21. DOI: 10.1093/jac/dki297.
 38. Jones R.N., Mendes C., Turner P.J., Masterton R. An overview of the meropenem yearly susceptibility test information collection (MYSTIC) program: 1997–2004. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 53 (4): 247–256. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.10.006.
 39. Jones R.N., Flonta M., Gurler N., Cepparulo M., Mendes R.E., Castanheira M. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 78 (4): 429–436. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.008.
 40. Pfizer. ATLAS: Antimicrobial testing leadership and surveillance. URL: <https://atlas-surveillance.com> (accessed date: 22.03.2019).
 41. ЦМАР. Научно-методический центр по мониторингу антибиотикорезистентности Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию. URL: <http://docs.cntd.ru/document/901756499> (дата обращения: 22.03.2019).
 42. Состояние антибиотикорезистентности грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях интенсивной терапии. URL: <http://www.antibiotic.ru/rus/all/letters/argrmmnoz.shtml> (дата обращения: 22.03.2019).
 43. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19 (2): 84–90.

Сведения об авторах

Кузьменков Алексей Юрьевич, канд. мед. наук, зам. директора, НИИАХ, СГМУ, г. Смоленск. ORCID 0000-0001-9562-2096.

Виноградова Алина Геннадьевна, науч. сотрудник, НИИАХ, СГМУ, г. Смоленск. ORCID 0000-0002-0951-7810.

(✉) **Виноградова Алина Геннадьевна**, e-mail: alina.vinogradova@antibiotic.ru.

Поступила в редакцию 04.04.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Нейрогенное воспаление: биохимические маркеры, генетический контроль и болезни

Кучер А.Н.

*Научно-исследовательский институт (НИИ) медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634050, г. Томск, Набережная р. Ушайки, 10*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Нейрогенное воспаление представляет собой патологический процесс, в основе которого находятся двунаправленные взаимодействия между клетками нервной и иммунной систем, а также широкий спектр биологически активных веществ.

Цель. На основании научных публикаций и информации, представленной в базах данных, проанализировать маркеры нейрогенного воспаления (биохимические, генетические) и охарактеризовать их вовлеченность в патогенез болезней различных систем органов.

Результаты. Нейрогенное воспаление, протекающее при развитии различных заболеваний (астма, крапивница, атопический дерматит, псориаз, ревматоидный артрит, болевой синдром, интерстициальный цистит, колит и др.), характеризуется общностью этапов и патофизиологически активных веществ. Выделяемые нервными клетками медиаторы (субстанция Р, кокальцигенин, вазоактивный пептид), воздействуя на специфические рецепторы, способствуют дегрануляции тучных клеток с высвобождением комплекса биологически активных веществ (гистамин, триптаза, ростовой фактор нервов и др.), которые активируют воспалительный процесс. Биологически активные вещества и рецепторы, значимые для развития нейрогенного воспаления, находятся под генетическим контролем.

При этом наблюдаются перекрытия спектра заболеваний, для которых доказана значимость в патогенезе нейрогенного воспаления, с одной стороны, и ассоциированность с вариантами генов нейрогенного воспаления – с другой. Это позволяет заключить, что характер течения нейрогенного воспаления будет зависеть не только от этиологических факторов, но и от генетических особенностей ключевых молекул, вовлеченных в процессы нейрогенного воспаления. Общность патогенетических звеньев нейрогенного воспаления (на генетическом и патогенетическом уровнях) при различных патологиях может лежать в основе формирования коморбидных состояний.

Заключение. Понимание биохимических и генетических компонент развития нейрогенного воспаления представляет интерес для профилактики и лечения заболеваний (в том числе и коморбидных), в основе которых лежит данный патологический процесс.

Ключевые слова: нейрогенное воспаление, генетика.

Ключевые слова: системы анализа, антибиотикорезистентность, антимикробные препараты, эпидемиологический надзор.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования № 075-00603-19-00.

Для цитирования: Кучер А.Н. Нейрогенное воспаление: биохимические маркеры, генетический контроль и болезни. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 171–181. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-171-181>.

Neurogenic inflammation: biochemical markers, genetic control and diseases

Kucher A.N.

*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
10, Nab. Ushaiki Str., Tomsk, 634050, Russian Federation*

ABSTRACT

Neurogenic inflammation is a pathological process based on bidirectional interactions between cells of the nervous and immune systems as well as on a wide range of biologically active substances.

Aim. Basing on scientific publications and information provided in databases, to analyze markers of neurogenic inflammation (biochemical, genetic) and characterize their involvement in the pathogenesis of diseases of various organ systems.

Results. Neurogenic inflammation that occurs during the development of various diseases (asthma, urticaria, atopic dermatitis, psoriasis, rheumatoid arthritis, pain syndrome, interstitial cystitis, colitis, etc.) is characterized by common stages and pathophysiologically active substances. Mediators released by nerve cells (substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive peptide), acting on specific receptors, contribute to mast cell degranulation with the release of a complex of biologically active substances (histamine, tryptase, nerve growth factor, etc.), which activate inflammatory processes. Biologically active substances and receptors significant for the development of neurogenic inflammation are under genetic control. At the same time, there are overlaps of the spectrum of diseases for which importance in the pathogenesis of neurogenic inflammation is proved and an association between variants of neurogenic inflammation genes. This makes it possible to conclude that the course of neurogenic inflammation will depend not only on the etiological factors, but also on the genetic features of key molecules involved in neurogenic inflammation processes. The similarity of the pathogenetic links of neurogenic inflammation (at the genetic and biochemical levels) in various pathologies may underlie the formation of comorbid conditions.

Conclusion. Understanding the biochemical and genetic components of the development of neurogenic inflammation is of interest for prevention and treatment of diseases (including comorbid ones) based on this pathological process.

Key words: neurogenic inflammation, genetics.

Conflict of interest. The author declares that there are no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out within the government assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-00603-19-00 (Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences).

For citation: Kucher A.N. Neurogenic inflammation: biochemical markers, genetic control and diseases. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 171–181. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-171-181>.

ВВЕДЕНИЕ

Взаимоотношения между нервной и иммунной системами активно изучаются с точки зрения их вовлеченности в патогенез различных заболеваний, и в этом аспекте особый интерес вызывает нейрогенное воспаление [1, 2]. Под нейрогенным воспалением по-

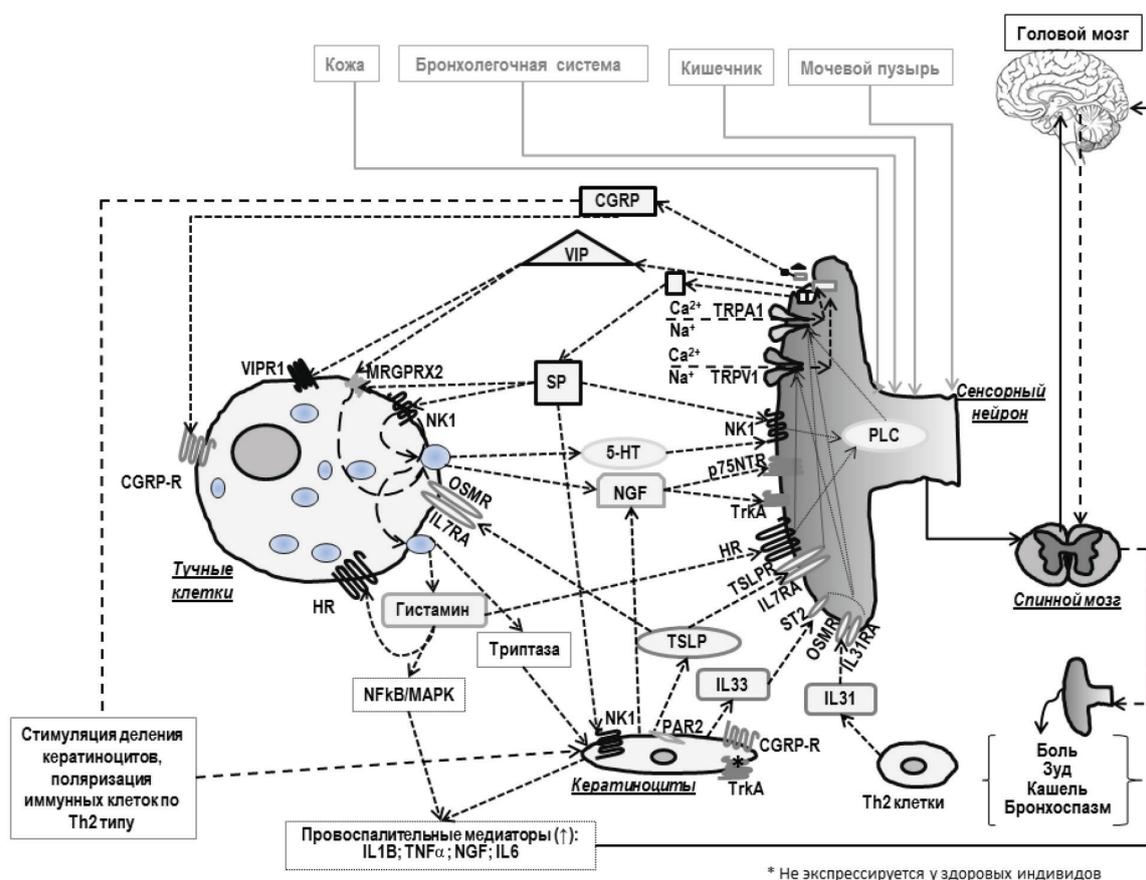
нимают каскад патогенетически значимых событий вследствие локального высвобождения воспалительных медиаторов из нервных клеток в ответ на неинфекционные стимулы [3–5]. Воздействие определенных раздражителей (аллергенов, химических веществ и др.) на нервные окончания запускает процессы с участием разных типов иммунных клеток, нервных воло-

кон периферической и центральной нервной систем и многочисленных физиологически активных веществ. Доказано, в частности, что при развитии аллергического воспаления нейроны активно взаимодействуют и регулируют функционирование тучных клеток, дендритных клеток, эозинофилов, Th2-клеток и др., причем между разными типами клеток формируются сложные, зачастую двунаправленные взаимосвязи [6, 7]. С нейрогенным воспалением связывают патогенез большого числа заболеваний и (или) симптомов болезней (в том числе астму, крапивницу, контактный дерматит, атопический дерматит, псориаз, ревматоидный артрит, болевой синдром, аутизм, цистит и др.), и их спектр постоянно увеличивается [1, 2, 8–18]. Бронхолегочная система, желудочно-кишечный тракт, мочеполовая система и кожа наиболее хорошо изучены с точки зрения процессов, протекающих при развитии нейрогенного воспаления, так как именно они в первую очередь подвергаются воздействию различных

повреждающих экзогенных агентов. Клинические и экспериментальные данные, накопленные к настоящему времени, свидетельствуют о сходстве этапов нейрогенного воспаления в различных системах органов [6, 11, 19, 20].

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕЙРОГЕННОГО ВОСПАЛЕНИЯ

В обобщенном и упрощенном виде развитие нейрогенного воспалительного процесса представлено на рисунке. В ответ на раздражение какими-либо агентами сенсорные нейроны, локализованные в эпителиальном слое кожи, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, мочевой системы, выделяют нейропептиды (субстанцию P – SP, вазоактивный интестинальный пептид – VIP, кокальцигенин – CGRP), которые активируют тучные клетки посредством воздействия на соответствующие рецепторы (NK1, MRGPRX2, VIPR1, CGRP-R).



* Не экспрессируется у здоровых индивидов

Рисунок. Развитие нейрогенного воспаления (составлено по [6, 21, 22]): SP – субстанция P, NK1 – рецептор для SP; VIP – вазоактивный интестинальный пептид, VIPR1 и MRGPRX2 – рецепторы VIP; CGRP – кокальцигенин, CGRP-R – рецептор кокальцигенина; 5-HT – серотонин, NGF – ростовой фактор нервов, p75NTR и TrkA – рецепторы NGF; TRPV1 и TRPA1 – кальциевые каналы; IL1B, IL6, IL31, IL33 – интерлейкин-1B, -6, -31, -33 соответственно, TNFα – фактор некроза опухоли альфа, TSLP – тимический стромальный лимфопоэтин; OSMR и IL17RA образуют рецептор для TSLP и IL31; ST2 – рецептор IL33; HR – гистаминовые рецепторы (известны четыре типа гистаминовых рецепторов – H1R, H2R, H3R и H4R), PLC – фосфолипаза C; MAPK – митогенактивированная протеинкиназа, NFκB – ядерный фактор каппа-b.

В результате активации из тучных клеток высвобождаются различные физиологически активные вещества – гистамин, триптаза, серотонин (5-НТ), фактор роста нервов (NGF) и др. Гистамин путем активации метаболического пути NFκB/MAPK способствует стимуляции выработки провоспалительных цитокинов (IL1B, TNFα, NGF, IL6), в результате чего развивается воспалительный процесс. Воздействуя на рецепторы, локализованные на нервных волокнах, гистамин, а также IL31, продуцируемый Th2-клетками, IL33, NGF и TSLP (тимический стромальный лимфопоэтин), вырабатываемые активированными триптазой кератиноцитами (в случае патологического процесса, затрагивающего кожные покровы, например, аллергии), способны активировать кальциевые каналы TRPV1 и TRPA1.

При активации кальциевых каналов происходит увеличение поступления в клетки ионов кальция, который, в свою очередь, также способствует высвобождению нейропептидов, вследствие этого происходит усиление иммуновоспалительного ответа. В результате наблюдаются такие патологические реакции, как зуд, боль, бронхоспазм, кашель, чихание, спазм кишечника, абдоминальная боль и др., т.е. есть широкий спектр патологических реакций в зависимости от того, в каком органе развивается нейровоспаление. Кроме того, CGRP, выделяемый сенсорными нейронами кожи в ответ на раздражение, не только индуцирует поляризацию иммунных клеток по Th2-пути, но и стимулирует деление кератиноцитов [6].

Обращает на себя внимание то, что одни и те же биологически активные вещества (гистамин, NGF, TSLP) способны активировать разные типы клеток и задействованы в различных патофизиологических процессах, а некоторые из них (гистамин и субстанция P) обладают как паракринным, так и аутокринным механизмами регуляции, что усложняет развитие патологического процесса. В целом вовлеченные в нейровоспаление медиаторы, такие как субстанция P, гистамин и 5-НТ, формируют вокруг кальциевых каналов саморегулируемый цикл, и независимо от того, с какого этапа он начался, даже незначительная активация более чем одного этапа приводит к синергетической активации всего цикла [21]. Это указывает на то, что потенциально нейрогенное воспаление может выступать в качестве значимого компонента патогенеза для широкого спектра заболеваний, вне зависимости от этиологического фактора, если имеет место дисбаланс по синтезу/деградации медиаторов нейровоспаления. Например, патологические процессы по типу нейрогенного воспаления регистрируются как при астме аллергической природы [1], так и при воздействии табачного дыма (в тканях

легких, слизистой оболочки носа и гортани, головного мозга) [4, 23].

Аналогичные (или очень близкие) механизмы развития воспалительного процесса наблюдаются и при других патологиях. В развитие нейродегенеративных процессов (при болезни Альцгеймера, Паркинсона, множественном склерозе) вовлечены такие воспалительные и нейротоксичные медиаторы, как IL1B, IL33, TNFα, субстанция P и др. [20], которые высвобождаются тучными клетками, нейронами и другими типами клеток. Это приводит к повышению концентрации ионов Ca внутри клеток и активации MAPK и ядерного фактора каппа-b (NFκB). Кроме того, при повреждении гематоэнцефалического барьера (вследствие прогрессирования нейродегенеративных заболеваний или по каким-либо другим причинам) иммунные клетки и медиаторы воспаления могут попадать в головной мозг с периферии, что усиливает нейровоспаление и нейродегенеративные процессы при данных заболеваниях.

По мнению И.В. Стагинева и А.Г. Волкова [24], лишь с точки зрения этиологических факторов оправдано разделение лицевых болевых симптомов при заболеваниях околоносовых пазух на соматические и нейрогенные, тогда как в клиническом проявлении заболеваний патогенетические механизмы неразделимы. Установлена вовлеченность вещества P, гистамина и других значимых для развития нейрогенного воспаления веществ в патофизиологические процессы при ревматоидном артрите [11], психогенной крапивнице [8], риносинусите [13] и лицевой боли при риносинусите [24], церебральной дисфункции при хроническом табакокурении [23], псориазе [10], цистите [18]. Интересно, что гистамин, как одна из ключевых молекул нейрогенного воспаления, может провоцировать развитие не только хорошо известных аллергических патологических реакций кожи (зуд, крапивница) и бронхолегочной системы (заложенность носа, ринорея, бронхоспазм и др.), но и приводит к нарушению работы сердечно-сосудистой и нервной систем (аритмии, анафилаксия, гипотония/гипертония, головокружение, головная боль, мигрень, рвота, возбуждение, регуляция температуры тела и др.), желудочно-кишечного тракта (метеоризм, абдоминальная боль), мочеполовой системы (дисменорея, интерстициальный цистит) и т.д. [3, 25, 26]. С учетом значимости данного амина для развития нейрогенного воспаления, можно предположить, что и для всех этих патологий в определенной степени может быть значим нейрогенный компонент.

Нейрогенное воспаление – это защитная реакция организма в ответ на те или иные экзогенные стимулы. Однако при определенных условиях (длительное

воздействие стимула, дисбаланс в регуляции стимулирующих и ингибирующих нейрогенное воспалительное веществ и др.) может происходить хронизация данного патофизиологического процесса.

АССОЦИИИ ГЕНОВ, ПРОДУКТЫ КОТОРЫХ ВОВЛЕЧЕНЫ В НЕЙРОГЕННОЕ ВОСПАЛЕНИЕ, С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

В процессе развития нейрогенного воспаления участвуют многочисленные молекулы различных функциональных классов, структурные и функциональные свойства которых зависят от кодирующих их генов или генов, чьи продукты вовлечены в синтез и деградацию таких биологически активных веществ (в частности, в синтез гистамина, серотонина). Гены нейрогенного воспаления в разной степени изучены с точки зрения ассоциированности с за-

болеваниями и (или) патологическими фенотипами (табл. 1). Наиболее часто привлекали к анализу ген, кодирующий фактор некроза опухоли альфа (*TNF*), и ген интерлейкина 1 β (*IL1B*), единичные сообщения есть в отношении гена триптазы β 2 (*TPSB2*) и гена одного из рецепторов тучных клеток (*MRGPRX2*). Однако уже на данном этапе исследований на основании накопленных данных можно заключить, что, с одной стороны, подавляющее число генов нейрогенного воспаления можно охарактеризовать как высокоплейотропные (причем, индекс плейотропности тем выше, чем более активно изучался ген), с другой – высокий индекс плейотропности генов сочетается с низким индексом специфичности, т.е. варианты гена чаще показывают ассоциации не с заболеванием, а с фенотипами (признаками) и группами болезней.

Таблица 1

Функциональная «нагруженность» генов, продукты которых участвуют в процессах нейрогенного воспаления, по данным базы DisGeNET [27, 28])

Ген	Всего ассоциировано болезней/фенотипов	DPI	DSI	Число ассоциированных SNP
<i>TNF</i>	1 640	0,966	0,263	21
<i>IL1B</i>	1 035	0,931	0,312	15
<i>PTGS2</i>	832	0,897	0,338	24
<i>POMC</i>	557	0,862	0,382	20
<i>NGF</i>	323	0,862	0,426	5
<i>NTRK1</i>	306	0,759	0,443	36
<i>TRPV4</i>	289	0,759	0,519	51
<i>CALCA</i>	274	0,828	0,456	1
<i>TAC1</i>	252	0,793	0,473	–
<i>TRPV1</i>	173	0,724	0,532	5
<i>F2RL1</i>	165	0,724	0,514	1
<i>IL33</i>	164	0,793	0,503	18
<i>NGFR</i>	160	0,724	0,508	2
<i>VIP</i>	152	0,759	0,526	2
<i>DDC</i>	131	0,621	0,554	50
<i>IL7R</i>	121	0,724	0,538	19
<i>TSLP</i>	107	0,690	0,547	9
<i>TACR1</i>	105	0,724	0,559	6
<i>MCAM</i>	85	0,621	0,572	1
<i>TRPA1</i>	74	0,621	0,639	4
<i>APP</i>	71	0,862	0,430	63
<i>PLCG1</i>	62	0,517	0,611	4
<i>VIPR1</i>	56	0,483	0,624	2
<i>IL1RL1</i>	54	0,586	0,616	38
<i>PNOC</i>	52	0,414	0,672	–
<i>HRH1</i>	45	0,414	0,685	2
<i>CRLF2</i>	43	0,483	0,639	2
<i>IL31RA</i>	42	0,517	0,645	4
<i>HDC</i>	39	0,517	0,639	6
<i>OSMR</i>	38	0,448	0,648	8
<i>HRH3</i>	37	0,345	0,648	2

Окончание табл. 1

Ген	Всего ассоциировано болезней/фенотипов	DPI	DSI	Число ассоциированных SNP
<i>AMN</i>	36	0,517	0,701	19
<i>HRH2</i>	32	0,310	0,663	–
<i>HRH4</i>	32	0,379	0,676	8
<i>VIPR2</i>	31	0,483	0,667	2
<i>CIRBP</i>	30	0,448	0,663	–
<i>TPH2</i>	28	0,552	0,562	28
<i>IL31</i>	23	0,276	0,727	1
<i>CALCRL</i>	21	0,517	0,707	2
<i>MRGPRX1</i>	21	0,483	0,752	–
<i>TPSAB1</i>	15	0,345	0,762	–
<i>TPSD1</i>	11	0,276	0,799	–
<i>TPSG1</i>	11	0,276	0,773	–
<i>TPSB2</i>	2	0,103	1,0	–
<i>MRGPRX2</i>	1	0,069	1,0	–

Примечание. DPI – индекс плейотропности: чем он выше, тем к большему числу разных классов болезней (MeSH) относятся ассоциированные патологии; DSI – индекс специфичности болезни (признака): чем больше показатель, тем с меньшим числом болезней ассоциирован ген, варьирует от 0,25 до 1; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

Можно предположить, что в данном случае гены нейрогенного воспаления чаще выступают в качестве генетического фона, определяющего ответ на тот или иной экзогенный стимул (этиологический фактор), а не являются основными причинными факторами развития болезни. Например, варианты гена *TAC1* (кодирует субстанцию P) ассоциированы с широким спектром заболеваний и фенотипов (депрессивное расстройство, психическая депрессия, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, гиперреактивность бронхов, гиперемия, цирроз, колит, боль, зуд, тактильная аллодиния, воспаление, гипералгезия (вторичная), невралгия, фиброз, гипотония, брадикардия, аллергические реакции, отек и др.), некоторые из этих заболеваний ассоциированы также с вариантами гена *TACR1*, кодирующего рецептор субстанции P (в том числе гипералгезия, психическая депрессия, брадикардия, тактильная аллодиния, колит и др.) [27, 28]. Это согласуется с патогенетической значимостью белков, кодируемых данными генами, в универсальном нейрогенном компоненте патогенеза широкого спектра болезней различных систем органов.

Спектр заболеваний, для которых значимым с патогенетической точки зрения может оказаться нейрогенное воспаление, шире, чем это признано в настоящее время, косвенным подтверждением чего являются данные ассоциативных исследований. Гены нейрогенного воспаления избыточно представлены среди генов, ассоциированных с заболеваниями различных систем органов (т.е. они регистрируются чаще, чем этого следовало бы ожидать при случайном выявлении ассоциаций соответствующих болезней с данными генами) (табл. 2). С учетом

функциональной значимости генов нейрогенного воспаления, ожидаемым является, что они оказались избыточно представлены среди ассоциированных с такими заболеваниями/признаками, как гипералгезия, отек, воспаление и боль, зуд, астма, атопический дерматит, а также психоневрологические нарушения. Кроме того, гены данного патологического процесса избыточно представлены среди генов, ассоциированных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы (гипотония, гипертония, атеросклероз, брадикардия и т.д.), желудочно-кишечного тракта (колит), мочеполовой системы (гломерулонефрит, альбуминурия, цистит) и др.

Например, согласно базе DisGeNET [27, 28], с гипотонией установлены ассоциации с вариантами генов *DDC*, *HRH1*, *IL1B*, *PNOC*, *POMC*, *TAC1*, *TNF*, *VIP* (для восьми из 82 ассоциаций с данной патологией достигнутый уровень значимости с поправкой на множественность сравнения составил $FDR = 1,27 \times 10^{-6}$, см. табл. 2), с гипертонией – *CALCA*, *HRH3*, *IL1B*, *POMC*, *PTGS2*, *NACR1*, *TNF* (для семи из 302 $FDR = 0,029$), с атеросклерозом – *HRH1*, *PTGS2*, *TNF*, *TRPV1* (для четырех из 59 $FDR = 0,0164$), с гломерулонефритом – *IL1B*, *NGF*, *POMC*, *TNF* (для четырех из 40 $FDR = 0,004$), с колитом – *IL1B*, *PTGS2*, *TNF* (для трех из 40 $FDR = 0,031$) и т.д. В целом эти ассоциации, с одной стороны, легко объяснимы с учетом значимости воспаления в развитии вышеуказанных заболеваний, с другой – поддержку нейрогенного воспаления как одного из патогенетически значимых процессов при данных патологиях обеспечивают клинические и экспериментальные исследования [2, 29 и др.].

Таблица 2

Результаты анализа обогащения для генов, продукты которых вовлечены в нейrogenное воспаление					
Заболевание/признак	Расчетные параметры*				
	<i>N</i>	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>FDR</i>
Гипералгезия	80	0,349	34,36	$4,44 \times 10^{-16}$	$1,14 \times 10^{-12}$
Отек	69	0,301	26,56	$4,25 \times 10^{-10}$	$7,25 \times 10^{-7}$
Гиперреактивность бронхов	12	0,052	95,44	$9,42 \times 10^{-10}$	$1,02 \times 10^{-6}$
Воспаление	114	0,498	18,08	$1,00 \times 10^{-9}$	$1,02 \times 10^{-6}$
Боль	79	0,344	23,20	$1,28 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-6}$
Гипотония	82	0,358	22,35	$1,74 \times 10^{-9}$	$1,27 \times 10^{-6}$
Зуд	59	0,258	27,18	$4,96 \times 10^{-9}$	$3,17 \times 10^{-6}$
Амнезия	17	0,074	67,378	$7,24 \times 10^{-9}$	$4,12 \times 10^{-6}$
Психическая депрессия	260	1,135	9,69	$8,37 \times 10^{-8}$	$4,28 \times 10^{-6}$
Артрит, экспериментальный	40	0,175	34,36	$1,60 \times 10^{-8}$	$7,42 \times 10^{-6}$
Биполярное расстройство	516	2,253	5,77	$1,39 \times 10^{-7}$	$5,93 \times 10^{-5}$
Депрессивное расстройство	413	1,803	6,100	$9,37 \times 10^{-7}$	$3,69 \times 10^{-4}$
Синдром отмены	53	0,231	21,61	$3,00 \times 10^{-6}$	0,0011
Астма	99	0,432	13,88	$3,86 \times 10^{-6}$	0,0013
Гломерулонефрит	34	0,149	26,95	$1,31 \times 10^{-5}$	0,0041
Расстройство настроения	187	0,816	8,57	$1,14 \times 10^{-5}$	0,0041
Лихорадка	127	0,554	10,82	$1,63 \times 10^{-5}$	0,0044
Невралгия тройничного нерва	12	0,052	57,26	$1,65 \times 10^{-5}$	0,0044
Дерматит, атопический	37	0,161	24,76	$1,85 \times 10^{-5}$	0,0047
Гиперемия	13	0,057	52,86	$2,14 \times 10^{-5}$	0,0052
Расстройство памяти	40	0,175	22,91	$2,53 \times 10^{-5}$	0,0059
Невралгия	14	0,061	49,08	$2,71 \times 10^{-5}$	0,0060
Множественный склероз	42	0,183	21,81	$3,08 \times 10^{-5}$	0,0066
Язва желудка	18	0,0795	38,18	$6,00 \times 10^{-5}$	0,0123
Шизофрения	1 041	4,54	3,08	$7,06 \times 10^{-5}$	0,0139
Некроз	53	0,231	17,88	$7,79 \times 10^{-5}$	0,0148
Травма легких	20	0,087	34,36	$8,33 \times 10^{-5}$	0,015
Нарушение мозгового кровообращения	57	0,276	14,49	$1,53 \times 10^{-4}$	$9,46 \times 10^{-3}$
Гиперактивный мочевой пузырь / Цистит / Наследственные сенсорно-вегетативные невропатии / Язвенная болезнь и остеомиелит, приводящие к аутоампутации / Карбункулы / Синдром истощения при вирусе иммунодефицита человека**	4	0,017	114,53	$1,11 \times 10^{-4}$	0,016
Клиническая депрессия	262	1,144	6,12	$1,19 \times 10^{-4}$	0,016
Атеросклероз	59	0,258	15,53	$1,19 \times 10^{-4}$	0,016
Дегенеративные болезни нервной системы	120	0,524	9,54	$1,61 \times 10^{-4}$	0,022
Альбинурия	25	0,109	27,49	$1,66 \times 10^{-4}$	0,022
Наследственная сенсорная вегетативная невропатия, тип 5 / Отсутствие болевой чувствительности / Полимиозит**	5	0,022	91,62	$1,84 \times 10^{-4}$	0,022
Нарушения процесса обучения	29	0,127	23,70	$2,60 \times 10^{-4}$	0,029
Врожденная нечувствительность к боли / Нарушение сна / Инфекции / Остеопороз в постменопаузе / Дерматомиозит / Экстравакция диагностических и лечебных материалов**	6	0,026	76,35	$2,76 \times 10^{-4}$	0,029
Гипертоническая болезнь	302	1,319	5,31	$2,85 \times 10^{-4}$	0,029
Когнитивные нарушения	30	0,131	22,91	$2,88 \times 10^{-4}$	0,029
Колит	31	0,135	22,17	$3,18 \times 10^{-4}$	0,031
Карцинома, переходноклеточная	33	0,144	20,82	$3,83 \times 10^{-4}$	0,037
Астма, профессиональная	7	0,031	65,44	$3,85 \times 10^{-4}$	0,037
Брадикардия	36	0,157	19,09	$4,97 \times 10^{-4}$	0,045
Обыкновенная мигрень / Плеврит / Кожный лейшманиоз**	8	0,035	57,26	$5,12 \times 10^{-4}$	0,045
Новообразования щитовидной железы	37	0,162	18,57	$5,40 \times 10^{-4}$	0,047
Пневмония	89	0,389	10,29	$5,80 \times 10^{-4}$	0,0495

Примечание. *N* – общее число известных генов, ассоциированных с данным заболеванием (признаком); *E* – ожидаемое число ассоциированных генов для данного заболевания/признака из тестируемых; *R* – избыточная представленность генов в тестируемой панели по сравнению с ожидаемым числом (обогащение); *p* – достигнутый уровень значимости при оценке обогащения; *FDR* – уровень значимости с поправкой по методу Бенджамини – Хохберга.

* анализ обогащения проведен по WebGestalt [30, 31] с использованием метода Overrepresentation Enrichment Analysis, для категории «Заболевания» – по DisGeNET [27, 28].

** приведены болезни с одинаковыми расчетными показателями, но которые могут быть ассоциированы с разными генами.

Приведенные в базе DisGeNET [27, 28] данные об ассоциированности генов с заболеваниями имеют разную доказательную базу, но для 18 их них установлены высокозначимые связи (табл. 3). Варианты генов нейрогенного воспаления не только предрасполагали к развитию заболеваний многофакторной природы, но и выступали в качестве причины моногенных болезней. Среди заболеваний с доказанной вовлеченностью в их патогенез генов нейрогенного воспаления широкий спектр нейропсихических

нарушений (сосудистая деменция, семейная вегетативная дисфункция, интеллектуальная недееспособность и др.), астма, мигрень, эндокринные расстройства (ожирение), нарушение чувствительности к боли, иммунные нарушения и т.д. Конечно, не для всех приведенных в табл. 2 и 3 заболеваний нейрогенное воспаление является единственным механизмом патогенеза, но можно ожидать, что данный компонент может быть как минимум модифицирующим фактором развития и течения болезни.

Таблица 3

Заболевания, для которых доказана патогенетическая значимость вовлеченных в нейрогенное воспаление генов	
Ген	Заболевание
<i>TNF</i>	Предрасположенность к астме {600807/AD}, церебральной малярии {611162}, мигрени без ауры {157300/AD}, сосудистой деменции ^s , септическому шоку ^s
<i>IL1B</i>	Семейная болезнь Меньера (L); риск рака желудка после инфекции <i>H. pylori</i> {137215/AD}
<i>PTGS2</i>	Семейная болезнь Меньера (L)
<i>POMC</i>	Ожирение, надпочечниковая недостаточность и рыжие волосы из-за дефицита POMC {609734/AR}; предрасположенность к ожирению с ранним началом {601665/Mu, AR, AD}
<i>NGF</i>	Интеллектуальная недееспособность* (S); болевое расстройство (S); болезнь Шарко–Мари–Туа (S); семейная вегетативная дисфункция (S); наследственная невропатия, сенсорная и вегетативная, тип V {608654/AR}
<i>NTRK1</i>	Интеллектуальная недееспособность* (S); болевое расстройство (S); болезнь Шарко – Мари – Туа (S); семейная вегетативная дисфункция (S); врожденная нечувствительность к боли с анги-дрозом {256800/AR}; семейный медулярный рак щитовидной железы {155240/AD}
<i>TRPV4</i>	Болезнь Шарко – Мари – Туа (S); артрогрипоз (S); интеллектуальная недееспособность* (M); синдром Клейна – Левина (L)
<i>DDC</i>	Интеллектуальная недееспособность* (S); недостаточность декарбоксилазы ароматических аминокислот {608643/AR}
<i>IL7R</i>	Тяжелый комбинированный иммунодефицит, тип T–B+NK+ {608971/AR}
<i>TRPA1</i>	Болевое расстройство (S); семейный эпизодический болевой синдром, 1 {615040/AD}
<i>APP</i>	Синдром периодической лихорадки (L); болезнь Альцгеймера 1, семейная {104300/AD}; церебральная амилоидная ангиопатия, голландский, итальянский, айова, фламандский, арктический варианты {605714/AD}
<i>CRLF2</i>	Интеллектуальная недееспособность* (L)
<i>IL31RA</i>	Синдром периодической лихорадки (L); первичный амилоидоз кожи, 2 {613955/AD}
<i>HDC</i>	Предрасположенность к синдрому Туретта {37580/AD}
<i>OSMR</i>	Синдром периодической лихорадки (S); первичный амилоидоз кожи, 1 {105250/AD}
<i>AMN</i>	Врожденная анемия (S), цитопения** (S); мегалобластная анемия-1, норвежский тип {261100/AR}
<i>TPH2</i>	Интеллектуальная недееспособность* (S); предрасположенность к синдрому дефицита внимания и гиперактивности, 7 {613003}; к униполярной депрессии {608516}
<i>TPSAB1</i>	Синдром Элерса – Данлоса (L)

Примечание. Уровень доказательности ассоциированности гена с патологией по ClinGen и Genomics England (взято из DisGeNET [27, 28]) приведен в круглых скобках: S – сильная связь; M – умеренная связь; L – слабая связь; в фигурных скобках представлены номер из OMIM/тип наследования (AD – аутосомно-доминантный; AR – аутосомно-рецессивный, Mu – мутационная природа) [32].

* отмечены группы патологий, ** фенотип; ^s номер фенотипа в OMIM не указан.

Помимо структурных вариантов генов, на характер течения нейрогенного воспаления могут влиять эпигенетические механизмы, которые в свою очередь могут зависеть от средовых факторов. Так, между роженицами с преэклампсией и нормально протекающей беременностью установлены различия по уровню метилирования генов нейрогенного воспаления (*POMC*, *CALCA*) в лейкоцитах крови [33], что может определять и различия по уровню экспрессии данных генов. Согласно информации, представленной в DisGeNET [27, 28], варианты этих

двух генов также ассоциированы с гипертонической болезнью, что показано в подавляющем большинстве выполненных ассоциативных исследований.

КОМОРБИДНОСТЬ ЗАБОЛЕВАНИЙ СО ЗНАЧИМОЙ КОМПОНЕНТОЙ НЕЙРОГЕННОГО ВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ

Общность генетической и, соответственно, биохимической составляющей нейрогенного воспаления для различных патологий предполагает возможность формирования коморбидности (полиморбидно-

сти). Наибольшее число клинических исследований было выполнено по изучению коморбидности между аллергическими и психоневрологическими заболеваниями (см. обзор [34]). Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что не только аллергические заболевания увеличивают вероятность коморбидности с психоневрологическими заболеваниями, но наблюдается и обратная ситуация – у пациентов с психоневрологическими нарушениями выше риск развития аллергических патологий.

Известны и другие примеры коморбидности. Так, показано, что при бронхиальной астме часто наблюдается обострение заболеваний желудочно-кишечного тракта (в слизистой оболочке желудка при обострении бронхиальной астмы регистрируется увеличение числа клеток, активных на гистамин) [35]. При депрессии выявляют дисрегуляцию в ферментативном продуцировании и деградации катехоламинов, нейротрансмиттеров (в том числе и гистамина), гормонов и иммунологических белков, причем между этими молекулами регистрируются циклические взаимодействия, когда увеличение или уменьшение одного показателя может приводить к стимулирующему или ингибирующему действию для других [22], что хорошо согласуется с моделью нейрогенного воспаления с участием гистамина (см. рис.).

Установлено также, что повышение уровня воспалительных маркеров в тканях головного мозга может приводить к изменению системного иммунного ответа на периферии [36]. В исследованиях на животных показано, что хронический стресс приводит к увеличению экспрессии генов *IL1B* и *TAC1* в лейкоцитах крови, а также к нарушению функционирования легочной системы [37]. При коморбидности различных заболеваний (например, аллергических и психоневрологических) общность патофизиологических механизмов поддерживается не только сходством механизмов нейрогенного воспаления, но и данными генетических исследований, выполненных с использованием как кандидатного подхода [38], так и полногеномных ассоциативных исследований [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, общность патофизиологических процессов развития нейрогенного воспаления и генетические особенности индивидов по полиморфным вариантам генов нейрогенного воспаления могут лежать в основе формирования коморбидных состояний, таких как аллергические заболевания, проявляющиеся на уровне различных систем органов (бронхолегочной системы, желудочно-кишечного тракта и др.), и психоневрологические заболевания.

Можно предположить, что развитие нейрогенного воспаления в одном органе, в случае его хронизации, может увеличить риск развития коморбидных воспалительных заболеваний других систем органов. Этому могут способствовать перенос гистамина, субстанции P и других ключевых медиаторов развития нейрогенного воспаления (в том числе и через гематоэнцефалический барьер в случае его повреждения), а также некоторые средовые факторы с однонаправленным неблагоприятным эффектом (например, избыточное поступление в организм гистамина с продуктами питания), особенно при генетических особенностях индивидов, благоприятствующих развитию нейрогенного воспаления.

В связи с вышесказанным представляется актуальным выявление тех заболеваний, в патогенезе которых существенная роль принадлежит нейрогенному воспалению. Установление общности и специфичности патофизиологических процессов нейрогенного воспаления на биохимическом и генетическом уровнях при развитии патологических состояний различных систем органов имеет важное значение для понимания закономерностей формирования болезней и, соответственно, для их профилактики и определения тактики лечения пациентов, в том числе и с коморбидными состояниями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nassenstein C., Krasteva-Christ G., Renz H. New aspects of neuroinflammation and neuroimmune crosstalk in the airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018; 142 (5): 1415–1422. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.09.011.
2. Tanaka S., Okusa M.D. AKI and the neuroimmune axis. *Semin. Nephrol.* 2019; 39 (1): 85–95. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2018.10.008.
3. Rosa A.C., Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 170 (1): 38–45. DOI: 10.1111/bph.12266.
4. Лепейко Ю.Б., Невзорова В.А., Гилифанов Е.А., Павлуш Д.Г., Дюйзен И.В. Изменение активности нейрокининовой системы в слизистой оболочке верхних дыхательных путей крыс при моделировании хронического табакокурения. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2015; 35 (1): 19–27.
5. Li M., Fan X., Ji L., Fan Y., Xu L. Exacerbating effects of trimellitic anhydride in ovalbumin-induced asthmatic mice and the gene and protein expressions of TRPA1, TRPV1, TRPV2 in lung tissue. *Int. Immunopharmacol.* 2019; 69: 159–168. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.01.038.
6. Voisin T., Bouvier A., Chiu I.M. Neuro-immune interactions in allergic diseases: novel targets for therapeutics. *Int. Immunol.* 2017; 29 (6): 247–261. DOI: 10.1093/intimm/dxx040.
7. Galdiero M.R., Varricchi G., Seaf M., Marone G., Levi-Schaffer F., Marone G. Bidirectional mast cell-eosinophil interac-

- tions in inflammatory disorders and cancer. *Front. Med. (Lausanne)*. 2017; 4: 103. DOI: 10.3389/fmed.2017.00103.
8. Орлова Е.А., Молотилов Б.А. Участие нейрогенного воспаления в патогенезе хронической психогенной крапивницы. *Практическая медицина*. 2012; 6 (61): 51–55.
 9. Чумасов Е.И., Майстренко Н.А., Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Довганюк В.С., Прядко А.С., Бойко И.Ю. Особенности нейроиммунных межклеточных взаимоотношений в поджелудочной железе при хроническом панкреатите. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2013; 3 (43): 135–139.
 10. Куц Л.В. Значение сигнально-рецепторных ноцицептивных связей при псориазе. *Украинский журнал дерматологии, венерологии, косметологии*. 2013; 3 (50): 47–51.
 11. Okamura Y., Mishima S., Kashiwakura J.I., Sasaki-Sakamoto T., Toyoshima S., Kuroda K., Saito S., Tokuhashi Y., Okayama Y. The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. *Allergol. Int.* 2017; 66: S9–20. DOI: 10.1016/j.alit.2017.03.002.
 12. Siniscalco D., Schultz S., Brigida A.L., Antonucci N. Inflammation and neuro-immune dysregulations in autism spectrum disorders. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018; 11 (2): e56. DOI: 10.3390/ph11020056.
 13. Павлуш Д.Г., Павлуш Е.Н., Матвеева Н.Ю., Калининко С.Г., Дюйзен И.В. Хронический полипозный риносинусит: этиопатогенетические механизмы его возникновения. *Медицина*. 2018; 6 (2): 69–78. DOI: 10.29234/2308-9113-2018-6-2-69-78.
 14. Godinho-Silva C., Cardoso F., Veiga-Fernandes H. Neuro-immune cell units: a new paradigm in physiology. *Annu. Rev. Immunol.* 2019; 37: 19–46. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041812.
 15. Delvalle N.M., Dharshika C., Morales-Soto W., Fried D.E., Gaudette L., Gulbransen B.D. Communication between enteric neurons, glia, and nociceptors underlies the effects of tachykinins on neuroinflammation. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2018; 6 (3): 321–344. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.05.009.
 16. Green D.P., Limjunyawong N., Gour N., Pundir P., Dong X. A mast-cell-specific receptor mediates neurogenic inflammation and pain. *Neuron*. 2019; 101 (3): 412–420. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.01.012.
 17. Mehta D., Granstein R.D. Immunoregulatory effects of neuropeptides on endothelial cells: relevance to dermatological disorders. *Dermatology*. 2019; 235 (3): 175186. DOI: 10.1159/000496538.
 18. Rudick C.N., Bryce P.J., Guichelaar L.A., Berry R.E., Klumpp D.J. Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain. *PLoS One*. 2008; 3 (5): e2096. DOI: 10.1371/journal.pone.0002096
 19. Smolinska S., Jutel M., Cramer R., Mahony L.O. Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy*. 2014; 69 (3): 273–281. DOI: 10.1111/all.12330.
 20. Kempuraj D., Thangavel R., Natteru P.A., Selvakumar G.P., Saeed D., Zahoor H., Zaheer S., Iyer S.S., Zaheer A. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *J. Neurol. Neurosurg. Spine*. 2016; 1 (1): 1003.
 21. Fischer L., Lavoranti M.I., de Oliveira Borges M., Miksza A.F., Sardi N.F., Martynhak B.J., Tambeli C.H., Parada C.A. TRPA1, substance P, histamine and 5-hydroxytryptamine interact in an interdependent way to induce nociception. *Inflamm. Res.* 2017; 66 (4): 311–322. DOI: 10.1007/s00011-016-1015-1.
 22. Peacock B.N., Scheiderer D.J., Kellermann G.H. Biomolecular aspects of depression: a retrospective analysis. *Compr. Psychiatry*. 2017; 73: 168–180. DOI: 10.1016/j.comppsy.2016.11.002.
 23. Захарчук Н.В., Невзорова В.А., Шуматов В.Б., Шестакова Н.В., Гончар Е.Ю. Субстанция P в механизмах развития церебральной дисфункции при хроническом табакокурении. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2016; 2 (64): 62–66.
 24. Стагниева И.В. Роль субстанции P в патогенезе лицевой боли при риносинусите. *Российская ринология*. 2015; 23 (1): 33–35.
 25. Maintz L., Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 85 (5): 1185–1196. DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1185
 26. Yuan H., Silberstein S.D. Histamine and migraine. *Headache*. 2018; 58 (1): 184–193. DOI: 10.1111/head.13164.
 27. Gene-disease association data retrieved from DisGeNET. V 6.0. Integrative biomedical informatics group GRIB/IMIM/UPF. URL: <http://www.disgenet.org/>
 28. Piñero J., Bravo À., Queralt-Rosinach N., Gutiérrez-Sacristán A., Deu-Pons J., Centeno E., García-García J., Sanz F., Furlong L.I. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45 (D1): D833–839. DOI: 10.1093/nar/gkw943.
 29. Higuchi S., Tanimoto A., Arima N., Xu H., Murata Y., Hamada T., Makishima K., Sasaguri Y. Effects of histamine and interleukin-4 synthesized in arterial intima on phagocytosis by monocytes/macrophages in relation to atherosclerosis. *FEBS Lett.* 2001; 505 (2): 217–222. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02823-X.
 30. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit. Dr. Bing Zhang's Lab at the Baylor College of medicine. URL: <http://www.webgestalt.org/>
 31. Wang J., Vasaikar S., Shi Z., Greer M., Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45 (W1): W130–137. DOI: 10.1093/nar/gkx356.
 32. An online catalog of human genes and genetic disorders. URL: <http://www.omim.org>
 33. White W.M., Sun Z., Borowski K.S., Brost B.C., Davies N.P., Rose C.H., Garovic V.D. Preeclampsia/eclampsia candidate genes show altered methylation in maternal leukocytes of preeclamptic women at the time of delivery. *Hypertens Pregnancy*. 2016; 35 (3): 394–404. DOI: 10.3109/10641955.2016.1162315.
 34. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П. Гены гистаминового метаболического пути и болезни: коморбидность и клиническая гетерогенность. В сб.: Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике; под ред. А.Б. Масленникова. Новосибирск: Академиздат, 2017; 26: 66–89.
 35. Луценко М.Т., Шматок М.И. Морфофункциональная характеристика слизистой желудка у больных с бронхиальной астмой. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2008; 28: 46–50.

36. Gupta P., Sil S., Ghosh R., Ghosh A., Ghosh T. Intracerebroventricular A β -induced neuroinflammation alters peripheral immune responses in rats. *J. Mol. Neurosci.* 2018; 66 (4): 572–586. DOI: 10.1007/s12031-018-1189-9.
37. Abdelfattah E.M., Karousa M.M., Schutz M.M., Lay D.C. Jr., Marchant-Forde J.N., Eicher S.D. Acute phase cytokines, TAC1, and toll-like receptor4 mRNA expression and health associated with group size in veal calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015; 164 (3–4): 118–26. DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.01.008.
38. Zhang Y., De S., Garne J.R. et al. Systematic analysis, comparison, and integration of disease based human genetic association data and mouse genetic phenotypic information. *BMC Med. Genomics.* 2010; 3: 1. DOI: 10.1186/1755-8794-3-1.
39. Welter D., MacArthur J., Morales J., Burdett T., Hall P., Junkins H., Klemm A., Flicek P., Manolio T., Hindorf L., Parkinson H. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: D1001–1006. DOI: 10.1093/nar/gkt1229.

Сведения об авторе

Кучер Аксана Николаевна, д-р биол. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, лаборатория популяционной генетики, НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-3824-3641.

(✉) **Кучер Аксана Николаевна**, e-mail: aksana.kucher@medgenetics.ru.

Поступила в редакцию 22.03.2019
Подписана в печать 25.12.2019

Нетрадиционные факторы риска и их значение в оценке сердечно-сосудистого риска у бессимптомных пациентов

Лобанова Н.Ю., Чичерина Е.Н.

*Кировский государственный медицинский университет (ГМУ)
Россия, 610998, г. Киров, ул. К. Маркса, 112*

РЕЗЮМЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) сохраняют лидирующие позиции среди ведущих причин смертности во всем мире. Доказан вклад многих факторов в увеличение риска развития ССЗ. Представлен обзор современных представлений о роли факторов риска у бессимптомных пациентов в оценке сердечно-сосудистого риска. Определение индивидуального сердечно-сосудистого риска не подвергается сомнению, однако накапливается все больше сведений о необходимости дополнения имеющихся шкал оценки сердечно-сосудистого риска новыми факторами с целью более точного его прогнозирования. Отражены сведения о значении нетрадиционных факторов риска, таких как психосоциальный фактор, уровень физической активности, семейный анамнез развития ССЗ, коронарная кальцификация, лодыжечно-плечевой индекс, выявление атеросклеротических бляшек при ультразвуковом сканировании брахиоцефальных артерий. Приведены исследования, рассматривающие влияние этих факторов риска на улучшение дискриминации сердечно-сосудистого риска при добавлении их к используемым в мире шкалам оценки риска.

Ключевые слова: сердечно-сосудистый риск, субклинический атеросклероз, коронарная кальцификация.

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

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Лобанова Н.Ю., Чичерина Е.Н. Нетрадиционные факторы риска и их значение в оценке сердечно-сосудистого риска у бессимптомных пациентов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 182–188. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-182-188>.

Alternative risk factors and their importance in assessment of cardiovascular risk in asymptomatic patients

Lobanova N.Yu., Chicherina E.N.

*Kirov State Medical University
112, Karl Marx Str., Kirov, 610998, Russian Federation*

Abstract

Cardiovascular diseases retain their leading position among the leading causes of death worldwide. The contribution of many factors to increasing risk of developing cardiovascular diseases was proven. The article provides an

✉ Лобанова Надежда Юрьевна, e-mail: nadya.uar@narod.ru.

overview of current views on the role of risk factors in assessment of cardiovascular risk in asymptomatic patients. Determination of individual cardiovascular risk is not questioned. However, more information is accumulating on the need to supplement the existing cardiovascular risk assessment scales with new factors in order to more accurately predict cardiovascular risk. The value of alternative risk factors, such as psychosocial factor, level of physical activity, family history of cardiovascular diseases, coronary artery calcification, ankle-brachial index, and identification of atherosclerotic plaques during ultrasound scanning of the brachiocephalic arteries, is described. Studies that consider the impact of these risk factors on reducing discrimination against cardiovascular risk when added to the globally used risk assessment scales are presented.

Key words: cardiovascular risk, subclinical atherosclerosis, coronary artery calcification.

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 they received no funding for the study.

For citation: Lobanova N.Yu., Chicherina E.N. Alternative risk factors and their importance in assessment of cardiovascular risk in asymptomatic patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 182–188. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-182-188>.

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз – воспалительное заболевание с поражением артериальной стенки. Развитие атеросклероза – это динамический, многофакторный процесс. В течение долгого времени атеросклероз рассматривался как заболевание, патогенез которого связан только с отложением липидов в стенке артерии. Если морфологический субстрат поражения сосудистой стенки достаточно хорошо изучен, то механизмы, запускающие это поражение, изучаются и в настоящее время. За последние два десятилетия точка зрения на атеросклероз постепенно сменилась и дополнилась представлением о роли воспаления артериальной стенки [1]. Таким образом, в теории патогенеза атеросклероза лидирующая роль принадлежит липидно-инфильтрационной гипотезе и гипотезе «ответ на повреждение». Дополнив друг друга, эти концепции и привели к пониманию того, что атеросклероз представляет собой сложный воспалительный процесс, в который вовлекаются, в частности, повреждения эндотелия, отложение окисленного липопротеина низкой плотности в интиме, пролиферация гладкомышечных клеток, инфильтрация и активация макрофагов [2, 3].

По мере прогрессирования атеросклероз приводит к таким социально значимым заболеваниям, как ишемическая болезнь сердца (ИБС) и cerebro-vasкулярные заболевания (в основном ишемический инсульт). ИБС и инсульт – первая и третья в мире причины смертности соответственно. На долю этих заболеваний приходится 247,9 смертей на 100 тыс. человек, что составляет 84,5% смертности от ССЗ и 28,2% смертности от всех причин [4]. Другие, менее распространенные осложнения атеросклероза вклю-

чают поражение аорты и периферических сосудов. На сегодняшний день ССЗ сохраняют за собой лидирующие позиции среди ведущих причин смертности во всем мире. В Российской Федерации, по статистическим данным 2016 г., уровень смертности населения на 100 тыс. человек от всех причин составил 1 284,3 случая, из них смертность от болезней системы кровообращения составляет 616,4, а смертность от ИБС – 328,5 случаев [5].

Более 70 лет назад в медицинскую практику ввели понятие факторов сердечно-сосудистого риска. В последние несколько десятилетий по всему миру отмечается рост ССЗ. Этот эпидемиологический сдвиг частично связан с изменениями образа жизни и рациона питания, однако данные факторы являются основными модифицируемыми причинами ССЗ [2]. Согласно гипотезе «ответ на повреждение», факторов, вызывающих повреждение эндотелия, достаточно много, но самыми распространенными из них являются курение, дислипидемия, гипертоническая болезнь, сахарный диабет, абдоминальное ожирение и др. Риск развития атеросклеротических заболеваний повышается с увеличением возраста. Учитывая профилактическую направленность медицинской помощи, оценка индивидуального сердечно-сосудистого риска может быть актуальна для пациентов с бессимптомным атеросклеротическим поражением сосудов, особенно в выявлении высокого сердечно-сосудистого риска у таких пациентов.

В общей клинической практике оценка индивидуального сердечно-сосудистого риска проводится в том числе и при скрининге больших групп населения (например, при диспансеризации определенных

групп населения). Инструмент такой оценки должен быть простым, надежным, удобным в исследовании и специфичным для страны, в которой он разработан и используется. Для быстрого и точного подсчета индивидуального сердечно-сосудистого риска предложено множество алгоритмов. В Российской Федерации, наряду с европейскими странами, с 2003 г. используется шкала SCORE [6, 7]. К другим наиболее известным рискометрам относят Фрамингемскую шкалу оценки риска (Framingham risk score, FRS) (США), Reynolds (США), Q-RISC (Великобритания), PROCAM (Германия), ASSIGN (Швеция), CUORE (Италия) и др. [6, 7].

Шкала SCORE была разработана на основании когортных исследований в 12 европейских странах, включая Россию. Участвовало более 200 тыс. пациентов. Существуют два варианта шкалы SCORE: для стран с высоким (в том числе Российская Федерация) и низким риском. Включены факторы риска: пол, возраст, курение, уровень систолического артериального давления и общий холестерин. С ее помощью проводилась оценка 10-летнего риска развития первого смертельного, связанного с атеросклерозом события – инсульта, инфаркта миокарда, аневризмы аорты. Позволяя оценить развитие летальных событий в будущем, этот рискометр не дает возможности оценить риск развития несмертельных заболеваний, связанных с атеросклерозом. Однако такая возможность существует. Для проведения оценки комбинированного риска (фатального и нефатального) нужно умножить величины риска конкретного пациента мужского пола на три и женского – на четыре [6, 7].

В исследовании Framingham Heart Study впервые были получены данные о связи ССЗ с различными факторами риска, например артериальной гипертензией, гиперхолестеринемией [6, 7]. Именно на его основе была разработана Фрамингемская шкала. Данная шкала учитывает такие факторы риска, как возраст, пол, артериальное давление, курение, применение антигипертензивных препаратов, общий холестерин, холестерин липопротеинов высокой плотности. Рискометр прогнозирует возникновение событий, относящихся к ИБС, в течение 10 лет у пациентов без симптомов этого заболевания. Конечные точки – ИБС (стенокардия, инфаркт миокарда, внезапная смерть).

Выявление высокого индивидуального сердечно-сосудистого риска, без сомнений, подводит пациента и лечащего врача к необходимости коррекции модифицируемых факторов риска. Однако данный факт важен не только для лиц высокого риска, но и для лиц низкого и среднего риска. В 1985 г. Д. Роуз

сформулировал парадокс профилактики: у большего числа человек с низким риском может быть больше случаев заболевания, чем у небольшого количества пациентов высокого риска [7, 8]. Иными словами, максимальную индивидуальную пользу от проведения мероприятий по контролю факторов риска имеют пациенты высокого риска. Среди лиц низкого риска индивидуальная польза от проведения мероприятий по коррекции риска не так значима, но они принесут большую пользу обществу в целом в связи с большой численностью группы низкого риска. Исходя из парадокса Роуза, выявление сердечно-сосудистых заболеваний на бессимптомной стадии у пациентов любого риска может иметь огромное экономическое значение.

Учитывая преимущества в использовании описанных выше рискометров, накапливается все больше и больше информации об имеющихся у них недостатках и ограничениях. Поэтому ведется активный процесс поиска других факторов риска, добавление которых будет способствовать более точному определению сердечно-сосудистого риска.

Несмотря на то, что артериальная гипертензия является самостоятельным заболеванием, она относится к одному из главных, хорошо изученных факторов риска ССЗ. В рекомендациях Европейского общества кардиологов/Европейского общества по артериальной гипертензии по лечению артериальной гипертензии 2018 г. отмечена особая значимость влияния артериальной гипертензии на поражение органов-мишеней, приводящая к увеличению сердечно-сосудистого риска, даже если поражение является бессимптомным [9]. Также в 2018 г. выделены новые факторы, повышающие риск сердечно-сосудистых осложнений: гиперурикемия, частота сердечных сокращений в покое, сахарный диабет, семейный анамнез раннего возникновения артериальной гипертензии, ранняя менопауза, сидячий образ жизни, психосоциальный и социально-экономический факторы. Эти факторы рекомендовано учитывать при стратификации риска у пациентов с артериальной гипертензией [9].

К факторам сердечно-сосудистого риска, требующим дальнейшего изучения, можно отнести психосоциальный фактор (тревога, депрессия), оценку уровня физической активности, наличие семейного анамнеза развития сердечно-сосудистых заболеваний (у женщин до 65 лет, у мужчин до 55 лет), определение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), выявление атеросклеротических бляшек при ультразвуковом исследовании сонных артерий, определение уровня коронарного кальция – кальциевый индекс (КИ) [6].

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА РАЗВИТИЕ КОРОНАРНЫХ СОБЫТИЙ

В 2017 г. группа европейских ученых оценила связь стресса на рабочем месте с последующим развитием коронарных событий (первый нефатальный или фатальный инфаркт миокарда) [10]. Исследование базируется на том, что стресс возникает в результате воздействия работ, для которых характерны высокие психологические нагрузки. Была выбрана модель, оценивающая дисбаланс между усилием и вознаграждением.

Исходя из данной теории, стресс создается повторяющимся опытом неудовлетворяющей зависимости между усилиями, затрачиваемыми на работе, например темпом работы, рабочей нагрузкой, временем, проведенным на работе, и полученным вознаграждением. Помимо заработной платы, вознаграждение включает нематериальные аспекты, такие как уважение, признание, перспективы продвижения по службе и обеспечение занятости.

С помощью анкетных данных была проведена оценка дисбаланса между усилиями и вознаграждением на работе. Когорта составила 90 164 человека (мужчины и женщины) без ишемической болезни сердца на момент начала исследования. В течение среднего периода наблюдения 9,8 года было зарегистрировано 1 078 коронарных событий. Таким образом, было установлено, что у индивидуума, имеющего дисбаланс между усилием и вознаграждением, в 1,16 раза повышается риск возникновения ИБС (относительный риск (ОР) составил 1,16; 95%-й доверительный интервал (ДИ) 1,01–1,34). Была продемонстрирована связь между неблагоприятной психосоциальной рабочей средой и ишемической болезнью сердца.

ВЛИЯНИЕ СУБКЛИНИЧЕСКОГО АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ СОННЫХ АРТЕРИЙ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЙ РИСК

Значения выявления атеросклеротических бляшек в сонных артериях как предикторов развития сердечно-сосудистых заболеваний изучили J.F. Polak с соавт. в 2013 г. [11]. Оценивалось изменение предсказательной ценности Фрамингемской шкалы с добавлением к имеющимся критериям факта выявления атеросклеротических бляшек при ультразвуковом сканировании сонных артерий. Когорта исследования состояла из 6 562 лиц (средний возраст 61,1 года; 52,6% женщин). У 41,9% ($n = 2\,748$) лиц, включенных в исследование, были выявлены бляшки, суживающие просвет менее чем на 25%, у 13,2%

($n = 863$) – суживающие просвет на 25% и более. Сердечно-сосудистые заболевания развились у 7,9% обследованных ($n = 515$). Обнаружение любых атеросклеротических бляшек было достоверно связано с частотой развития ССЗ, причем наиболее сильная связь наблюдалась для бляшек, суживающих просвет на 25% и более (ОР 1,65; 95%-й ДИ 1,34–2,03). Поэтому добавление выявления атеросклеротических бляшек сонных артерий к традиционным факторам риска ССЗ более точно предсказывает возможность их развития, а также улучшает прогнозирование сердечно-сосудистого риска.

ЗНАЧЕНИЕ КОРОНАРНОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ

Некоторые исследователи считают, что выявление коронарной кальцификации фактически патогномично атеросклерозу коронарных артерий [3]. При этом в атеросклеротически пораженной интимае накапливается фосфат кальция в гидроксиапатитной форме. Кальцификация атеросклеротической бляшки начинается в липидном ядре атеромы и происходит посредством активного процесса, напоминающего формирование кости под контролем сложных ферментативных и клеточных путей. Вызывающие ее механизмы до конца не понятны, но апоптоз гладкомышечных клеток, по-видимому, является важным этапом, который затем служит очагом кальцификации. Основываясь на гистоморфометрических исследованиях, примерно 20% атеросклеротических бляшек коронарных сосудов кальцинированы, и эти макрокальцификации могут быть идентифицированы с помощью неконтрастной расширенной компьютерной томографии [2, 3].

Впервые в 2008 г. ученые сообщили о взаимосвязи между уровнем КИ и последующими коронарными событиями (инфаркт миокарда или смерть от ишемической болезни сердца). Был сделан вывод, что добавление КИ к стандартным факторам риска улучшает прогнозирование последующих коронарных событий [12].

АССОЦИАЦИИ КИ С НОВЫМИ МАРКЕРАМИ АТЕРОСКЛЕРОЗА

В своем исследовании J.A. Delaney с соавт. оценил взаимосвязь между уровнем физической активности, КИ и ЛПИ [13]. В работу были включены лица с ЛПИ от 0,90 до 1,40 ($n = 5\,656$), 53% из них – женщины, средний возраст 61 год, а средний индекс массы тела 28 кг/м². В начале исследования примерно у 33% была дислипидемия, 11% – диабет, 42% – гипертоническая болезнь, но они не имели клинически выраженной ИБС. Чуть более 62% участников

сообщили о том, что они занимаются интенсивными физическими нагрузками, а 35% – умеренными физическими нагрузками. Было установлено, что более интенсивные физические упражнения снизили риск возникновения атеросклероза периферических артерий (ОР 0,85; 95%-й ДИ 0,74–0,98), а также выявлена значительная связь между интенсивностью физической активности и частотой выявления коронарной кальцификации (ОШ 0,97; 95%-й ДИ 0,94–1,00). В целом достоверная связь между интенсивностью физической активности и увеличением КИ не была установлена, однако малоподвижный образ жизни был в значительной степени связан с увеличением КИ ($\Delta \log$ (единицы Agatston +25) = 0,027; 95%-й ДИ 0,002–0,052). Поэтому малоподвижный образ жизни ассоциируется с прогрессированием поражения периферических и коронарных артерий.

Данное исследование показало высокую эффективность умеренных и интенсивных физических нагрузок в профилактике прогрессирования атеросклероза периферических артерий. В отношении коронарной кальцификации подобный факт не установлен, однако определено, что любая физическая активность снижает ее прогрессирование, и наоборот, малоподвижный образ жизни ведет к ее прогрессированию. Таким образом, любой тип активности лучше, чем малоподвижный образ жизни.

СЕМЕЙНЫЙ АНАМНЕЗ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПРОГРЕССИРОВАНИЕ КОРОНАРНОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ

В настоящее время установлено, что нулевая оценка КИ связана с очень низким 10-летним риском сердечных событий, однако этот риск не равен нулю. В исследовании 2014 г. проведена оценка семейного анамнеза ИБС [14]. Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить роль семейного анамнеза в развитии ССЗ у людей с КИ, равным нулю. Установлена более высокая частота развития субклинического атеросклероза у лиц с семейным анамнезом ИБС, в отличие от индивидуумов без него. В работу включено 3 185 лиц с базовой оценкой КИ = 0 (средний возраст 58 лет, 37% мужчин). Средняя оценка риска по Фрамингемской шкале составила 6,1% для лиц с семейным анамнезом ИБС и 6,2% для лиц без него ($p = 0,84$). В среднем за 10 лет у 101 (3,2%) участника были ССЗ, а у 56 (1,8%) – случаи ИБС. При анализе возраста и пола семейный анамнез ИБС ассоциировался с увеличением случаев ССЗ приблизительно в 1,73 раза (ОР 1,73; 95%-й ДИ 1,17–2,56) и ИБС (ОР 1,72; 95%-й ДИ 1,01–2,91). Исследователи пришли к выводу, что бессимптомные индивидуумы с

оценкой КИ, равным нулю, и положительным семейным анамнезом ИБС подвержены повышенному риску сердечно-сосудистых и ИБС-событий по сравнению с теми, у кого нет семейной истории ИБС, хотя абсолютные показатели заболеваемости остаются низкими.

Подобное исследование было проведено годом ранее [15]. Продемонстрировано, что семейный анамнез раннего развития ИБС обычно ассоциируется с прогрессированием коронарной кальцификации среди бессимптомных лиц. В общей когорте 47% составляли мужчины. В целом 52% ($n = 2\ 633$) участников имели положительный семейный анамнез ИБС; 20% ($n = 1\ 002$) человек имели семейный анамнез раннего развития ИБС, из которых 456 сообщили о подобном анамнезе только у родителей, 471 – только у братьев и сестер, а 75 – у родителей и братьев и сестер. Средняя оценка риска по Фрамингемской шкале составила 7,5% ($n = 2\ 466$) для лиц без семейного анамнеза ИБС, 8,2% ($n = 1\ 631$) – для лиц с семейным анамнезом позднего развития ИБС, 7% ($n = 1\ 002$) – для лиц с семейным анамнезом раннего развития ИБС. В основной группе 2 645 человек (52%) не имели коронарной кальцификации в начале исследования. Среди них у 527 (20%) пациентов КИ стал выше нуля при последующем обследовании. Наблюдалось значительное увеличение КИ у пациентов с семейным анамнезом раннего развития ИБС (7,24 на 100 человеко-лет) по сравнению с пациентами без семейного анамнеза ИБС (5,87 на 100 человеко-лет) или с поздним семейным анамнезом (6,56 на 100 человеко-лет) ($p < 0,05$). У лиц с семейным анамнезом раннего развития ИБС увеличение КИ было на 16,7 единиц выше, чем у лиц без него ($p < 0,001$). Это было более чем в два раза больше, чем в группе с семейным анамнезом позднего развития ИБС (8,17 единиц). Полученные результаты дополнительно подтверждают мнение о том, что семейный анамнез является важной составляющей сердечно-сосудистого риска, и предполагают, что увеличению риска может способствовать ускорение коронарной кальцификации при субклиническом атеросклерозе.

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ФАКТОРОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО РИСКА НА ДИСКРИМИНАЦИЮ РИСКА ПО ФРАМИНГЕМСКОЙ ШКАЛЕ

В 2016 г. J. Yeboah и соавт. опубликовали результаты исследования, в котором изучено добавление новых факторов сердечно-сосудистого риска к традиционным [16]. Проведена оценка роли таких факторов, как коронарная кальцификация, уровень С-реактивного белка, ЛПИ и наличие семейного

анамнеза ИБС с определением их значения в стратификации сердечно-сосудистого риска. Следует отметить, что указанные факторы оценивались не в совокупности, а по отдельности. Конечными точками являлись инфаркт миокарда, смерть от ишемической болезни сердца или инсульт. В этот анализ были включены 5 185 лиц, средний возраст 61 год, 53,1% женщин. Средний период наблюдения составил 10 лет, за это время произошло 320 (6,2%) случаев сердечно-сосудистых заболеваний, из них 139 (43,4%) случаев инфаркта миокарда, 132 (41,3%) инсульта, а 49 (15,3%) случаев – смерть от ишемической болезни сердца. В отношении прогнозирования развития ИБС КИ был единственным маркером, который значительно улучшил дискриминацию риска по Фрамингемской шкале (остаточный индекс реклассификации (Net Reclassification Indices, NRI) составил 0,178; 95%-й ДИ 0,080–0,256). Добавление ЛПИ к Фрамингемской модели улучшило стратификацию пациентов менее значимо (NRI 0,013; 95%-й ДИ от –0,034 до 0,051). Всего произошло 194 (3,7%) случая ИБС.

Таким образом, среди четырех маркеров риска, включенных в анализ, КИ обеспечил наибольшее улучшение дискриминации риска ИБС и реклассификации пациентов с промежуточным риском по Фрамингемской шкале. Кроме того, авторы указывают, что на основании полученных результатов КИ по сравнению с тремя другими нетрадиционными маркерами риска больше подходит не только для улучшения прогнозирования риска ИБС, но может быть полезен для людей, у которых принятие решения по лечению на основе риска, установленного по Фрамингемской шкале, не определено. Поэтому необходимы исследования по улучшению дискриминации, обеспечиваемой этими дополнительными маркерами риска в подгруппах бессимптомных лиц (первичная профилактика), особенно тех, кому не рекомендована терапия статинами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что понятие факторов сердечно-сосудистого риска введено в клиническую практику более 70 лет назад, актуальность его сохраняется и по сей день. Большинство значимых факторов сердечно-сосудистого риска, наряду с огромным прогностическим значением, имеют модифицируемый характер. Проведено много исследований с целью определения эффективности существующих шкал оценки сердечно-сосудистого риска и установлено, что, несмотря на свою эффективность, они требуют дополнения и уточнения. Анализируя результаты представленных выше исследований, можно

определенно утверждать, что на сегодняшний день проблема правильной оценки сердечно-сосудистого риска сохраняет актуальность для всех групп пациентов любого сердечно-сосудистого риска. Все чаще подтверждается повышение сердечно-сосудистого риска у бессимптомных пациентов в ассоциации с психосоциальным фактором или выявлением атеросклеротических бляшек при ультразвуковом исследовании брахиоцефальных артерий.

Роль КИ еще предстоит изучить, однако представленные исследования установили взаимное потенцирование таких факторов риска, как семейный анамнез ИБС, малоподвижный образ жизни, оценка ЛПИ и КИ. Изучение новых факторов сердечно-сосудистого риска в бессимптомной популяции показывает свою дискриминационную и прогностическую ценность, но требует дальнейшего детального изучения с целью разработки максимально удобных, точных и эффективных рискометров, применимых к любой категории пациентов, в том числе бессимптомных. Разработка данных шкал риска, согласно парадоксу Роуза, может иметь огромное социально-экономическое значение.

ЛИТЕРАТУРА

- Li B., Li W., Li X., Zhou H. Inflammation: a novel therapeutic target/direction in atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 2017; 23 (8): 1216–1227. DOI: 10.2174/1381612822666161230142931.
- Barquera S., Pedroza-Tobias A., Medina C., Hernandez-Barquera L., Bibbins-Domingo K., Lozano R., Moran A.E. Global overview of the epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arch. Med. Res.* 2015; 46 (5): 328–338. DOI: 10.1016/j.arcmed.2015.06.006.
- Kalra D.K., Heo R., Valenti V., Nakazato R., Min J.K. Role of computed tomography for diagnosis and risk stratification of patients with suspected or known coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34 (6): 1144–1154. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302074.
- GBD 2013 mortality and causes of death collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015; 385 (9963): 117–171. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2.
- Здравоохранение в России. 2017: статистический сборник. М., 2017: 170.
- Кардиоваскулярная профилактика 2017. Российские национальные рекомендации. *Российский кардиологический журнал.* 2018; 6: 7–122. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-6-7-122.
- Piepoli M.F., Hoes A.W., Agewall S., Albus C., Brotons C., Catapano A.L., Cooney M.T., Corrà U., Cosyns B., Deaton C., Graham I., Hall M.S., Hobbs F.D.R., Løchen M.L., Löllgen H., Marques-Vidal P., Perk J., Prescott E., Redon J., Richter D.J., Sattar N., Smulders Y., Tiberi M., van der Worp H.B., van Dis I., Verschuren W.M.M., Binno S. ESC scientific document group. 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention

- in clinical practice: the sixth joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) developed with the special contribution of the European association for cardiovascular prevention & rehabilitation (EACPR). *Eur. Heart J.* 2016; 37 (29): 2315–2381. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw106.
8. Rose G. Sick individuals and sick populations. 1985. *Bull. World Health Organ.* 2001; 79 (10): 990–996.
 9. Кобалава Ж.Д., Конради А.О., Недогода С.В., Арутюнов Г.П., Баранова Е.И., Барбараш О.Л., Виллевалде С.В., Галявич А.С., Глезер М.Г., Драпкина О.М., Котовская Ю.В., Либис Р.А., Лопатин Ю.М., Недошивин А.О., Остроумова О.Д., Ратова Л.Г., Ткачева О.Н., Чазова И.Е., Чесникова А.И., Чумакова Г.А. Меморандум экспертов Российского кардиологического общества по рекомендациям Европейского общества кардиологов/Европейского общества по артериальной гипертензии по лечению артериальной гипертензии 2018 г. *Российский кардиологический журнал.* 2018; 23 (12): 131–142. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-12-131-142.
 10. Draganò N., Siegrist J., Nyberg S.T., Lunau T., Fransson E.I., Alfredsson L., Björner J.B., Borritz M., Burr H., Erbel R., Fahlén G., Goldberg M., Hamer M., Heikkilä K., Jöckel K.H., Knutsson A., Madsen I., Nielsen M.L., Nordin M., Oksanen T., Pejtersen J.H., Pentti J., Rugulies R., Salo P., Schupp J., Singh-Manoux A., Steptoe A., Theorell T., Vahtera J., Westerholm P., Westerlund H., Virtanen M., Zins M., Batty G.D., Kivimäki M. IPD-work consortium (2017). Effort-reward imbalance at work and incident coronary heart disease: a Multicohort Study of 90,164 individuals. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*. 2017; 28 (4): 619–626. DOI: 10.1097/EDE.0000000000000666.
 11. Polak J.F., Szklo M., Kronmal R.A., Burke G.L., Shea S, Zavodni A.E., O’Leary D.H. The value of carotid artery plaque and intima-media thickness for incident cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* 2013 April; 2 (2): e000087. DOI: 10.1161/JAHA.113.000087.
 12. Blaha M.J., Yeboah J., Al Rifai M., Liu K., Kronmal R., Greenland P. Providing evidence for subclinical CVD in risk assessment. *Glob. Heart.* 2016 Sept.; 11 (3): 275–285. DOI: 10.1016/j.ghheart.2016.08.003.
 13. Delaney J.A., Jensky N.E., Criqui M., Whitt-Glover M.C., Lima J.A., Allison M.A. The association between physical activity and both incident coronary artery calcification and ankle brachial index progression: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2013; 230 (2): 278–282. DOI: 10.1016/j.jmcm.2015.06.030.
 14. Cohen R., Budoff M., McClelland R.L., Sillau S., Burke G., Blaha M., Szklo M., Uretsky S., Rozanski A., Shea S. Significance of a positive family history for coronary heart disease in patients with a zero coronary artery calcium score (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Am. J. Cardiol.* 2014; 114 (8): 1210–1214. DOI: 10.1016/j.amjcard.2014.07.043.
 15. Pandey A.K., Blaha M.J., Sharma K., Rivera J., Budoff M.J., Blankstein R., Al-Mallah M., Wong N.D., Shaw L., Carr J., O’Leary D., Lima J.A., Szklo M., Blumenthal R.S., Nasir K. Family history of coronary heart disease and the incidence and progression of coronary artery calcification: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 2014; 232 (2): 369–376. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.042.
 16. Yeboah J., Young R., McClelland R.L., Delaney J.C., Polonsky T.S., Dawood F.Z., Blaha M.J., Miedema M.D., Sibley C.T., Carr J.J., Burke G.L., Goff D.C. Jr, Psaty B.M., Greenland P., Herrington D.M. Utility of nontraditional risk markers in atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016; 67 (2): 139–147. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.10.058.

Сведения об авторах

Чичерина Елена Николаевна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой внутренних болезней, Кировский ГМУ, г. Киров.
Лобанова Надежда Юрьевна, аспирант, кафедра внутренних болезней, Кировский ГМУ, г. Киров. ORCID 0000-0001-8960-1272.

(✉) **Лобанова Надежда Юрьевна**, e-mail: nadya.uar@narod.ru.

Поступила в редакцию 05.03.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Нейровизуализационные методики оценки головного мозга при сахарном диабете (литературный обзор)

Матвеева М.В., Самойлова Ю.Г., Жукова Н.Г., Толмачев И.В., Бразовский К.С., Лейман О.П., Фимушкина Н.Ю., Тонких О.С.

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

РЕЗЮМЕ

Сахарный диабет (СД) связан с изменениями в структуре головного мозга и ухудшением когнитивных функций от легкой до умеренной степени по данным нейропсихологического тестирования. В условиях растущей эпидемии СД и увеличения числа людей, доживающих до старости, когнитивная дисфункция, ассоциированная с СД, может иметь серьезные последствия для будущего общественного и практического здравоохранения. Хроническая гипергликемия, тяжелые эпизоды гипогликемии и микрососудистые осложнения являются важными факторами риска, общими для СД 1-го и 2-го типа. Также СД связан со структурными и функциональными изменениями в головном мозге, которые возможно диагностировать посредством различных вариантов магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга. В представленном обзоре рассмотрены исследования, проведенные за последние два десятилетия, чтобы улучшить понимание того, как СД влияет на функцию и структуру головного мозга. Также описаны изменения, характерные для СД 1-го и 2-го типа при проведении стандартной, функциональной МРТ и протонной магнитно-резонансной спектроскопии, и их особенности.

Ключевые слова: сахарный диабет, когнитивные нарушения, нейровизуализационные методики.

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: Матвеева М.В., Самойлова Ю.Г., Жукова Н.Г., Толмачев И.В., Бразовский К.С., Лейман О.П., Фимушкина Н.Ю., Тонких О.С. Нейровизуализационные методики оценки головного мозга при сахарном диабете (литературный обзор). *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 189–194. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-189-194>.

Neuroimaging methods for assessing the brain in diabetes mellitus (literature review)

Matveeva M.V., Samoilova Yu.G., Zhukova N.G., Tolmachov I.V., Brazovskiy K.S., Leiman O.P., Fimushkina N.Yu., Rotkank M.A.

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

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is associated with changes in the structure of the brain and deterioration of cognitive functions from mild to moderate according to neuropsychological testing. With the growing DM epidemic and the increasing number of people living to old age, cognitive dysfunctions associated with DM can have serious consequences for the future of public and practical health. Chronic hyperglycemia, severe episodes of hypoglycemia, and microvascular complications are important risk factors common for type 1 and type 2 diabetes. DM is also associated with structural and functional changes in the brain, which can be diagnosed by various types of magnetic resonance imaging (MRI) of the brain. In this review, we investigate studies conducted over the past two decades to improve the understanding of how DM effects the brain function and structure. We also describe the changes characteristic of type 1 and type 2 diabetes during standard MRI, functional MRI and proton magnetic-resonance spectroscopy (proton MRS) as well as their features.

Key words: diabetes mellitus, cognitive impairment, neuroimaging techniques.

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 they received no funding for the study.

For citation: Matveeva M.V., Samoilo Yu.G., Zhukova N.G., Tolmachov I.V., Brazovskiy K.S., Leiman O.P., Fimushkina N.Yu., Rotkank M.A. Neuroimaging methods for assessing the brain in diabetes mellitus (literature review). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 189–194. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-189-194>.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) является хроническим метаболическим заболеванием и характеризуется абсолютным дефицитом инсулина при СД 1-го типа или относительной его недостаточностью или резистентностью при СД 2-го типа [1]. СД является серьезной проблемой, так как поражает множество органов и систем, а это приводит к развитию осложнений в периферической и центральной нервной системе [2]. При СД отмечается снижение когнитивных способностей на 20–70% больше, чем у здоровых людей, а риск развития деменции на 5% выше [3]. Клетки и их внеклеточный матрикс имеют динамическую и реципрокную взаимосвязь, модуляция компонентов матрикса при активации процесса гликирования приводит к измененному нейрогенезу, гиперфосфорилированию ключевых внутриклеточных сигнальных молекул и экспрессии белков внеклеточного матрикса, и все эти клеточные изменения могут вносить вклад в когнитивную дисфункцию и метаболизм при СД [4]. Существуют различные методы оценки когнитивной дисфункции, а именно нейрокогнитивное тестирование, вызванные потенциалы, электроэнцефалографическое исследование, магнитно-резонансная томография (МРТ), позитронно-эмиссионная томография [5].

Для более точной диагностики когнитивных нарушений при СД в широкой практике использовался метод стандартной МРТ головного мозга, которая позволяет выявлять в основном макроструктурные изменения, связанные с цереброваскулярными забо-

леваниями, такими как гиперинтенсивность белого вещества, а также косвенные признаки атрофии вещества головного мозга [6]. Использование функциональной МРТ сосредоточено на изменениях в моделях активации, функциональной связности и колебаниях сигнала, а также взаимосвязью когнитивных нарушений и доменов активации, сетей покоя и функциональной конъюнктивности [7]. Протонная магнитно-резонансная спектроскопия (пМРС) – это аналитический метод, который позволяет идентифицировать и количественно определять метаболиты в различных областях головного мозга. Это в свою очередь дает возможность определять энергетический обмен и процессы в тканях головного мозга неинвазивно [8].

ОСОБЕННОСТИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СД 1-ГО ТИПА

У пациентов с СД 1-го типа отмечается частая вариабельность гликемии, гипер- и гипогликемия, а кумулятивное хроническое гипергликемическое воздействие приводит к микрососудистому повреждению органов, таких как ретинопатия и нефропатия [9]. В дополнение к микрососудистым осложнениям, СД 1-го типа ассоциирован с повышенным риском когнитивных нарушений, которые в первую очередь представляют собой снижение скорости обработки информации, внимания и исполнительной функции [10–12]. Когнитивная дисфункция может наблюдаться достаточно рано (уже через 2 года после постановки диагноза) и сохраняется в зрелом и в позднем

возрасте [13, 14]. Тем не менее точный neuropathological механизм когнитивных нарушений, вызванных СД 1-го типа, до сих пор в значительной степени неясен.

НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИОННЫЕ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СД 1-ГО ТИПА

Методы нейровизуализации были применены для изучения анатомических и функциональных изменений в мозге пациентов с СД 1-го типа. При проведении стандартной МРТ обнаруживаются атрофия серого и поражения белого вещества, которые являются общими структурными отклонениями, наблюдаемыми в исследованиях и связанными с когнитивным снижением у пациентов с СД 1-го типа [15–17]. В основном определяется уменьшение объемов головного мозга в корковых и подкорковых областях, включая затылочную, нижнюю лобную и парагиппокампальную области [18, 19].

В работе D.C. Perantie и соавт. при анализе МРТ у детей с СД 1-го типа не было выявлено значимых различий в объеме серого или белого вещества мозга по сравнению с группой контроля [20]. При анализе влияния гликемии на структурные изменения в головном мозге было показано, что тяжелая гипогликемия в анамнезе ассоциирована с меньшим объемом серого вещества в левой верхней височной области, тогда как хроническая гипергликемия связана с изменением объема серого вещества в правой задней теменной области и правой префронтальной области [21]. Кроме того, имеются данные о том, что эти изменения отмечаются уже через несколько лет от начала манифестации и ассоциированы с когнитивными функциями [22].

При проведении диффузно-тензорной МРТ выявляются фракционная анизотропия в верхней теменной доле и снижение средней диффузии в таламусе [19]. Кроме того, отмечается снижение фракционной анизотропии в задних отделах мозга, которое ассоциировано с большей продолжительностью заболевания, а также со снижением ряда когнитивных функций, таких как скорость обработки информации и исполнительное функционирование [23]. Используя функциональное МРТ в покое, E. van Duinkerken и соавт. продемонстрировали нарушение функциональной конъюнктивности и изменения в сетях у пациентов с СД 1-го типа [24]. Кроме того, обнаружена аномальная функциональная конъюнктивность в субгенуальной поясной извилине, которая была связана с когнитивной дисфункцией у пациентов с СД 1-го типа [25]. С помощью анализа независимых компонентов было обнаружено, что СД 1-го типа связан

с нарушением в нескольких сетях, включающих внимание, рабочую память, слух, язык и обработку [26–28]. Поскольку влияние гипергликемии на мозг может быть глобальным, анализ нейронной функции всего мозга, вероятно, выявит другие дефициты работы центральной нервной системы, связанные с СД 1-го типа.

В работе S. Mangia и O. Heikkilä и соавт. было показано снижение метаболитов N-ацетиласпартата в сером веществе (затылочная доля, лобная доля), белом веществе и таламических областях пациентов с СД 1-го типа по сравнению с группой контроля [29, 30]. Кроме того, отмечено, что у пациентов с высоким гликированным гемоглобином уровень глюкозы в мозге снижения почти на 10%. Этот нейрохимический процесс может объяснять потерю нейронов и сопутствующие нарушения когнитивных функций [31]. Кроме того, отмечается изменение соотношения метаболитов N-ацетиласпартат/креатин, холин/креатин и N-ацетиласпартат/креатин в левой задней теменной области белого вещества при СД 1-го типа [32].

ОСОБЕННОСТИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СД 2-ГО ТИПА

Несколько исследований показали, что именно СД 2-го типа (не менее 90%) является фактором риска деменции [33, 34]. Как правило, у пациентов с СД 2-го типа наблюдается умеренное снижение когнитивных функций, и, как сообщается, метаболический синдром вносит в этот процесс существенный вклад [35]. СД 2-го типа, как правило, диагностируется в более старшем возрасте и обычно связан с ожирением, резистентностью к инсулину, гипертонией и дислипидемией, которые могут оказывать негативное влияние на головной мозг [36].

НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИОННЫЕ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СД 2-ГО ТИПА

Сахарный диабет 2-го типа ассоциируется с диффузной атрофией головного мозга [37]. Уменьшение среднего общего объема мозга происходит значительно выше при СД 2-го типа, что сопоставимо с 3–5 годами нормального старения [38]. Атрофия головного мозга, связанная с СД 2-го типа, наиболее выражена в областях, окружающих желудочки, таких как подкорковая область серого или белого вещества [39].

У пациентов с СД 2-го типа наблюдается снижение функциональной связи между областями, включающими медиальную лобную извилину, прекунеус и медиальную височную извилину, которые связаны

с когнитивными функциями [40]. При проведении пМРС у пациентов с СД 2-го типа регистрировался низкий уровень N-ацетиласпарата в правой лобной и теменно-височной областях, а уровни глюкозы были повышены во всех областях головного мозга [41]. Также были обнаружены сниженные уровни холина и креатина в лентиккулярных ядрах и областях таламуса, отношения N-ацетиласпарата/креатин и холин/креатин. Данные изменения имели отрицательную корреляцию с уровнем гликемии и гликированного гемоглобина [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При оценке стандартной МРТ определяются признаки атрофии головного мозга, которые в большей степени ассоциированы с нарушением углеводного обмена, но не могут однозначно показывать связь с когнитивными нарушениями и не определяют дальнейший диагностический алгоритм [43].

При СД отмечается изменение спонтанной активности мозга, особенно в зрительных областях, а также изменение функциональной связи в различных сетях покоя. Однако пластичность нервной системы в молодом возрасте возможна, и функциональная взаимосвязь улучшается при проведении реабилитационных мероприятий [44].

При проведении пМРС изменение уровня метаболита N-ацетиласпарата связано с плотностью, функцией или жизнеспособностью нейронов [45]. Концентрация холина изменяется при повреждении клеточной мембраны [46]. Креатин участвует в энергетическом обмене, а его повышенный уровень означает усиление окислительного стресса, дисфункцию митохондрий как в нейронах, так и в глиальных клетках [47].

Все вышеперечисленные структурные и метаболические изменения приведут к нарушению нейротрансмиссии, ускорению нейродегенерации и демиелинизации, а также вызовут атрофию головного мозга при СД. Тем не менее изучение основного механизма этих метаболических и структурных молекул находится на начальной стадии. Дальнейшие более масштабные клинические исследования должны подтвердить вышеизложенные результаты.

ЛИТЕРАТУРА

- Xia W., Chen Y., Luo Y., Zhang D., Chen H., Ma J., Yin X. Decreased spontaneous brain activity and functional connectivity in type 1 diabetic patients without microvascular complications. *Cell Physiol. Biochem.* 2018; 51 (6): 2694–2703. DOI: 10.1159/000495960.
- McCall A.L. The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes.* 1992; 41 (5): 557–570. DOI: 10.2337/diab.41.5.557.
- Strachan M.W., Price J.F., Frier B.M. Diabetes, cognitive impairment, and dementia. *BMJ.* 2008; 336 (7634): 6. DOI: 10.1136/bmj.39386.664016.BE.
- Gohel M.G. Evaluation of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus with and without microvascular complications *International. Journal of Pharma and Bio Sciences.* 2013; 4 (4): 794–802.
- Kodl C.T., Seaquist E.R. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr. Rev.* 2008; 29 (4): 494–511. DOI: 10.1210/er.2007-0034.
- Bangen K.J., Werhane M.L., Weigand A.J., Edmonds E.C., Delano-Wood L., Thomas K.R., Nation D.A., Evangelista N.D., Clark A.L., Liu T.T., Bondi M.W. Reduced regional cerebral blood flow relates to poorer cognition in older adults with type 2 diabetes. *Front. Aging Neurosci.* 2018; 10: 270. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00270.
- Chen Y., Liu Z., Zhang J., Zhang J., Xu K., Zhang S., Wei D., Zhan Z. Altered brain activation patterns under different working memory loads in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2014; 37 (12): 3157–3163. DOI: 10.2337/dc14-1683.
- Bertholdo D., Watcharakorn A., Castillo M. Brain proton magnetic resonance spectroscopy: introduction and overview. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 2013; 23 (3): 359–380. DOI: 10.1016/j.nic.2012.10.002.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005; 54 (6): 1615–1625. DOI: 10.2337/diabetes.54.6.1615
- Brands A.M., Biessels G.J., De Haan E.H., Kappelle L.J., Kessels R.P. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2005; 28 (3): 726–735. DOI: 10.2337/diacare.28.3.726.
- Broadley M.M., White M.J., Andrew B. A systematic review and meta-analysis of executive function performance in type 1 diabetes mellitus. *Psychosom. Med.* 2017; 79 (6): 684–696. DOI: 10.1097/PSY.0000000000000460.
- Gaudieri P.A., Chen R., Greer T.F., Holmes C.S. Cognitive function in children with type 1 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2008; 31 (9): 1892–1897. DOI: 10.2337/dc07-2132.
- Brands A.M., Kessels R.P., Hoogma R.P., Henselmans J.M., van der Beek Boter J.W., Kappelle L.J., de Haan E.H., Biessels G.J. Cognitive performance, psychological well-being, and brain magnetic resonance imaging in older patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006; 55 (6): 1800–1806. DOI: 10.2337/db05-1226.
- Northam E.A., Anderson P.J., Werther G.A., Warne G.L., Adler R.G., Andrewes D. Neuropsychological complications of IDDM in children 2 years after disease onset. *Diabetes Care.* 1998; 21 (3): 379–384. DOI: 10.2337/diacare.21.3.379.
- Lyoo I.K., Yoon S., Renshaw P.F., Hwang J., Bae S., Munsen G., Kim J.E., Bolo N., Jeong H.S., Simonson D.C. Network-level structural abnormalities of cerebral cortex in type 1 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2013; 8 (8): e71304. DOI: 10.1371/journal.pone.0071304.
- Van Duinkerken E., Ijzerman R.G., Klein M., Moll A.C., Snoek F.J., Scheltens P., Pouwels P.J.W., Barkhof F., Diamant M., Tijms B.M. Disrupted subject-specific gray matter network properties and cognitive dysfunction in type 1 diabetes patients with and without proliferative retinopathy.

- Hum. Brain Mapp.* 2016; 37 (3): 1194–1208. DOI: 10.1002/hbm.23096.
17. Antenor-Dorsey J.A.V., Meyer E., Rutlin J., Perantie D.C., White N.H., Arbelaez A.M., Shimony J.S., Hershey T. White matter microstructural integrity in youth with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2013; 62 (2): 581–589. DOI: 10.2337/db12-0696.
 18. Musen G., Lyoo I.K., Sparks C.R., Weinger K., Hwang J., Ryan C.M., Jimerson D.C., Hennen J., Renshaw P.F., Jacobson A.M. Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes.* 2006; 55 (2): 326–333. DOI: 10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0520.
 19. Northam E.A., Rankins D., Lin A., Wellard R.M., Pell G.S., Finch S.J., Werther G.A., Cameron F.J. Central nervous system function in youth with type 1 diabetes 12 years after disease onset. *Diabetes Care.* 2009; 32 (2): 445–450. DOI: 10.2337/dc08-1657.
 20. Perantie D.C., Wu J., Koller J.M., Lim A., Warren S.L., Black K.J., Sadler M., White N.H., Hershey T. Regional brain volume differences associated with hyperglycemia and severe hypoglycemia in youth with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30 (9): 2331–2337. DOI: 10.2337/dc07-0351.
 21. Hershey T., Perantie D.C., Wu J., Weaver P.M., Black K.J., White N.H. Hippocampal volumes in youth with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2010; 59 (1): 236–241. DOI: 10.2337/db09-1117.
 22. Marzelli M.J., Mazaika P.K., Barnea-Goraly N., Hershey T., Tsalikian E., Tamborlane W., Mauras N., White N.H., Buckingham B., Beck R.W., Ruedy K.J., Kollman C., Cheng P., Reiss A.L. Diabetes research in children network (DirecNet). Neuroanatomical correlates of dysglycemia in young children with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2014; 63 (1): 343–353. DOI: 10.2337/db13-0179.
 23. Kodl C.T., Franc D.T., Rao J.P., Anderson F.S., Thomas W., Mueller B.A., Lim K.O., Seaquist E.R. Diffusion tensor imaging identifies deficits in white matter microstructure in subjects with type 1 diabetes that correlate with reduced neurocognitive function. *Diabetes.* 2008; 57 (1): 3083–3089. DOI: 10.2337/db08-0724.
 24. Van Duinkerken E., Schoonheim M.M., Sanz-Arigita E.J., IJzerman R.G., Moll A.C., Snoek F.J., Ryan C.M., Klein M., Diamant M., Barkhof F. Resting-state brain networks in type 1 diabetic patients with and without microangiopathy and their relation to cognitive functions and disease variables. *Diabetes.* 2012; 61: 1814–1821. DOI: 10.2337/db11-1358.
 25. Van Duinkerken E., Ryan C.M., Schoonheim M.M., Barkhof F., Klein M., Moll A.C., Diamant M., IJzerman R.G., Snoek F.J. Subgenual cingulate cortex functional connectivity in relation to depressive symptoms and cognitive functioning in type 1 diabetes mellitus patients. *Psychosom. Med.* 2016; 78: 740–749.
 26. Ryan J.P., Aizenstein H.J., Orchard T.J., Ryan C.M., Saxton J.A., Fine D.F., Nunley K.A., Rosano C. Age of childhood onset in type 1 diabetes and functional brain connectivity in midlife. *Psychosom. Med.* 2015; 77: 622.
 27. Van Duinkerken E., Schoonheim M.M., IJzerman R.G., Moll A.C., Landeira-Fernandez J., Klein M., Diamant M., Snoek F.J., Barkhof F., Wink A.-M. Altered eigenvector centrality is related to local resting-state network functional connectivity in patients with longstanding type 1 diabetes mellitus. *Hum. Brain Mapp.* 2017; 38: 3623–3636.
 28. Demuru M., van Duinkerken E., Frascini M., Marrosu F., Snoek F.J., Barkhof F., Klein M., Diamant M., Hillebrand A. Changes in MEG resting-state networks are related to cognitive decline in type 1 diabetes mellitus patients. *Neuroimage Clin.* 2014; 5: 69–76.
 29. Mangia S., Kumar A.F., Moheet A.A., Roberts R.J., Eberly L.E., Seaquist E.R., Tkáč I. Neurochemical profile of patients with type 1 diabetes measured by (1)H-MRS at 4 T. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2013; 33: 754–759. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.13.
 30. Heikkilä O., Lundbom N., Timonen M., Groop P.H., Heikkinen S., Makimattila S. Hyperglycaemia is associated with changes in the regional concentrations of glucose and myo-inositol within the brain. *Diabetologia.* 2009; 52: 534–540. DOI: 10.1007/s00125-008-1242-2.
 31. Seaquist E.R., Tkac I., Damberg G., Thomas W., Gruetter R. Brain glucose concentrations in poorly controlled diabetes mellitus as measured by high-field magnetic resonance spectroscopy. *Metabolism.* 2005; 54: 1008–1013. DOI: 10.1016/j.metabol.2005.02.018.
 32. Sarac K., Akinci A., Alkan A., Aslan M., Baysal T., Ozcan C. Brain metabolite changes on proton magnetic resonance spectroscopy in children with poorly controlled type 1 diabetes mellitus. *Neuroradiology.* 2005; 47: 562–565. DOI: 10.1007/s00234-005-1387-3.
 33. Biessels G.J., Staekenborg S., Brunner E., Brayne C., Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2006; 5 (1): 64–74.
 34. Exalto L.G., Whitmer R.A., Kappele L.J., Biessels G.J. An update on type 2 diabetes, vascular dementia and Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 2012; 47 (11): 858–864.
 35. Yates K.F., Sweat V., Yau P.L., Turchiano M.M., Convit A. Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: a selected review of the literature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32 (9): 2060–2067.
 36. Geijselaers S.L.C., Sep S.J.S., Stehouwer C.D.A., Biessels G.J. Glucose regulation, cognition, and brain MRI in type 2 diabetes: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015; 3 (1): 75–89. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70148-2. Epub 2014 Aug 24.
 37. Van Harten B., deLeeuw F.E., Weinstein H.C., Scheltens P., Biessels G.J. Brain imaging in patients with diabetes: a systematic review. *Diabetes Care.* 2006; 29: 2539–2548.
 38. De Bresser J., Tiehuis A.M., van den Berg E., Reijmer Y.D., Jongen C., Kappelle L.J., Mali W.P., Viergever M.A., Biessels G.J. On behalf of the Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group. Progression of cerebral atrophy and white matter hyperintensities in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2010; 33: 1309–1314.
 39. Kooistra M., Geerlings M.I., Mali W.P., Vincken K.L., van der Graaf Y., Biessels G.J. SMART-MR Study Group. Diabetes mellitus and progression of vascular brain lesions and brain atrophy in patients with symptomatic atherosclerotic disease. The SMART-MR Study. *J. Neurol. Sci.* 2013; 332: 69–74. DOI: 10.1016/j.jns.2013.06.019.
 40. Musen G., Jacobson A.M., Bolo N.R., Simonson D.C., Shenton M.E., McCartney R.L., Flores V.L., Hoogenboom W.S. Resting-state brain functional connectivity is altered in type

- 2 diabetes. *Diabetes*. 2012; 61: 2375–2379. DOI: 10.2337/db11-1669.
41. Sinha S., Ekka M., Sharma U., Pandey R.M., Jagannathan N.R. Assessment of changes in brain metabolites in Indian patients with type-2 diabetes mellitus using proton magnetic resonance spectroscopy. *BMC Res*. 2014; 7: 41. DOI: 10.1186/1756-0500-7-41.
42. Sahin I., Alkan A., Keskin L., Cikim A., Karakas H.M., Firat A.K., Sigirci A. Evaluation of *in vivo* cerebral metabolism on proton magnetic resonance spectroscopy in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications*. 2008; 22 (4): 254–260. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2007.03.007.
43. Groeneveld O., Reijmer Y., Heinen R., Kuijf H., Koekkoek P., Janssen J., Rutten G., Kappelle L., Biessels G. Cog-Id Study Group. Brain imaging correlates of mild cognitive impairment and early dementia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. 2018; 28 (12): 1253–1260. DOI: 10.1016/j.numecd.2018.07.008.
44. Macpherson H., Formica M., Harris E., Daly R.M. Brain functional alterations in type 2 diabetes – a systematic review of fMRI studies. *Front. Neuroendocrinol*. 2017; 47: 34–46. DOI: 10.1016/j.yfrne.2017.07.001.
45. Rae C.D. A guide to the metabolic pathways and function of metabolites observed in human brain 1H magnetic resonance spectra. *Neurochem. Res*. 2014; 39 (1): 1–36. DOI: 10.1007/s11064-013-1199-5.
46. Gujar S.K., Maheshwari S., Björkman-Burtscher I., Sundgren P.C. Magnetic resonance spectroscopy. *J. Neuroophthalmol*. 2005; 25 (3): 217–226. DOI: 10.1097/01.wno.0000177307.21081.81.
47. Ross B., Bluml S. Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Anat. Rec*. 2001; 265 (2): 54–84. DOI: 10.1002/ar.1058.

Вклад авторов

Матвеева М.В. – поиск литературы, набор пациентов, проведение исследования, написание рукописи. Самойлова Ю.Г. – дизайн исследования, редактирование рукописи. Жукова Н.Г. – дизайн исследования, редактирование рукописи. Толмачев И.В. – поиск литературы, консультирование по вопросам статистической обработки нейровизуализационного исследования. Бразовский К.С. – дизайн исследования, редактирование рукописи. Лейман О.П. – поиск литературы по теме СД 2-го типа, набор пациентов. Фимушкина Н.Ю. – поиск литературы по теме СД 1-го типа, набор пациентов. Тонких О.С. – редактирование рукописи.

Сведения об авторах

Матвеева Мария Владимировна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра детских болезней, кафедра эндокринологии и диабетологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9966-6686.

Самойлова Юлия Геннадьевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра эндокринологии и диабетологии, зав. кафедрой детских болезней, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-2667-4842.

Жукова Наталья Григорьевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 000-0001-6547-6622.

Бразовский Константин Станиславович, д-р техн. наук, зав. кафедрой медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск.

Толмачев Иван Владиславович, канд. мед. наук, доцент, кафедра медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-2888-5539.

Лейман Ольга Петровна, аспирант, кафедра эндокринологии и диабетологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-4340-5273.

Фимушкина Наталья Юрьевна, аспирант, кафедра эндокринологии и диабетологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6452-6584.

Тонких Ольга Сергеевна, канд. мед. наук, зав. отделением томографических методов исследования, СибГМУ, г. Томск.

✉ **Матвеева Мария Владимировна**, e-mail: matveeva.mariia@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.05.2019

Подписана в печать 25.12.2019

Оптогенетические методы и технологии в решении прикладных медицинских задач

Сорокина Л.Е.¹, Петренко В.И.¹, Субботкин М.В.¹, Куланова А.А.¹, Кучеренко А.С.¹, Кубышкин А.В.¹, Фомочкина И.И.¹, Номеровская А.Ю.¹, Халилов С.С.²

¹ Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, Крымский федеральный университет (КФУ) имени В.И. Вернадского

Россия, Республика Крым, 295051, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7

² Физико-технический институт, Крымский федеральный университет (КФУ) имени В.И. Вернадского
Россия, Республика Крым, 295007, г. Симферополь, пр. Академика Вернадского, 4/А

РЕЗЮМЕ

Оптогенетика – инновационное и быстро развивающееся научное направление, объединяющее достижения молекулярной биологии и лазерных технологий для решения вопросов мониторинга различных биохимических процессов в клетке и контроля ее активности с помощью света. Данный обзор посвящен вопросам реализации и применения оптогенетического подхода для диагностики и лечения различных социально значимых заболеваний на молекулярно-генетическом уровне. Описаны различные способы доставки и встраивания генетических конструкций, кодирующих трансмембранные белки. Рассматриваются новые оптоволоконные технологии, используемые для исполнения имплантируемых устройств генерации и фиксации сигналов в возбудимых тканях. Приводится анализ современных, наиболее используемых способов регистрации показателей эксперимента, указываются ключевые преимущества и недостатки различных методик.

Ключевые слова: оптогенетика, опсины, ионные каналы, оптоволоконные системы, фотостимуляция, нейроинтерфейс, оптогенетическая терапия.

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

Источник финансирования. Исследования были частично поддержаны Программой развития ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет В.И. Вернадского» на 2015–2024 г.

Для цитирования: Сорокина Л.Е., Петренко В.И., Субботкин М.В., Куланова А.А., Кучеренко А.С., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Номеровская А.Ю., Халилов С.С. Оптогенетические методы и технологии в решении прикладных медицинских задач. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 195–203. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-195-203>.

Optogenetic methods and technologies in solving applied medical problems

Sorokina L.E.¹, Petrenko V.I.¹, Subbotkin M.V.¹, Kulanova A.A.¹, Kucherenko A.S.¹, Kubyshkin A.V.¹, Fomochkina I.I.¹, Nomerovskaya A.Yu.¹, Halilov S.I.²

¹ V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Medical Academy named after S.I. Georgievsky
5/7, Lenin Av., Simferopol, 295051, Republic of Crimea, Russian Federation

✉ Сорокина Лея Евгеньевна, e-mail: leya.sorokina@mail.ru.

² V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Physics and Technology Institute
4, Academician Vernadsky Str., Simferopol, 295007, Republic of Crimea, Russian Federation

ABSTRACT

Optogenetics is an innovative and fast-growing field of science combining the advances in molecular biology and laser technologies to monitor various biochemical processes in the cell and to control its activity using light. Therefore, this review is devoted to the implementation of the optogenetic approach to diagnosis and treatment of various socially sensitive diseases at the molecular and genetic level. Furthermore, the article considers different methods of delivery and incorporation of genetic constructs encoding transmembrane proteins. New fiber optic technologies used to develop implantable devices for generating and recording signals in excitable tissues are described. Besides, the most state-of-the-art and popular registration methods are considered in the review.

Key words: optogenetics, opsins, ion channels, fiber optic systems, photostimulation, neurointerface, optogenetic therapy.

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

Source of financing. This work was partially supported by the V.I. Vernadsky Crimean Federal University Development Program for 2015–2024.

For citation: Sorokina L.E., Petrenko V.I., Subbotkin M.V., Kulanova A.A., Kucherenko A.S., Kubyshekin A.V., Fomochkina I.I., Nomerovskaya A.Yu., Halilov S.I. Optogenetic methods and technologies in solving applied medical problems. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 195–203. [https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2020-2-195-203](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-195-203).

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на пересечении молекулярной биологии и передовых лазерных технологий стремительно развивается новое междисциплинарное направление – оптогенетика, в рамках которой разрабатывается обширный арсенал для изучения механизмов формирования памяти и поведения, функциональной диагностики и терапии нейродегенеративных, психогенных болезней и других социально значимых заболеваний человека. Центральная роль в решении таких комплексных и сложных задач отводится знаниям о функционировании различных генетических конструкций и внедрению принципиально новых оптических устройств для исследования функционирования электровозбудимых тканей.

Разработанные и внедренные в практику последние достижения оптогенетики основаны на использовании генетически кодируемых светочувствительных ионных каналов, которые в последующем подвергаются воздействию фотостимуляции в различных режимах. В подобных экспериментах особо важно обеспечить наличие качественной оптоволоконной системы, которая позволит провести доставку светового пучка с минимальными потерями и затем эффективно произвести регистрацию внутриклеточных изменений. Подобные системы

сегодня представляют собой уникальную платформу для разработки инновационных нейроинтерфейсов, применяемых в оптогенетике для экспериментов на свободно двигающихся животных.

На современном этапе оптогенетика имеет серьезные преимущества перед традиционными электрофизиологическими методами ввиду избирательности воздействия, точности и возможности как возбуждения, так и угнетения выбранных популяций клеток. Последнее может быть использовано не только в фундаментальной нейробиологии, но и в прикладной медицине. Например, вводя актуаторы в нейроны в очаге эпилептической активности и включив «торможение», можно прервать и (или) предотвратить приступ эпилепсии.

В данном обзоре впервые комплексно освещены вопросы планирования оптогенетического эксперимента с указанием ключевых преимуществ и недостатков различных методик, а также наиболее полно описаны современные достижения оптогенетики в клинической медицине.

ОПТОГЕНЕТИКА: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И СТАНОВЛЕНИЯ

В 1971 г. У. Стокениусом и Д. Остерхельтом было установлено, что ионный канал бактериородопсин может быть активирован фотонами. Уже через 8 лет

английский биофизик Фрэнсис Крик высказал идею активации группы клеток с помощью света [1, 2].

В 2005 г. группой ученых Стэнфордского университета под руководством Карла Дайссерота было показано, что контроль активности группы нейронов можно осуществить путем адаптации природного канального родопсина (Channelrhodopsin-2), полученного из зеленых водорослей вида *Chlamydomonas reinhardtii*, используя лентивирусную доставку генов [3]. Эксперимент неоднократно проводился на плодовых мушках и мышках. В результате было достоверно доказано, что после встраивания опсина в плазмалемму клетки и точечного освещения светом синего спектра происходила деполяризация клеточной мембраны.

Последующие исследования показали, что в ответ на облучение светом различных длин волн к регуляции функционирования нейронов способны и другие природные белки, такие как бактериородопсин, галородопсин и каналородопсин. В 2008 г. впервые был выделен каналородопсин VChR1, чувствительный уже к свету желтого спектра [4]. Данное открытие продемонстрировало, что использование различных модификаций канальных родопсинов со смещенными пиками активации в область красного спектра позволяет экспериментатору избирательно стимулировать нейроны двух типов, расположенные в одной области интереса.

С актуализацией исследований в данной области и получением новых знаний нейрофизиологов о молекулярной организации работы мозга стало ясно, что ткани позвоночных животных уже содержат необходимый для реализации метода транс-ретиналь. Поглощая фотон, ретиналь изомеризуется, провоцируя изменение конформации белка, что приводит к изменению проницаемости мембраны для ионов, индуцируя ток одновалентных (H^+ , Na^+ , K^+) и небольшого количества некоторых двухвалентных (Ca^{2+}) катионов, вызывающих деполяризацию мембраны нейрона. Теперь исследователи могут не только избирательно контролировать активность в определенных нейронах, но и прогнозировать физиологические и поведенческие реакции организмов.

В связи с появлением новых методик исследований в мире нейробиологии началось и совершенствование оптоволоконных инструментов, собственно позволяющих осуществлять доставку светового пучка. Так, была успешно осуществлена идея одновременной оптической стимуляции и регистрации электрических импульсов. В настоящее время существует возможность прямого измерения электрической активности в нейронах, ответственных за моторную деятельность, и их одновременного контроля с помощью опсинов.

ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ: ПРИНЦИПЫ ПЛАНИРОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ ДИЗАЙНА ЭКСПЕРИМЕНТА

Дизайн любого оптогенетического исследования включает следующие основные элементы: планирование эксперимента; доставка генетической конструкции, кодирующей светочувствительный белок; доставка светового пучка; регистрация результатов.

Планирование эксперимента

Выполняется постановка цели и задач, уточнение условий проведения эксперимента (имеющееся или доступное оборудование, финансовые ресурсы, кадровый состав), выбор входных и выходных параметров на основе сбора и анализа предварительной информации (определение объекта исследования, способа доставки генетической конструкции, кодирующей светочувствительный белок, режима фотостимуляции), а также составление плана и сроков проведения эксперимента.

Доставка генетической конструкции, кодирующей светочувствительный белок

Широко используемым в настоящее время является метод инъекции аденоассоциированных (AAV) и лентивирусных (LV) векторов, которые позволяют осуществлять точный пространственный контроль над экспрессией опсина. Специфичность метода в основном достигается с помощью промоторов и энхансеров. Только в клетках с соответствующим паттерном экспрессии для конкретного промотора возможна активация процесса синтеза опсина [5]. Использование энхансеров позволяет добиваться строгой специфичности, не перегружая конструкции вектора [6].

Немаловажную роль в эффективности внедрения вирусных частиц играет совокупность белков-рецепторов на поверхности вирусного капсида – серотип, поскольку он определяет, каким образом будет происходить инфицирование клеток-мишеней (например, в области тела нейрона или у его отростков). Уже сейчас экспериментально подтверждено, что серотип AAV 2.1 подходит для заражения клеток головного мозга грызунов, а серотипы 8 и 9 – для инфицирования нейронов в мозге приматов.

Другой стратегией, обеспечивающей наличие специфического гена в эксперименте, является применение трансгенных линий животных, т.е. живых организмов, в геном которых были внесены чужеродные гены. В настоящее время широко используются линии животных Cre/loxP, экспрессирующие cre-рекомбиназу, которая осуществляет «вырезание» окруженного LoxP последовательностями экзона,

благодаря чему создается линия животных, у которых отсутствует определенный интересующий исследователей ген [7].

Для получения трансгенных животных используются вирусные и невирусные технологии. К последним относятся основанные на физическом и химическом воздействии подходы, позволяющие трансфицировать клетки *in vitro* [8]. Один из способов создания таких трансгенных объектов исследования связан с эмбриональными стволовыми клетками. Сначала клонируемая ДНК интегрируется в культуру эмбриональных стволовых клеток, затем отобранные трансгенные эмбриональные стволовые клетки культивируются и используются для получения необходимых линий [9, 10].

Для получения трансгенных мышей также используется метод внутриворотовой электропорации. При этом раствор с ДНК, кодирующей опсин, вводят *in utero* в определенные дни развития эмбриона, а затем его подвергают воздействию высоковольтного электрического разряда короткой продолжительности, что позволяет избирательно воздействовать на конкретные типы клеток и области мозга [11]. Данный метод требует точного знания времени и траектории миграции определенных групп нейронов во время развития. Данная методика позволяет качественно обеспечить таргетную доставку гена в корковые слои II и III, в нейроны стриатума и гиппокампа [12]. В отличие от вирусных методов с помощью электропорации можно внедрить большее количество копий гена и доставлять ДНК любого размера с большими промоторными сегментами для достижения большей клеточной специфичности.

К наиболее известному методу доставки генетической конструкции химическим способом относится липосомальный транспорт: генетический материал помещается в липосому, которая связывается с клеточной мембраной и способствует его внутриклеточному высвобождению. Специфичность данного метода достигается с помощью связывания определенного лиганда с поверхностью липосомы.

Таким образом, в настоящее время имеется большой арсенал методов, обеспечивающих наличие кодирующих опсин генов в экспериментальных моделях. Приоритетными характеристиками приведенных методов являются точность и избирательность действия, относительная доступность и воспроизводимость. Наиболее широко в оптогенетических исследованиях применяются трансгенные животные и вирусные векторы, однако разработка и внедрение новых методов доставки генетических конструкций не менее актуальны, так как они позволяют, во-первых, значительно расширить сферы применения оп-

тогенетики, во-вторых, ускорить процесс внедрения метода в практическое русло, в том числе использовать его для лечения заболеваний человека.

Доставка светового пучка

В целом функции оптоволоконного комплекса доставки светового излучения сводятся к следующему: генерация и управление световым излучением, модификация и фильтрация светового излучения, проведение светового излучения в ткани и клеточные культуры [13]. На современном этапе даже простейшие оптогенетические эксперименты требуют программируемых импульсных генераторов для модуляции светодиодного или лазерного излучения и создания высококачественного управляемого светового импульса. Изучение функций мозга требует нейронных интерфейсов, которые могут записывать и стимулировать мозг с высокой пространственно-временной точностью.

Среди исследователей наиболее востребованной является оптогенетическая методика *in vivo* в лабораторных условиях; для чего в настоящее время используют перманентно имплантируемое оптическое волокно, направляемое через канюлю. Имплантация волокна позволяет преодолеть такие ограничения, как повреждение ткани головного мозга при повторном введении оптоволоконка, потенциальные дефекты волокна внутри имплантата и точность позиционирования канюли внутри головного мозга животного. Одним из преимуществ метода перманентной имплантации оптического волокна в экспериментах *in vivo* является возможность сочетания оптогенетического метода с другими видами исследований. Основные показатели, которые необходимо определить перед началом любого оптогенетического эксперимента: длина волны облучения, интенсивность и режим стимуляции, от которых зависит успешность изучения и управления внутриклеточной активностью.

Регистрация результатов

Для визуализации изменения параметров клеточной активности у свободно двигающихся животных может использоваться большое количество различных биосенсоров, в том числе генетически кодируемых, основанных на эффекте флуоресценции. Эти методы позволяют оценить не только клеточную активность, но и изменение сигнального статуса клетки. Например, широко применяется семейство датчиков ацетилхолина GCh, созданных на основе рецепторов, связанных с G-белком, которые избирательно реагируют на специфический медиатор флуоресценцией, регистрируемой с помощью эпифлуоресцентной, конфокальной и двухфотон-

ной микроскопии [14]. Интерес ученых вызывает возможность манипулирования определенной популяцией нейронов и одновременной регистрации результата, что позволит детальнее изучать связь между активностью и функцией клеток. Новейшей разработкой в этой области стал «минископ», позволяющий визуализировать флуоресценцию и в то же время проводить оптогенетические манипуляции, изменяя активность нейронов [15].

Одним из наиболее распространенных способов оценки электрофизиологических изменений мембранного потенциала возбудимых клеток является «пэтч-кламп» (patch-clamp). С использованием данного метода *in vitro* в комбинации с оптогенетикой становится возможным детальное изучение синаптической активности отдельных нейронов и установление их роли в активирующих и тормозных влияниях на кору мозга. Для оценки неврологического статуса и контроля поведения животного используются поведенческие тесты.

Таким образом, многообразие современных оптогенетических технологий определяет возможность их применения в различных научных направлениях в качестве основного или дополнительного метода. Однако дальнейшая разработка и совершенствование непосредственно оптогенетических технологий продолжают быть актуальными, поскольку развитие биотехнологии, генетики, оптики и биохимии позволит полностью реализовать потенциал данного научного направления. В частности, на каждом этапе оптогенетического исследования можно выделить ряд вопросов, требующих дальнейшего изучения.

На первом этапе актуальным является совершенствование методов доставки и экспрессии генов, а также прицельное изучение генов, кодирующих светочувствительные белки, что особенно важно в перспективе применения оптогенетики для лечения заболеваний человека. На втором этапе немаловажным является дальнейшее изучение уже известных светочувствительных белков, при этом интерес представляют не только их физико-химические свойства, но также функции в клетках организмов, у которых они были обнаружены, что позволит в дальнейшем рассматривать их уже с позиции фармакологии. Кроме того, определенный интерес представляет возможность модификации светочувствительных белков, благодаря которой будет возможно более тонко регулировать их функции в оптогенетическом эксперименте.

Исследования, затрагивающие третий этап, направлены, во-первых, на изучение модифицированного светового излучения в перспективе разработки новых методов с использованием света различной длины волны, сфокусированного, рассеянного и

многолучевого излучения. Во-вторых, на усовершенствование аппаратного комплекса, что особенно актуально в целях стандартизации метода. Наконец, на четвертом этапе возникает проблема объективной оценки результатов эксперимента, преодоление которой требует комплексного анализа, включающего функциональные тесты, регистрацию с помощью электродов и зондов, а также флуоресцентные биосенсоры. При этом также важна разработка неинвазивных методов регистрации результатов, особенно в интересах медицины.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ: ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД В РЕШЕНИИ БИМЕДИЦИНСКИХ ЗАДАЧ

Нейрофизиология

Селективно воздействуя на возбудимые ткани, оптогенетика открывает большие возможности, прежде всего для нейрофизиологии, обладая рядом преимуществ по сравнению с другими методами исследования данной фундаментальной области (в частности, по сравнению с классической нейростимуляцией). К достоинствам данного направления относят возможность воздействовать на определенные интересующие типы нейронов и их отдельные внутриклеточные структуры с точным пространственно-временным контролем, что определяет перспективы для расширения современных представлений о функциональном устройстве мозга. Так, например, экспериментально продемонстрирована возможность активации локомоторных движений путем световой стимуляции глутаматергических нейронов спинного мозга трансгенных мышей, что показало ключевую роль данных клеток в процессе передвижения [16].

Оптогенетика также может быть ключом к решению и более сложных, комплексных исследований. Дополнив эксперимент функциональными данными с помощью оптогенетического метода, установлено, что нейроны рострального вентромедиального отдела продолговатого мозга иннервируют функционально неоднородные ткани (миокард, скелетные мышцы). Прежде предполагали, что данный отдел связан с регуляцией исключительно тонуса гладких миоцитов [17].

Кроме того, обсуждается возможность исследования мозжечка с помощью оптогенетического подхода, что является особо актуальным ввиду малоизученности функциональных связей мозжечка с корой больших полушарий и подкорковыми структурами [18].

Неврология

Вышеизложенные достоинства оптогенетики определяют ее широкие возможности не только в области нейрофизиологии, но и таких клинических

дисциплин, как неврология и психиатрия, позволяя рассматривать данный подход в качестве перспективного метода лечения. Одним из направлений оптогенетических исследований является возможность лечения прежде всего нейропатической боли. Точный патогенез данного состояния неизвестен, однако экспериментально установлена возможность воздействия на его периферический и центральный компоненты. В первом случае в качестве терапевтической мишени были рассмотрены ноцицепторы, во втором – желатинозная субстанция [19].

В эксперименте с моделью болезни Альцгеймера удалось установить терапевтическую роль восстановления медленных кортикоталамических осцилляций (0,6 Гц) с помощью оптогенетического повышения активности пирамидальных нейронов. Более того, было установлено патогенное действие медленных кортикоталамических осцилляций с оптогенетически удвоенной частотой (1,2 Гц) на развитие данной патологии, что в целом создает предпосылки для разработки лечебно-профилактической системы на основе достижений оптогенетики [20].

Для лечения болезни Паркинсона с 2010 г. учеными стали предлагаться способы глубокой стимуляции мозга. Методика основывается на стереотаксическом использовании миниатюрных электродов, с помощью которых осуществляют стимуляцию субталамического ядра мозга. Эффективность использования данного варианта терапии намного превышает эффективность медикаментозной терапии.

Функциональный оптогенетический подход также рассматривается в качестве метода реабилитации, в частности после инфаркта мозга. При этом возможно многокомпонентное действие: увеличение нейронной активности в ишемизированных тканях в сочетании с реорганизацией афферентных и эфферентных нейронных цепей [21].

Психиатрия

Перспектива функциональной реорганизации афферентных и эфферентных нейронных цепей и, в особенности, прицельного изучения клеточных и субклеточных взаимодействий в нервной ткани определяет также большой интерес к оптогенетике со стороны психиатров и наркологов.

Предполагается, что путем оптогенетической нормализации биохимических процессов и селективной стимуляции областей мозга, патогенетически связанных с тем или иным заболеванием, станет возможным лечение нарушений, сопровождающихся депрессивным синдромом, тревожностью, зависимостью, а также шизофренией и расстройств аутистического спектра [22, 23]. В частности, в одном

из экспериментов американскими учеными было установлено достоверное снижение депрессивных симптомов у животных после оптогенетической стимуляции дофаминергических нейронов, связанных с прилежащим ядром, ответственным за формирование различных поведенческих реакций [24].

В 2014 г. учеными из университета Буффало удалось контролировать с помощью света аддиктивную зависимость у крыс, приученных к алкоголю. У данной группы животных осуществляли генетическую модификацию систем высвобождения дофамина, после чего с помощью света можно было стимулировать выбранные группы нейронов и достичь продолжительного высвобождения нейромедиатора [25]. Уже в другом эксперименте путем оптогенетической стимуляции орбитофронтальной коры экспериментальных животных было обнаружено угнетение компульсивных симптомов, что создает предпосылки для разработки лечения целого ряда расстройств, связанных с нарушением взаимодействия орбитофронтальной коры и полосатого тела [26].

Офтальмология

Возможность восстановления и регуляции собственных светочувствительных клеток с помощью оптогенетической стимуляции определяет перспективы данного научного направления в области офтальмологии, в том числе для лечения заболеваний сетчатки, что чрезвычайно важно с учетом неутешительных данных Всемирной организации здравоохранения по статистике заболеваемости.

Следует отметить, что оптогенетические исследования, проводимые в области офтальмологии, имеют ряд особенностей в отличие от других медицинских направлений. Прежде всего, предпочтение в работе отдают опсинам с ретиноидным кофактором, что, очевидно, более физиологично, а доставка материала обычно осуществляется с помощью вирусных векторов путем интратретиальной и субретинальной инъекции с использованием аденоассоциированного вируса [27].

К основным проблемам применения оптогенетического метода в данной области относят: возникновение ремоделирования сетчатки с нарушением цитоархитектоники и функциональных взаимоотношений между ее слоями, проблемы с точным определением требуемого места инъекции генетического материала для получения оптимального результата и некоторое несоответствие между физиологическими для человека диапазонами восприятия света и диапазонами света, действующего на опсины [28]. Тем не менее предполагается, что непрерывное совершенствование техники оптогенетического эксперимента позволит преодолеть возникшие трудности. Так, уже

сегодня технологии оптогенетической инженерии позволяют сделать чувствительными к свету недеградировавшие клетки-фоторецепторы, а лежащие глубже ганглионарные клетки, что обеспечивает снижение риск в развитии полной потери зрения у пациентов с дегенеративными заболеваниями сетчатки [29].

Оториноларингология

Широкие возможности открывает оптогенетика и для оториноларингологии. В частности, данный подход может быть использован для восстановления нарушений слуха на уровне рецепторов при воздействии на физиологические механизмы восприятия звука, как показано в экспериментах по оптогенетической стимуляции слухового нерва, в результате которых было зарегистрировано возбуждение соответствующих ядер ствола мозга [30, 31]. Очевидные достоинства отличают оптогенетические конструкции от кохлеарных имплантов, позволяя избирательно действовать на клетки определенной части улитки, что было установлено в лаборатории Массачусетского университета, где удалось добиться частичного восстановления слуха с помощью света низкой интенсивности [32].

Эндокринология

Еще одним вариантом применением оптогенетической стимуляции может стать коррекция основных звеньев патогенеза эндокринных заболеваний, в частности, в перспективе – разработка сахаропонижающей системы. Экспериментально установлена возможность достижения нормогликемии на модели сахарного диабета II типа. В ходе исследования культура клеток, секретирующая глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и щелочную фосфатазу, была трансплантирована мышам линии LepRdb/db интраперитонеально и подкожно. В первом случае световой пучок был подведен с помощью оптоволокну, во втором – трансдермально, при этом в обоих случаях отмечалось достоверное снижение уровня глюкозы крови [33]. Подобная логика эксперимента сохранилась также в исследовании с беспроводным контролем над процессом подачи светового пучка с помощью приложения для смартфона. При этом культура клеток также синтезировала GLP-1 и инсулин, а в качестве источника светового пучка использовался светодиод, подкожно имплантированный с культурой в гидрогелевой капсуле [34].

Кардиология

Исходя из того, что функции сердца неразрывно связаны с электрохимическими процессами, оптогенетика, будучи нацелена на более тонкие и физиологичные механизмы, чем применяемые в настоящее

время медикаментозные и хирургические методы лечения, открывает широкие возможности для восстановления пациентов кардиологического профиля.

Достижения оптогенетики могут быть использованы для получения нового типа кардиостимуляторов, в которых функционирование мышечных клеток-пейсмекеров будет контролироваться светом вместо электрических импульсов. Так, например, в США команда стэнфордских ученых под руководством Оскара Абилеза работает над проектом по разработке нового биологического кардиостимулятора, управляемого светом. Полученные результаты исследований дают основания полагать, что есть надежные способы для восстановления здоровой работы сердечной мышцы с помощью света. Самое главное преимущество оптогенетики в кардиологии – это селективное возбуждение только внутреннего слоя (эндокарда) [35].

Данный способ лечения мерцательной аритмии позволит улучшить состояние пациентов и снизить побочные действия по сравнению с использованием существующих электрических кардиостимуляторов, которые устраняют аритмию, но вызывают сильную боль в связи с возбуждением скелетных мышц [36, 37]. В целом уже сегодня оптогенетический метод готов предложить замену таким устройствам, как кардиостимуляторы и дефибрилляторы, которые позволяют в определенном ритме подводить электрические сигналы, однако использование этих устройств сопряжено с определенными рисками (повреждение сердечной ткани, сбой батареи и др.) [38].

Фармация и фармакология

Не менее актуальным является использование оптогенетики и в области фармацевтических наук. Прежде всего, оптогенетика позволит оптимизировать пайплайн на этапе исследований и разработки препаратов, а именно: поиск новых терапевтических мишеней для лекарственных препаратов путем всестороннего изучения этиопатогенеза заболеваний, оптогенетический скрининг, функциональный оптогенетический анализ и стратификацию пациентов, что является важным шагом в направлении персонализированной медицины [39]. Механизмы действия непосредственно оптогенетического компонента терапии могут быть многообразны: регуляция внутриклеточных сигнальных путей, увеличение проницаемости клеточных мембран, контроль пролиферации и дифференцировки клеток, активация действующих веществ препарата после доставки в клетку и др.

Кроме того, оптогенетика рассматривается в качестве перспективного метода изучения токсичности лекарственных средств на этапе их разработки, что крайне актуально с экономической точки

зрения. Применяемые в настоящее время методы недостаточно эффективны – порядка одной трети лекарственных средств не проходят клинические испытания на II–III фазах [40]. Наконец, оптогенетика может использоваться в качестве высокоспецифичного инструмента для доставки лекарственных средств, позволяя регулировать скорость, ритм и высвобождаемую дозу вещества, а также преодолевать гистогематические барьеры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптогенетика – новое перспективное научное направление для решения различных биомедицинских задач. Оптимальный синтез достижений молекулярной биологии и лазерных технологий открывает новые возможности и позволяет решить сложные биомедицинские задачи. Совершенствование и использование данного метода расширяют возможности терапевтического воздействия для широкого спектра заболеваний с минимизацией фармакологического воздействия и максимальной эффективностью и избирательностью действия, что, возможно, в будущем позволит активно использовать данный метод не только в фундаментальной медицине, но и в практическом здравоохранении.

ЛИТЕРАТУРА

- Oesterheld D., Stoerkenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New Biol.* 1971; 233 (39): 149–152. DOI: 10.1038/newbio233149a0.
- Crick F.H. Thinking about the brain. *Sci. Am.* 1979; 241 (3): 219–232. DOI: 10.1038/scientificamerican0979-219.
- Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 2005; 8 (9): 1263–1268. DOI: 10.1038/nn1525.
- Zhang F., Prigge M., Beyrière F., Tsunoda S.P., Mattis J., Yizhar O., Hegemann P., Deisseroth K. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat. Neurosci.* 2008; 11 (6): 631–633. DOI: 10.1038/nn.2120.
- Deubner J., Coulon P., Diester I. Optogenetic approaches to study the mammalian brain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019; 57: 157–163. DOI: 10.1016/j.sbi.2019.04.003.
- Dimidschstein J., Chen Q., Tremblay R. et al. A viral strategy for targeting and manipulating interneurons across vertebrate species. *Nat. Neurosci.* 2016; 19 (12): 1743–1749. DOI: 10.1038/nn.4430.
- Fenno L.E., Mattis J., Ramakrishnan C. et al. Targeting cells with single vectors using multiple-feature Boolean logic. *Nat. Methods.* 2014; 11 (7): 763–772. DOI: 10.1038/nmeth.2996.
- Arenkiel B.R., Peca J., Davison I.G. et al. *In vivo* light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron.* 2007; 54 (2): 205–218. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.03.005.
- Zeng H., Madisen L. Mouse transgenic approaches in optogenetics. *Prog. Brain Res.* 2012; 196: 193–213. DOI: 10.1016/B978-0-444-59426-6.00010-0.
- Park J.E., Silva A.C. Generation of genetically engineered non-human primate models of brain function and neurological disorders. *Am. J. Primatol.* 2019; 81 (2): e22931. DOI: 10.1002/ajp.22931.
- Bitzenhofer S.H., Ahlbeck J., Wolff A. et al. Layer-specific optogenetic activation of pyramidal neurons causes beta-gamma entrainment of neonatal networks. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14563. DOI: 10.1038/ncomms14563.
- Adesnik H., Scanziani M. Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. *Nature.* 2010; 464 (7292): 1155–1160. DOI: 10.1038/nature08935.
- Han X., Chow B.Y., Zhou H., Klapeotke N.C., Chuong A., Rajimehr R., Yang A., Baratta M.V., Winkle J., Desimone R., Boyden E.S. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Front. Syst. Neurosci.* 2011; 5: 18. DOI: 10.3389/fnsys.2011.00018.
- Jing M., Zhang P., Wang G. et al. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies. *Nat. Biotechnol.* 2018; 36 (8): 726–737. DOI: 10.1038/nbt.4184.
- Srinivasan S., Hosokawa T., Vergara P. et al. Miniaturized microscope with flexible light source input for neuronal imaging and manipulation in freely behaving animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 517 (3): 520–524. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.07.082.
- Häggglund M., Borgius L., Dougherty K.J., Kiehn O. Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nat. Neurosci.* 2010; 13 (2): 246–252. DOI: 10.1038/nn.2482.
- Farmer D.G., Pracejus N., Dempsey B. et al. On the presence and functional significance of sympathetic premotor neurons with collateralized spinal axons in the rat. *J. Physiol.* 2019; 597 (13): 3407–3423. DOI: 10.1111/JP277661.
- Miterko L.N., Baker K.B. et al. Consensus paper: experimental neurostimulation of the cerebellum. *Cerebellum.* 2019; 18 (6): 1064–1097. DOI: 10.1007/s12311-019-01041-5.
- Liu K., Wang L. Optogenetics: Therapeutic spark in neuropathic pain. *Bosn. J. Basic. Med. Sci.* 2019; 19 (4): 321–327. DOI: 10.17305/bjbm.2019.4114.
- Kastanenka K.V., Calvo-Rodriguez M., Hou S.S. et al. Frequency-dependent exacerbation of Alzheimer's disease neuropathophysiology. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 8964. DOI: 10.1038/s41598-019-44964-z.
- Krook-Magnuson E., Armstrong C., Oijala M., Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat. Commun.* 2013; 4: 1376. DOI: 10.1038/ncomms2376.
- Deisseroth K. Optogenetics and psychiatry: applications, challenges, and opportunities. *Biol. Psychiatry.* 2012; 71 (12): 1030–1032. DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.12.021.
- Shirai F., Hayashi-Takagi A. Optogenetics: Applications in psychiatric research. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2017; 71 (6): 363–372. DOI: 10.1111/pcn.12516.
- Tye K.M., Mirzabekov J.J., Warden M.R. et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depres-

- sion-related behaviour. *Nature*. 2013; 493 (7433): 537–541. DOI: 10.1038/nature11740.
25. Bass C.E., Grinevich V.P., Gioia D. et al. Optogenetic stimulation of VTA dopamine neurons reveals that tonic but not phasic patterns of dopamine transmission reduce ethanol self-administration. *Front. Behav. Neurosci.* 2013; 7: 173. DOI: 10.3389/fnbeh.2013.00173.
 26. Burguière E., Monteiro P., Feng G., Graybiel A.M. Optogenetic stimulation of lateral orbitofronto-striatal pathway suppresses compulsive behaviors. *Science*. 2013; 340 (6137): 1243–1246. DOI: 10.1126/science.1232380.
 27. Henriksen B.S., Marc R.E., Bernstein P.S. Optogenetics for retinal disorders. *J. Ophthalmic. Vis. Res.* 2014; 9 (3): 374–372. DOI:10.4103/2008-322X.143379.
 28. Berry M.H., Holt A., Salari A. et al. Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin. *Nat. Commun.* 2019; 10 (1): 1221. DOI: 10.1038/s41467-019-09124-x.
 29. Ganjawala T.H., Lu Q., Fenner M.D., Abrams G.W., Pan Z.H. Improved CoChR variants restore visual acuity and contrast sensitivity in a mouse model of blindness under ambient light conditions. *Mol. Ther.* 2019; 27 (6): 1195–1205. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.04.002.
 30. Hernandez V.H., Gehrt A., Jing Z. et al. Optogenetic stimulation of the auditory nerve. *J. Vis. Exp.* 2014; (92): e52069/ DOI: 10.3791/52069.
 31. Hernandez V.H., Gehrt A., Reuter K. et al. Optogenetic stimulation of the auditory pathway. *J. Clin. Invest.* 2014; 124 (3): 1114–1129. DOI: 10.1172/JCI69050.
 32. Wrobel C., Dieter A., Huet A. et al. Optogenetic stimulation of cochlear neurons activates the auditory pathway and restores auditory-driven behavior in deaf adult gerbils. *Sci. Transl. Med.* 2018; 10 (449): eaao4496. DOI: 10.1126/scitranslmed.aao0540.
 33. Ye H., Daoud E., Baba M., Peng R.W., Fussenegger M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*. 2011; 332 (6037): 1565–1568. DOI: 10.1126/science.1203535.
 34. Shao J., Xue S., Yu G. et al. Smartphone-controlled optogenetically engineered cells enable semiautomatic glucose homeostasis in diabetic mice. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9 (387): eaal2298. DOI: 10.1126/scitranslmed.aal2298.
 35. Yu L., Zhou L., Cao G. et al. Optogenetic modulation of cardiac sympathetic nerve activity to prevent ventricular arrhythmias. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 70 (22): 2778–2790. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.09.1107.
 36. Majumder R., Feola I., Teplenin A.S., de Vries A.A., Panfilov A.V., Pijnappels D.A. Optogenetics enables real-time spatiotemporal control over spiral wave dynamics in an excitable cardiac system. *Elife*. 2018; 7: e41076. DOI: 10.7554/eLife.41076.
 37. Cheng Y., Li H., Lei H. et al. Flexible and precise control of cardiac rhythm with blue light. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 514 (3): 759–764. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.035.
 38. Quiñonez Uribe R.A., Luther S., Diaz-Maue L., Richter C. Energy-reduced arrhythmia termination using global photostimulation in optogenetic murine hearts. *Front. Physiol.* 2018; 9: 1651. DOI: 10.3389/fphys.2018.01651.
 38. Zhang H., Cohen A.E. Optogenetic approaches to drug discovery in neuroscience and beyond. *Trends Biotechnol.* 2017; 35 (7): 625–639. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.04.002.
 39. Kielbus M., Czapinski J., Odrzywolski A. et al. Optogenetics in cancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2018; 13 (5): 459–472. DOI: 10.1080/17460441.2018.1437138.
 40. Sahel J.-A., Roska B. Gene therapy for blindness. *Ann. Rev. Neurosci.* 2013; 36: 467–488. DOI: 10.1146/annurev-neuro-062012-170304.

Сведения об авторах

Сорокина Лея Евгеньевна, студент, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-1862-6816.

Петренко Виталина Игоревна, аспирант, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0001-9451-1757.

Субботкин Михаил Владимирович, студент, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-0521-0619.

Куланова Алина Алексеевна, студент, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0001-7553-5382.

Кучеренко Александр Сергеевич, аспирант, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-5861-190X.

Кубышкин Анатолий Владимирович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-1309-4005.

Фомочкина Ирина Ивановна, д-р мед. наук, профессор, кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0003-3065-5748.

Номеровская Александра Юрьевна, ассистент, кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинской академии имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-8247-4773.

Халилов Сервер Искандарович, аспирант, кафедра общей физики, Физико-технический институт, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-1682-9441.

(✉) **Сорокина Лея Евгеньевна**, e-mail: leya.sorokina@mail.ru.

Поступила в редакцию 20.07.2019

Подписана в печать 25.12.2019

УДК 616.12-003.821-07:616-006.48
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-204-207>

Клинический случай амилоидоза сердца, ассоциированного с миеломной болезнью

Цой Е.И., Роговская Ю.В., Демьянов С.В., Рябов В.В.

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

РЕЗЮМЕ

Данный клинический случай демонстрирует сложность своевременной прижизненной диагностики амилоидоза сердца и подбора адекватной медикаментозной терапии, что связано не только с ограниченными возможностями установления точного диагноза и отсутствия в большинстве случаев специфического лечения, но и с поздним обращением пациентов за медицинской помощью. Таким образом, разработка и усовершенствование неинвазивных скрининговых методов обследования позволят выявлять патологию на более ранних этапах с возможностью подбора эффективных препаратов, а в ряде случаев – трансплантации сердца.

Ключевые слова: амилоидоз, миеломная болезнь, рестриктивная кардиомиопатия, эндомиокардиальная биопсия.

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: Цой Е.И., Роговская Ю.В., Демьянов С.В., Рябов В.В. Клинический случай амилоидоза сердца, ассоциированного с миеломной болезнью. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 204–207. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-204-207>.

The clinical case of cardiac amyloidosis associated with multiple myeloma

Tsoi E.I., Rogovskaya Yu.V., Demyanov S.V., Ryabov V.V.

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences
111A, Kievskaya Str., Tomsk, 634012, Russian Federation

ABSTRACT

This clinical case demonstrates the difficulty of timely intravital diagnosis of cardiac amyloidosis and the prescription of adequate drug therapy which is associated not only with the limited possibilities of establishing a correct diagnosis and the absence of specific treatment in most cases, but also with a delay in seeking medical care. Thus, development and improvement of non-invasive screening methods of examination will allow to identify this pathology at earlier stages with a possibility of prescribing effective drugs and performing heart transplantation in some cases.

✉ Цой Екатерина Игоревна, e-mail: haksen_sgmu@mail.ru.

Key words: amyloidosis, multiple myeloma, restrictive cardiomyopathy, endomyocardial biopsy.

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

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

For citation: Tsoi E.I., Rogovskaya Yu.V., Demyanov S.V., Ryabov V.V. The clinical case of cardiac amyloidosis associated with multiple myeloma. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 204–207. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-204-207>.

ВВЕДЕНИЕ

Амилоидоз – группа заболеваний с разнообразными клиническими проявлениями, характеризующаяся внеклеточным отложением нерастворимых патологических фибриллярных белков [1]. Впервые патология была описана Боне в XVII в., в середине XIX в. Р. Вирхов применил термин «амилоид», а в 1937 г. Аткинсон обнаружил амилоидоз у пациентов с миеломной болезнью [1, 2].

В настоящее время известно четыре теории амилоидогенеза: теория локального клеточного генеза G. Teilm, иммунологическая теория Лешке – Леттерера, теория диспротеиноза V. Cagli и мутационная, но ни одна из них не объясняет органоспецифичность и локализованность поражения [3]. Классификация амилоидоза базируется на определении типа амилоида (А) и белка-предшественника (А – амилоидный А-протеин, L – легкие цепи иммуноглобулинов, TTR – транстиретин и др.). Клинически выделяют генерализованные и локальные формы [1, 3]. Наиболее распространенным видом амилоидоза с вовлечением сердца является AL [4]. Различают идиопатический AL амилоидоз и ассоциированный с различными видами моноклональных дискразий плазматических клеток, включая миеломную болезнь и некоторые другие моноклональные гаммапатии [5].

Ввиду поздней манифестации заболевания клинические проявления весьма разнообразны, симулируют под сопутствующую патологию (ишемическая болезнь сердца, болезнь Альцгеймера, почечная недостаточность и др.). Это обуславливает несвоевременную постановку диагноза и отсутствие необходимого лечения, особенно у лиц пожилого и старческого возраста [6, 7]. Так, выделяют часто встречающиеся симптомы: пониженное артериальное давление с синкопальными состояниями, хроническая сердечная недостаточность с признаками застоя в обоих кругах кровообращения, кардиалгии [7].

Наряду с рутинными методами исследования внедрение неинвазивных скрининговых методов speckle tracking, эхокардиографии и магнитно-резонансной томографии сердца позволило чаще выявлять случаи амилоидоза [8, 9].

Сегодня активно разрабатываются способы определения биомаркеров амилоидоза в периферической крови. Эндомиокардиальная биопсия с последующим гистохимическим исследованием является единственным методом определения вида амилоидоза, что позволяет назначить своевременную адекватную медикаментозную терапию [10]. Ниже представлен клинический случай амилоидоза сердца, ассоциированный с миеломной болезнью и подтвержденный морфологическим исследованием.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациентка С., 67 лет, госпитализирована в отделение неотложной кардиологии НИИ кардиологии Томского НИМЦ 12.12.2017 с жалобами на одышку смешанного характера при интенсивной физической нагрузке, купирующуюся покоем. Тиреоидэктомия по поводу диффузного токсического зоба проведена в 2007 г., эутиреоз (L-тироксин 100 мкг). Эпизоды неритмичного сердцебиения, фибрилляция предсердий не регистрировались. Алопеция в течение 3 лет. Хронический бронхит. Потеря массы тела на 13 кг за последние 6 мес.

В анамнезе: 11.2017 экстренно госпитализировалась в районную больницу с подозрением на острый коронарный синдром с атипичной клиникой и снижением вольтажа QRS комплексов на электрокардиограмме (ЭКГ). Лабораторная диагностика не подтвердила инфаркт миокарда, но по результатам эхокардиографии (ЭхоКГ) выявлены гипокинезы нижних сегментов. Состояние осложнилось отеком легких, двусторонним гидротораксом, хронической сердечной недостаточностью ПБ.

Стандартное медикаментозное лечение не приводило к положительной динамике, пациентка переведена в НИИ кардиологии. Отклонения в показателях крови, мочи представлены в табл. 1, данные ЭхоКГ – в табл. 2, ультразвукового исследования почек – в табл. 3. Объективно: АД 90/60 мм рт. ст., гепатомегалия, отеки голеней. На ЭКГ синусовая тахикардия

(частота сердечных сокращений 104 уд./мин), снижение вольтажа зубцов комплекса QRS. В лабораторных анализах – данные за миеломную болезнь. С целью верификации ранее диагностированного инфаркта миокарда выполнена инвазивная коронарная ангиография, венечного атеросклероза не выявлено. Учитывая имеющийся рестриктивный паттерн трансмитрального кровотока и структурного состояния левого желудочка, незначительный ответ на медикаментозное лечение, заподозрена болезнь накопления. Проведена магнитно-резонансная томография, которая позволила визуализировать как ишемическое, так и неишемическое (амилоидоз/гликогеноз) повреждения на фоне дистрофии миокарда (рис.). Была выполнена эндомикардиальная биопсия правого желудочка: ШИК-позитивная субстанция в интерстиции и эндокарде, определяются отложения амилоида.

На основании всех данных удалось верифицировать диагноз вторичного амилоидоза сердца, вероятно AL типа, ассоциированного с миеломной болезнью. На фоне терапии бета-адреноблокатором, ингибитором ангиотензин-превращающего фермента, диуретиками гидроторакс купирован, сохранялась стойкая гипотония, выраженная слабость, инсомния, отсутствие аппетита. Пациентка была переведена в отделение нефрологии и хронического гемодиализа, где выполнялась трепанобиопсия костного мозга, подтверждена миеломная болезнь и амилоидоз почек. Гидроторакс и гидроперикард в палате интенсивной терапии рецидивировали, нарастала слабость, кахексия, гипотония, рецидивировал отек легких. Больная умерла 08.01.2018.

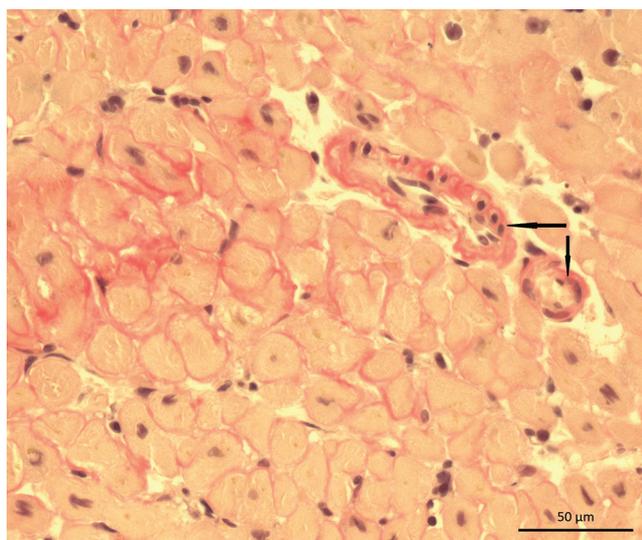


Рисунок. Биопсия миокарда

Таблица 1

Анализ крови и мочи		
Показатель	Данные на 12.12.2017	Норма
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,8	4,0–9,0
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,03	3,9–4,7
Гемоглобин, г/л	163	120–140
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	6	2–20
Креатинфосфокиназа-МВ, ед/л	22	0–25
Креатинин, мкмоль/л	72	53–97
Мочевина, ммоль/л	5,9	2,2–7,2
Холестерин, ммоль/л	5,9	3,5–5,2
Общий белок, г/л	49	64–83
С-реактивный белок, мг/л	4,0	0–10,0
Калий, ммоль/л	3,8	3,5–5,1
Лейкоциты в п/зр	10–12	0–3
Белок в моче, г/л	5	0–0,08
Белок Бенс – Джонса	+++	–
Суточная экскреция белка, г/сут	4,98	0–0,14

Таблица 2

Эхокардиографическое исследование		
Показатель	Данные на 12.12.2017	Норма
Левое предсердие, мм	50 × 64	43 × 49
Правое предсердие, мм	47 × 61	43 × 49
Объем левого предсердия, мл	100,8	20–59
Объем правого предсердия, мл	97	19–64
Конечно-диастолический размер левого желудочка, мл	41	50–112
Конечно-систолический размер левого желудочка, мл	18	12–41
Конечно-диастолический размер правого желудочка, мм	33	36–51
Конечно-систолический размер правого желудочка, мм	21	21–34
Фракция выброса левого желудочка (В), %	60	55–78
Ударный объем левого желудочка, мл	27	39–74
Сердечный индекс, л/мин/м ²	1,9	1,7–4,5
Межжелудочковая перегородка, мм	16	6,4–9,2
Задняя стенка левого желудочка, мм	16	6,4–9,2
Масса миокарда, г	200	Менее 146
Индекс массы миокарда, г/м ²	136	44–100
Систолическое давление в правом желудочке, мм рт. ст.	52	20–32
Нижняя полая вена, мм	23	<21
Е/А	2	0,62–1,39
Е/е'	21	<8

Таблица 3

Ультразвуковое исследование почек (данные на 18.12.2017)			
Показатель	Справа	Слева	Норма
Длина, мм	107	101	90–120
Ширина, мм	60	52	45–60
Толщина паренхимы, мм	13,7	12	12–20
Киста	12 мм	–	–

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный клинический случай демонстрирует сложность своевременной прижизненной диагностики амилоидоза и подбора адекватной медикаментозной терапии, что связано не только с ограниченными возможностями установления точного диагноза и отсутствия в большинстве случаев специфического лечения, но и с поздним обращением пациентов за медицинской помощью. Таким образом, разработка и усовершенствование неинвазивных скрининговых методов обследования позволят выявлять патологию на более ранних этапах с возможностью подбора эффективных препаратов, а в ряде случаев – трансплантации сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козловская Л.В., Рамеев В.В. Проект клинических рекомендаций по диагностике и лечению системного амилоидоза (AA, AL). *Научное общество нефрологов России*. 2014; 30.
2. Нонка Т.Г., Репин А.Н. Возможности диагностики и лечения амилоидоза сердца. *Клиническая медицина*. 2015; 93 (4): 66–73.
3. Козлов В.А., Сапожников С.П., Шептухина А.И., Голенков А.В. Сравнительный анализ различных моделей амилоидоза. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (1): 5–11. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1225.
4. Martinez-Naharro A., Hawkins P.N., Fontana M. Cardiac amyloidosis. *Clinical Medicine*. 2018; 18 (2): s30–s35. DOI: 10.7861/clinmedicine.18-2s-s30.
5. Смирнова Е.А., Абдурахманова Э.К., Филоненко С.П. Системный ал-амилоидоз: трудности диагноза (обзор литературы и собственные данные). *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2016; 24 (3): 141–153.
6. Козырев К.М., Цуцаев А.К., Козырева С.М., Контаев Р.В., Панагов З.Г., Лалиева З.Э. Структурно-функциональная характеристика сенильной амилоидной кардиопатии и полиорганного амилоидоза (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий*. 2017; 24 (1): 229–236.
7. Благова О.В., Недоступ А.В., Седов В.П., Коган Е.А., Паша С.П., Гагарина Н.В., Алиева И.Н., Седов А.В., Царгородцев Д.А., Куликова В.А., Шепелева Н.Е., Саркисова Н.Д. Клинические маски амилоидоза с поражением сердца: особенности диагностики на современном этапе. *Российский кардиологический журнал*. 2017; 22 (2): 68–79. DOI: 10.15829/1560-4071-2017-2-68-79.
8. Никифоров В.С., Никищенко Ю.В. Современные возможности speckle tracking эхокардиографии в клинической практике. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2017; 13 (2): 248–255. DOI: 10.20996/1819-6446-2017-13-2-248-255.
9. Promislow S.J., Ruddy T.D. The evolving landscape of nuclear imaging in cardiac amyloidosis. *Journal of Nuclear Cardiology*. 2018; 27: 210–214. DOI: 10.1016/j.jcmg.2012.10.006.
10. Luciani M., Troncone L., Monte F.D. Current and future circulating biomarkers for cardiac amyloidosis. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018: 1–9. DOI: 10.1038/aps.2018.38.

Сведения об авторах

Цой Екатерина Игоревна, мл. науч. сотрудник, отделение неотложной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9857-4368.

Роговская Юлия Викторовна, канд. мед. наук, зав. патологоанатомическим отделением, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-5553-7831.

Демьянов Сергей Витальевич, канд. мед. наук, зав. отделением неотложной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-3047-5387.

Рябов Вячеслав Валерьевич, д-р мед. наук, руководитель отделения неотложной кардиологии, НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-4358-7329.

(✉) Цой Екатерина Игоревна, e-mail: haksen_sgmu@mail.ru.

Поступила в редакцию 11.06.2019

Подписана в печать 25.12.2019



Розенштейн Аркадий Зильманович, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ImmunoHealth Int. LLC (New York, USA).

Кондаков Сергей Эмильевич, доктор фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия).

Розенштейн Марина Юозефовна, кандидат медицинских наук, член Американской ассоциации нутрициологов (ANA), ведущий специалист ImmunoHealth Int. LLC (New York, USA).

Черевко Наталья Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры иммунологии и аллергологии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

Основы иммунодиетологии / А.З. Розенштейн, С.Э. Кондаков, М.Ю. Розенштейн, Н.А. Черевко. М.: Техносфера, 2020. – 288 с.

В XXI в средствах массовой информации все чаще звучит тезис, что персонализация питания – основное направление в развитии диетологии и превентивного здравоохранения будущего. Очевидно, что термин «индивидуальный подбор питания» имеет смысл только в применении к каждому индивиду, которому должны быть адресованы рекомендации по точно соответствующему питанию. В руках врача-диетолога (нутрициолога) две методики: одна направлена на подсчет калорийности съеденной пищи, другая – на учет компонентного и нутриентного состава: белков, углеводов, микроэлементов, витаминов и т.д. Для того чтобы решить задачу персонализации питания, авторы предлагают вернуть в диетологию конкретного человека с использованием известного подхода иммунологии – исследования воздействия того или иного пищевого антигена на иммунную систему человека.

Монография представляет собой первую попытку создания научно обоснованной персонализированной системы питания и не претендует на абсолютную истину. Ориентирована на специалиста с медицинским образованием, главным образом на врачей-диетологов, может быть интересна специалистам широкого профиля.