

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Научный медицинский журнал РНИМУ им. Н. И. Пирогова

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Scientific Medical Journal of Pirogov Russian National
Research Medical University

Главный редактор

Editor-in-chief

Денис Ребриков, д. б. н.

Denis Rebrikov, DSc

Заместитель главного редактора

Deputy editor-in-chief

Александр Эттингер, д. м. н.

Alexander Oettinger, DSc

Руководитель редакции

Editorial manager

Елена Куликова

Elena Kulikova

Редакторы

Editors

Екатерина Брюшкова

Ekaterina Bryushkova

Лилия Егорова

Liliya Egorova

Айарпи Ездоглян

Ayarpi Ezdoglyan

Корректор

Proof-reader

Ольга Комар

Olga Komar

Переводчики

Translators

Екатерина Третьякова

Ekaterina Tretiyakova

Дизайн и верстка

Design and layout

Марина Доронина

Marina Doronina

Журнал входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК.

Журнал доступен в Google Scholar.

ИФ РИНЦ 2014: 0,139.

Номер подписан в печать 30.12.2016

Адрес редакции: 117997, г. Москва,
ул. Островитянова, д. 1.

Поддача рукописей: editor@vestnikrgmu.ru

Сотрудничество: manager@vestnikrgmu.ru



Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International
www.creativecommons.org

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Подписной индекс по каталогу «Роспечать»: 46826

Отпечатано в типографии «Print.Formula»
www.print-formula.ru

Редакционная коллегия

Editorial board

М. Р. Богомильский, член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор. (Москва, Россия)

Bogomilskiy MR, corresponding member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)

Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)

Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)

Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)

А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

В. Г. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Danilenko VG, DSc, professor (Moscow, Russia)

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

А. А. Иванов, к. м. н. (Москва, Россия)

Ivanov AA, CSc (Moscow, Russia)

Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Н. В. Полунина, член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Polunina NV, corresponding member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Г. В. Порядин, член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Poryadin GV, corresponding member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

В. Ф. Семиглазов, член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербурге, Россия)

Semiglazov VF, corresponding member of RAS, DSc, professor (Saint-Peterburg, Russia)

Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

В. А. Степанов, член-корреспондент РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)

Stepanov VA, corresponding member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)

Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Н. Л. Шимановский, член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Shimanovskii NL, corresponding member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)

Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОР	Трансляционная медицина: нетранслируемые области и СТОП-кодоны Д. В. Ребриков, В. В. Тарасов Translational medicine: untranslated regions and the stop codons Rebrikov DV, Tarasov VV	4
СТАТЬЯ	Анализ влияния мельдония на каталитическую активность цитохрома P450 3A4 А. В. Кузиков, Т. В. Булко, Р. А. Масамрех, А. А. Махова, А. И. Арчаков, С. А. Усанов, Е. В. Ших, В. В. Шумянцева Analysis of mildronate effect on the catalytic activity of cytochrome P450 3A4 Kuzikov AV, Bulko TV, Masamrekh RA, Makhova AA, Archakov AI, Usanov SA, Shich EV, Shumyantseva VV	10
МЕТОД	Количественное определение йода при помощи рентгеновской компьютерной томографии для дозиметрического обеспечения фотон-захватной терапии А. А. Липенгольц, Ю. А. Будаева, М. Блайкнер, А. А. Черепанов, М. А. Меньков, В. Н. Кулаков, Е. Ю. Григорьева Iodine quantification with computed tomography for the purpose of dose assessment in contrast enhanced radiotherapy Lipengolts AA, Budaeva JA, Blaikner M, Cherepanov AA, Menkov MA, Kulakov VN, Grigorieva EYu	16
СТАТЬЯ	Частота носительства в российской популяции мутаций в генах GJB2 и GALT, ассоциированных с развитием нейросенсорной тугоухости и галактоземии Д. Д. Абрамов, М. В. Белоусова, В. В. Кадочникова, А. А. Рагимов, Д. Ю. Трофимов Carrier frequency of GJB2 and GALT mutations associated with sensorineural hearing loss and galactosemia in the Russian population Abramov DD, Belousova MV, Kadochnikova VV, Ragimov AA, Trofimov DYU	21
СТАТЬЯ	Критерии отбора генетических маркеров для анализа предрасположенности к многофакторным фенотипическим особенностям И. И. Низамутдинов, Д. О. Коростин, В. В. Ильинский, А. С. Ракитько Criteria for the selection of genetic markers in the assessment of predisposition to multifactorial traits Nizamutdinov II, Korostin DO, Il'inskii VV, Rakitko AS	25
СТАТЬЯ	Возможности ядерной медицины в диагностике ангиопатий почек и сердца у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и нарушением толерантности к глюкозе Д. С. Харина, Т. А. Полетаева, А. К. Кондаков, Д. Ю. Мосин, И. А. Знаменский Nuclear medicine in the diagnosis of renal and coronary angiopathies in patients with type 2 diabetes and impaired glucose tolerance Kharina DS, Poletaeva TA, Kondakov AK, Mosin DYU, Znamensky IA	33
СТАТЬЯ	Динамика функциональной активности тиреоцитов при изменении морфофункционального состояния тучных клеток щитовидной железы под воздействием инфракрасного лазерного излучения И. В. Смелова, Е. С. Головнева Dynamics of functional activity of thyrocytes in the setting of changing morphofunctional activity of mast cells of the thyroid gland upon infrared laser therapy Smelova IV, Golovneva ES	39

СТАТЬЯ	Особенности клинико-лабораторной диагностики нарушений в системе гемостаза у пациентов с окклюзией вен сетчатки Т. В. Шелковникова, Х. П. Тахчиди, А. Н. Волков, Н. Ю. Шишлянникова Clinical and laboratory features of hemostatic disorders in patients with retinal vein occlusion Shelkovnikova TV, Takhchidi KhP, Volkov AN, Shishlyannikova NYu	45
СТАТЬЯ	Краденая наука: почему плагиат и самоплагиат неприемлемы Е. Ю. Куликова Stolen science: why plagiarism and self-plagiarism are unacceptable Kulikova EYu	50

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ МЕДИЦИНА: НЕТРАНСЛИРУЕМЫЕ ОБЛАСТИ И СТОП-КОДОНЫ

Д. В. Ребриков¹✉, В. В. Тарасов²

¹ НИИ трансляционной медицины,

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Институт фармации и трансляционной медицины,

Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

Медицина 4П невозможна без эффективного перевода на медицинские рельсы новейших лабораторных технологий, таких как регенеративные клеточные технологии, высокопроизводительное секвенирование, редактирование генома и др. Трансляционная медицина — новое научное направление, призванное сократить сроки перевода достижений длительных фундаментальных научных исследований в прикладные разработки инновационного продукта. Однако на пути внедрения инноваций в медицину есть ряд естественных барьеров, не позволяющих пройти в практику небезопасным и неэффективным разработкам. Система этих барьеров должна быть динамичной и отвечающей требованиям времени. Так же, как и система подготовки кадров для работы на стыке «наука–медицина».

Ключевые слова: трансляционная медицина, инновации, доклинические исследования, клинические исследования

✉ **Для корреспонденции:** Ребриков Денис Владимирович
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; drebrikov@gmail.com

Статья получена: 20.12.2016 **Статья принята в печать:** 24.12.2016

TRANSLATIONAL MEDICINE: UNTRANSLATED REGIONS AND THE STOP CODONS

Rebrikov DV¹✉, Tarasov VV²

¹ Research Institute of Translational Medicine,

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Institute of Pharmacy and Translational Medicine,

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

4P medicine is impossible without an efficient transfer of advanced laboratory techniques (such as regenerative cell technology, high-throughput sequencing, genome editing, etc.) into clinical practice. Translational Medicine - a new scientific field, designed to reduce the time of transfer of long-term achievements of fundamental scientific research in the development of innovative product applications. However, on the path of innovation in medicine, there are a number of natural barriers that do not allow to go to practice unsafe and ineffective products. The system of these barriers must be dynamic and up-to-date. As well as the education system for work at the "science–medicine" junction.

Keywords: translational medicine, innovations, preclinical trials, clinical trials

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis Rebrikov
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; drebrikov@gmail.com

Received: 20.12.2016 **Accepted:** 24.12.2016

Нужно бежать со всех ног, чтобы только оставаться на месте, а чтобы куда-то попасть, надо бежать как минимум вдвое быстрее!

Королева из «Алисы в Зазеркалье», Льюис Кэрролл

Посмотрите на темы Нобелевских премий по химии и физиологии за последние 30 лет: с огромным отрывом лидируют тематики по молекулярной и клеточной биологии в их медицинском применении (как известно, Нобелевской премии по биологии не существует). Больше половины статей в журналах Nature и Science — это работы в области молекулярной и клеточной биологии.

После того, как человечество более или менее разобралось с устройством атомов и молекул, оно решило всерьез заняться их второй производной: живыми системами. Сегодня в понимании устройства живых систем происходит научная революция, становятся понятны свя-

зи элементов системы на фундаментальном уровне организации живой материи. И это понимание дает нам новые возможности в области сохранения здоровья человека и продления его жизни.

Современная медицина базируется на принципах 4П: предсказательная, профилактическая, персонализированная, при участии пациента.

Одна из важнейших составляющих медицины 4П — прорывные открытия и достижения последних десятилетий в области генетики, геномики, транскриптомики, протеомики, молекулярной биологии, геномной и белковой инженерии. Развитие медицинских технологий в области

генетики и геномики позволяет с высокой точностью предсказывать проявления тех или иных заболеваний (как наследственных моногенных, так и мультифакторных заболеваний с генетическим вкладом). Удешевление диагностических подходов уже сегодня позволяет запустить программу скрининга населения с целью снижения доли вредоносных вариантов генов в человеческой популяции. Но переход к функционированию медицины 4П невозможен без перевода на медицинские рельсы новейших лабораторных технологий, таких как регенативные клеточные технологии, высокопроизводительное секвенирование, редактирование генома и др.

Однако переход любого открытия из научно-исследовательской лаборатории в клинику требует тщательной проверки эффективности и безопасности изобретения. История медицины знает массу случаев, когда поспешное внедрение новой технологии или фармацевтического препарата приводило к катастрофе (вспомним хотя бы историю с талидомидом; [1], рис. 1). Поэтому на фоне ускорения темпов развития науки система внедрения инноваций в практическое здравоохранение требует особого подхода: специально разрабатываемой и динамично меняющейся области трансляционной медицины.

Что такое трансляционная медицина?

Трансляционная медицина — новое научное направление, призванное сократить и в идеале ликвидировать существующий разрыв между научными изобретениями и повседневной медицинской практикой [2]. В соответствии с основными принципами трансляционной медицины выделяются три фазы трансляционных исследований (рис. 2) [3].

Первая фаза — это клинические исследования, трансляция научных открытий в клиническую практику в конт-

ролируемых условиях. Определение потребности в изучаемых методах диагностики и лечения, оценка эффективности и безопасности разработок. Вторая фаза — оценка возможности использования разработок в клинической практике с участием пациентов, в реальных социальных условиях. Третья фаза — внедрение результатов клинических исследований в систему здравоохранения.

Успех трансляции фундаментальной разработки в прикладную (клиническую) практику, во многом определяется решением задачи масштабирования научных исследований, использованием высокотехнологичных методов, привлечением финансовой поддержки государства и частных инвесторов, разработкой необходимых законодательных и правовых актов, этических норм с учетом достижений трансляционной медицины.

Создание государственных институтов развития трансляционной медицины пришлось на 2000-е гг., и к настоящему моменту они учреждены в том или ином виде в США, ведущих европейских странах, Китае и России [4]. Ожидается отмечен рост числа научных публикаций в области трансляционной медицины: анализ базы данных Web of Science показал, что в 1993 г. было опубликовано всего 5 «трансляционных» работ, а в 2011 г. — уже 1 500 [4].

Трудности перевода

На пути из лаборатории к постели больного (bench-to bedside medicine) любой разработке приходится преодолевать барьеры разной степени сложности, для чего требуется создание новых технологий, позволяющих более точно предсказывать эффективность и безопасность новых соединений и препаратов и повышать качество доклинических и клинических исследований. Также требуется создание новых сервисов и программ, обеспечивающих более широкое сотрудничество между государственными,



Рис. 1. Талидомид — седативное снотворное лекарственное средство, прием которого беременными женщинами привел к рождению нескольких тысяч детей с врожденными уродствами. На снимке — ребенок, рожденный в 1963 г. (фото: The Age)

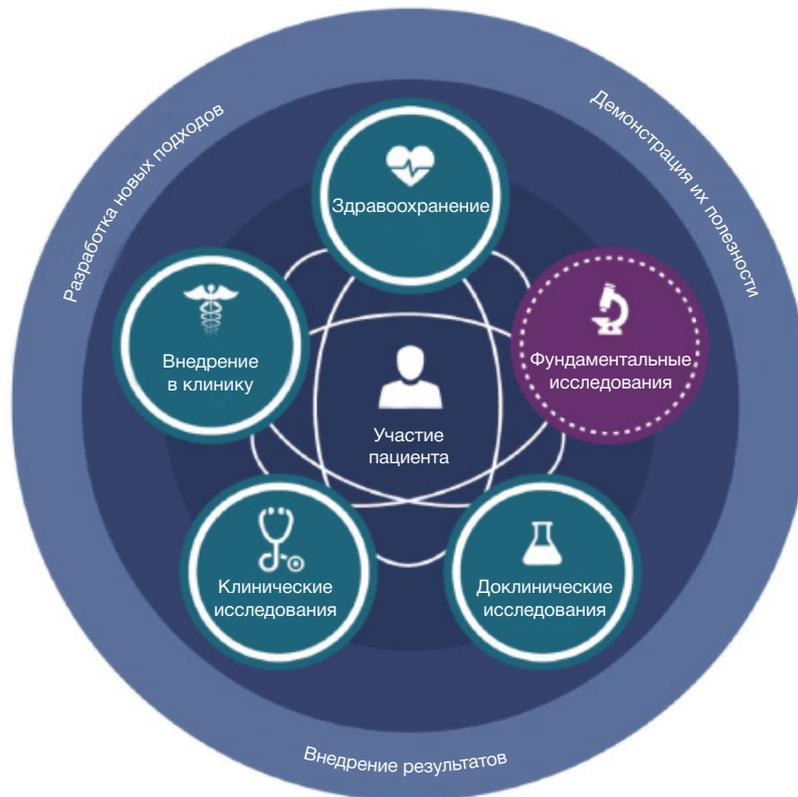


Рис. 2. Система трансляционной медицины, предложенная Национальным центром передовых трансляционных технологий США [3]

коммерческими и некоммерческими организациями и большую доступность и прозрачность новых данных для всех исследователей, работающих в области трансляций изобретений.

По результатам испытаний приходится отказываться от более чем 80 % (в зависимости от области исследований) кандидатов в препараты приходится отказываться по результатам испытаний, и только один из 20 препаратов, достигших этапа клинических испытаний, успешно их проходит [5]. Современные концепции проверки безопасности новых фармацевтических препаратов предусматривают повышение эффективности проведения испытаний на токсичность и снижение использования животных за счет перехода к тестам *in vitro*. Ключевым направлением развития доклинических исследований являются системы анализа на клеточных линиях с использованием роботизированного высокопроизводительного скрининга с автоматизированной оценкой количественных параметров. Создание биологических моделей *in silico* позволяет тестировать эффекты доза–реакция, строить фармакокинетические модели для конкретных условий среды. Подобные компьютерные системы повышают предсказательную способность результатов испытаний при их переходе в стадию клинических испытаний (в сравнении с традиционными токсикологическими стратегиями) [5, 6].

Государственные научные центры и частные фармацевтические компании всегда сотрудничали, так как исследователи заинтересованы в финансировании своей работы, а производители — в создании новых эффективных препаратов за как можно более короткий срок при как можно меньших затратах. Однако в последние годы это сотрудничество приобретает новый характер, связанный с «персонализированным» подходом к разработкам и доступом научных центров к резко возросшему объему цифровых данных о пациентах по всему миру,

в первую очередь в США [7]. Создание и развитие баз данных с различной информацией о большом числе пациентов открывает широкие возможности для повышения качества доклинических и клинических испытаний (рис. 3) и одновременно требует повышения их доступности для исследователей по всему миру для уточнения и контроля качества информации, представленной в базах данных.

На пути внедрения инноваций в медицину некоторые барьеры вполне естественны, так как не позволяют пройти в практику небезопасным и неэффективным разработкам. Но, как следствие, именно эти барьеры и являются главным тормозом в движении разработки к практическому использованию [8, 9]. Целью системы трансляционной медицины является в первую очередь оптимизация алгоритмов внедрения и динамичное изменение законодательной базы. Барьеры должны быть строго определенной высоты: не выше необходимого.

Глобализация привела к тому, что новые разработки распространяются по миру буквально со скоростью света. Перспективная медицинская технология, где бы она ни была создана, неизбежно находит развитие и используется в первую очередь в странах с более гибким или либеральным законодательством. Такие государства получают «фору» от раннего внедрения инновационных подходов даже с учетом рисков, заключенных в нем. Жесткие законодательные ограничения перехода «наука–медицина» в отдельных странах ведут к потере ими соответствующего рынка.

В качестве примера такой конкуренции можно привести ситуацию, когда в течение нескольких лет регуляторы в США и Великобритании запрещали работу исследователей в области редактирования генома человеческих эмбрионов новым методом геномного редактирования CRISPR/Cas9. Однако после выхода в 2015 г. работы китайских авторов по редактированию генома эмбрионов

человека этим методом, уже в феврале 2016 г. группе британских ученых было дано разрешение на генетическую модификацию человеческих эмбрионов с помощью CRISPR/Cas9 и родственных методов «дизайнерских» нуклеаз [10]. Общественное мнение на фоне внедрения технологий в отдельных юрисдикциях быстро меняется и начинает давить на собственное законодательное регулирование.

Отдельным сегментом системы являются этические аспекты применения новейших разработок (особенно в области изменения генома человека) [11]. В рамках работы этических комитетов и уполномоченных государственных органов необходимо фиксировать и уточнять аспекты, оказывающие влияние на клиническую реализацию новейших технологий.

Структурный разрыв

В России ситуация для развития трансляционных технологий далеко не во всем благоприятна. Так, после принятия федеральных законов «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 № 323-ФЗ и «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части противодействия обороту фальсифицированных, контрафактных, недоброкачественных и незарегистрированных лекарственных средств, медицинских изделий и фальсифицированных биологически активных добавок» от 31.12.2014 № 532-ФЗ стало невозможно (или возможно с задержкой в 3–5 лет!) использовать в клинической практике большинство созданных в рамках грантов и государственных заданий инновационных медицинских методик и оборудования.

В законодательной ловушке оказались 1) тесты на редкие заболевания, для диагностики и лечения которых

серийный выпуск и регистрация медицинских изделий нецелесообразны с экономической точки зрения и 2) инновационные технологии в первые годы их практического применения, когда их эффективность, безопасность и клиническая значимость уже доказаны, но серийный выпуск и регистрация как медицинских изделий еще не завершены (обычно этот период составляет около 5 лет). При этом выход таких разработок на рынок может сдерживаться и отсутствием коммерческой заинтересованности фирм-производителей регистрировать в данной юрисдикции изделие как медицинское.

В то же время в большинстве стран мира, таких как США, страны ЕС и Австралия, оборот серийно-выпускаемых коммерческих медицинских изделий и осуществление медицинской лабораторной деятельности регулируются отдельно. При этом допускается выполнение медицинских исследований с использованием незарегистрированных расходных материалов и/или оборудования при соблюдении учреждениями здравоохранения установленных правил и требований.

Лабораториям, соответствующим определенным требованиям и контролируемым уполномоченными органами, в этих странах разрешается использование тестов, разработанных в самой лаборатории (так называемые LDT — Laboratory Developed Tests в США или «in-house»/«home brew» тесты в Европе и Австралии) либо адаптированных для клинического использования оборудования/расходных материалов научного назначения (так называемые IVD-RUO тесты). При этом даже существующие зарубежные аналоги медицинских изделий, применяемые в клинической практике, не всегда доступны для российского рынка из-за ценовых ограничений, политики иностранных фармкомпаний и действующих запретов на государственных уровнях.

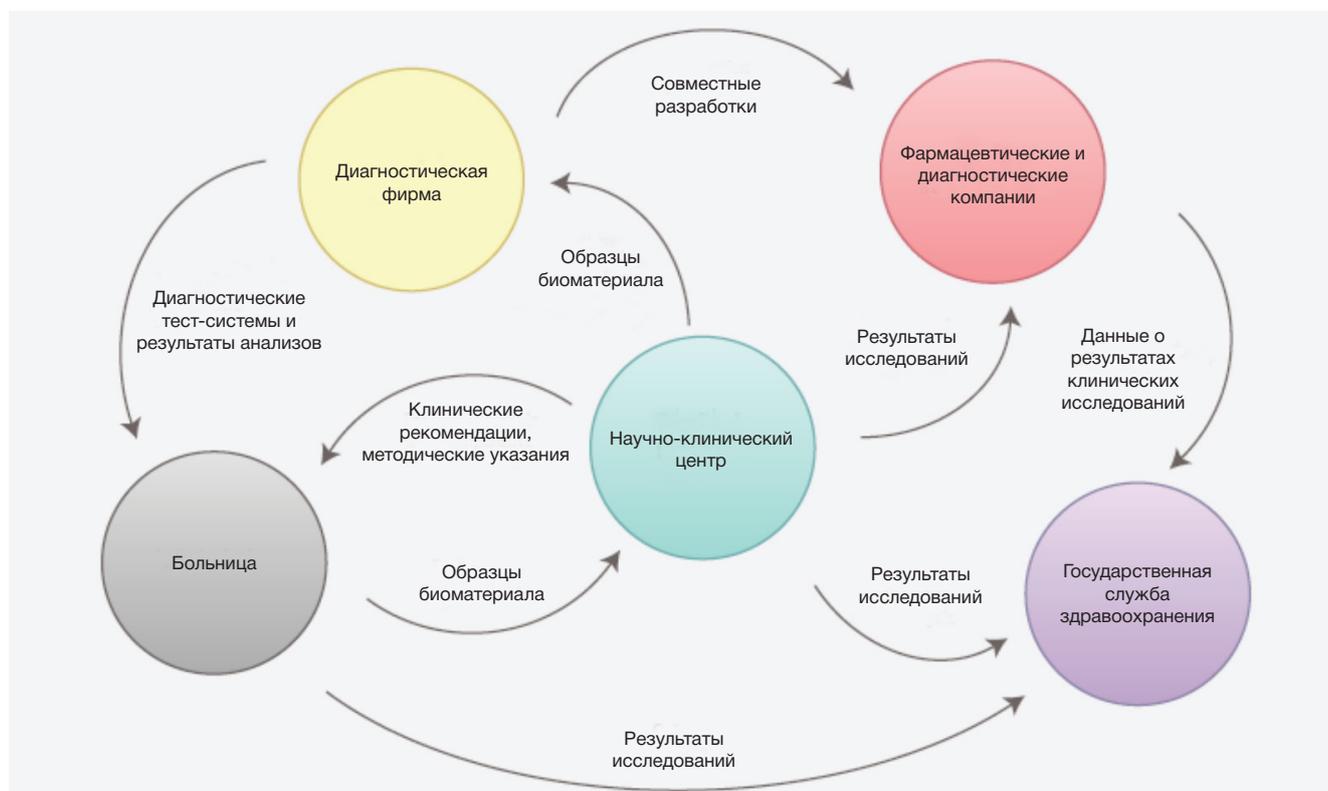


Рис. 3. Возможности сотрудничества государственных научных центров и частных фармацевтических компаний значительно расширяются в контексте создания исследователями баз данных с различной информацией о большом числе пациентов [7]

Трансляционные оффшоры

По трудности перехода «наука–медицина» отличаться могут не только законодательства разных стран, но и административные секторы внутри одной юрисдикции. Так, принятие федерального закона «О международном медицинском кластере и внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» от 29.06.2015 № 160-ФЗ создало парадоксальную ситуацию, когда ни одно российское учреждение здравоохранения, включая учреждения федерального и национального уровней, не имеет права заниматься медицинской деятельностью с использованием незарегистрированных в установленном порядке инновационных технологий и оборудования, тогда как коммерческие компании с иностранным участием (из-за различий в национальном и зарубежном) фактически имеют эту возможность на территории Российской Федерации.

Возможно, такие «оффшоры» (как, например, «Сколково») станут пионерами внедрения медицинских инноваций и дадут возможность остальным учреждениям здравоохранения перенимать апробированные и зарегистрированные технологии. Но в ситуации «одним всё, другим ничего» есть риск разбалансировки системы и невозможности создать по настоящему эффективное «трансляционное пространство».

Медицинское образование

Ускорение предполагает и смену концепции преподавания в области медицины. В качестве примера можно привести Международную школу персонализированной и трансляционной медицины (МШПГПТМ), созданную в Первом Московском государственном медицинском университете имени И. М. Сеченова для решения задач ускоренного внедрения фундаментальных достижений в поиск эффективных и безопасных методов профилактики, диагностики и лечения на основе персонализированного подхода и учета индивидуальных особенностей пациента. Одним из направлений деятельности Школы является реализация новой модели медицинского и фармацевтического образования. В условиях инновационной трансформации здравоохранения и перехода к персонализированной и трансляционной медицине особая роль принадлежит фармацевтической отрасли, призванной обеспечить ускоренное внедрение полного цикла обращения лекарственного средства от поиска и разработки до применения и продвижения. Для решения этих задач в структуре МШПГПТМ в 2016 году создан Институт фармации и трансляционной медицины. Целью деятельности Института является формирование эффективной научно-образовательной среды, способной создавать инновационные биомедицинские продукты и проводить полный комплекс исследований на всех этапах их жизненного цикла с глубокой интеграцией научно-практических достижений в образовательный процесс для подготовки высококвалифицированных специалистов и исследовательских кадров мирового уровня для фармацевтической отрасли. В области научных исследований Институт реализует принцип «полного цикла» разработки биомедицинских продуктов, от развития фундаментальной идеи, проведения прикладных и трансляционных исследований до внедрения в практику и постмаркетинговых исследований. Для этого проводятся исследования по разработке научных, научно-методических основ и базовых

принципов создания эффективных и безопасных биомедицинских продуктов.

Институтом осуществляется подготовка специалистов, способных выполнять трансляционные исследования всех уровней. Впервые в фармацевтическом образовательном пространстве России Институтом фармации и трансляционной медицины в сотрудничестве с ключевыми партнерами стартовала инновационная образовательная программа «Фармация», направленная на подготовку специалистов и исследовательских кадров нового поколения для работы в различных областях биофармацевтической промышленности. Обучающиеся получают углубленные знания в области молекулярной и клеточной биологии, медицинской генетики, биоинформатики, фармацевтической разработки лекарственных препаратов, на практике осваивают принципы надлежащих практик (лабораторная, производственная, клиническая и т. д.), регуляторные вопросы в создании и продвижении биомедицинской продукции. Студенты получают теоретические знания и практические навыки от лучших ученых и специалистов-практиков из фармацевтической отрасли. Обязательным компонентом освоения образовательной программы является участие в международных конференциях, симпозиумах, стажировках в ведущих университетах мира, международных и российских фармацевтических компаниях, предусмотрены меры грантовой поддержки. Важной составляющей обучения является выполнение всеми студентами программы дипломной работы в лабораториях Института и организаций-партнеров, в рамках которой будущий специалист должен на практике освоить полученные знания и навыки и получить дополнительные компетенции в рамках выбранного им направления деятельности. Институт формирует партнерские отношения и обеспечивает совместную реализацию проектов с частными и государственными организациями. Развивает систему коммерциализации инновационных продуктов, новых оригинальных авторских программ и услуг, отвечающих современным научным вызовам, разработанных в партнерстве с ведущими российскими и зарубежными фармацевтическими компаниями и другими высокотехнологичными и исследовательскими организациями. Партнерами Института в научной, образовательной и других видах деятельности являются: Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, МБЦ «Генериум», Институт проблем химической физики РАН, ФГУП «Московский эндокринный завод», АО «Рафарма», ООО «Ригла», АО «Р-Фарм», Университет «ИТМО» и другие.

Другим примером интеграции медицинских инноваций и сферы образования служит созданный в 2014 году на базе Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Научно-исследовательский институт трансляционной медицины (НИИТМ). Инновационная деятельность НИИТМ была положена в основу организованного в 2015 году Московского кластера медицинских технологий «Южный», объединившего Технопарк «Слава», 2 ВУЗа, 8 НИИ, 4 клиники и более 30 инновационных биотехнологических компаний. На сегодняшний день в рамках Кластера реализуется более 20 проектов по разработке медицинских изделий, создан центр прототипирования, реализовано взаимодействие с Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. В Медтехкластере «Южный» отстроена вся цепочка запуска инновационной разработки: от студенческой идеи, через программу «Умник» и центр прототипирования к внедрению в серийное

производство на базе малых и средних предприятий Технопарка «Слава» и партнёров Кластера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с изложенным и в целях создания условий для получения российскими гражданами необходимой медицинской помощи на самом современном уровне развития науки и техники, а также предотвращения отставания

России от мирового уровня в области инновационной медицины, полагаем необходимым внести поправки в законодательство, в частности, в ст. 38 Федерального закона № 323-ФЗ от 21.11.2011 в части снятия ограничений на применение медицинскими учреждениями медицинских изделий, не имеющих государственной регистрации, при условии установления особых требований к системе внутреннего контроля в организации, схожих с общемировыми системами LDT и IVD-RUO (в частности, на уровне локального этического комитета и ученого совета).

Литература

1. Kowalski TW, Sanseverino MT, Schuler-Faccini L, Vianna FS. Thalidomide embryopathy: Follow-up of cases born between 1959 and 2010. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015 Sep; 103 (9): 794–803. DOI: 10.1002/bdra.23376.
2. Шляхто Е. В. Трансляционные исследования как модель развития современной медицинской науки. *Трансляционная медицина*. 2014; (1): 5–18.
3. National Center for Advancing Translational Sciences [Интернет]. Bethesda, MD, USA: NCATS; [дата обновления: 22 декабря 2016 г.; дата обращения: декабрь 2016 г.]. *Translational Science Spectrum*; [2 стр.]. Доступно по ссылке: <https://ncats.nih.gov/translation/spectrum>.
4. Yao Q, Lyu PH, Ma FC, Yao L, Zhang SJ. Global infometric perspective studies of translational medicine. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2013; 13: 77. DOI: 10.1186/1472-6947-13-77.
5. Roviда C, Asakura S, Daneshian M, Hofman-Huether H, Leist M, Meunier L, et al. Toxicity Testing in the 21st Century Beyond Environmental Chemicals. *ALTEX*. 2015; 32 (3): 171–81. DOI: 10.14573/altex.1506201.
6. Krewski D, Acosta D Jr., Andersen M, Anderson H, Bailar JC, Boekelheide K, et al. Toxicity Testing in the 21st century: A Vision and A Strategy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2010 Feb; 13 (0): 51–138. DOI: 10.1080/10937404.2010.483176.
7. New Saviour. 2011. Доступно по ссылке: <http://www.samedanltd.com/magazine/13/issue/156/article/2997>.
8. Westfall JM, Mold J, Fagnan L. Practice-based research — «Blue Highways» on the NIH roadmap. *JAMA*. 2007; 297 (4): 403–6.
9. Trochim W, Kane C, Graham MJ, Pincus HA. Evaluating translational research: a process marker model. *Clin Transl Sci*. 2011; 4 (3): 153–62.
10. Knapton S. British scientists granted permission to genetically modify human embryos. *The Daily Telegraph*. 2016 Feb 1.
11. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015 Apr 3; 348 (6230): 36–3. doi: 10.1126/science.aab1028.

References

1. Kowalski TW, Sanseverino MT, Schuler-Faccini L, Vianna FS. Thalidomide embryopathy: Follow-up of cases born between 1959 and 2010. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015 Sep; 103 (9): 794–803. DOI: 10.1002/bdra.23376.
2. Shlyakhto EV. [Translational research as a model of progress in current medical science]. *Translational Medicine*. 2014; (1): 5–18. Russian.
3. National Center for Advancing Translational Sciences [Internet]. Bethesda, MD, USA: NCATS; [updated 2016 Dec 22; cited 2016 Dec.]. *Translational Science Spectrum*; [about 2 screens]. Available from: <https://ncats.nih.gov/translation/spectrum>.
4. Yao Q, Lyu PH, Ma FC, Yao L, Zhang SJ. Global infometric perspective studies of translational medicine. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2013; 13: 77. DOI: 10.1186/1472-6947-13-77.
5. Roviда C, Asakura S, Daneshian M, Hofman-Huether H, Leist M, Meunier L, et al. Toxicity Testing in the 21st Century Beyond Environmental Chemicals. *ALTEX*. 2015; 32 (3): 171–81. DOI: 10.14573/altex.1506201.
6. Krewski D, Acosta D Jr., Andersen M, Anderson H, Bailar JC, Boekelheide K, et al. Toxicity Testing in the 21st century: A Vision and A Strategy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2010 Feb; 13 (0): 51–138. DOI: 10.1080/10937404.2010.483176.
7. New Saviour. 2011. Available from: <http://www.samedanltd.com/magazine/13/issue/156/article/2997>.
8. Westfall JM, Mold J, Fagnan L. Practice-based research — «Blue Highways» on the NIH roadmap. *JAMA*. 2007; 297 (4): 403–6.
9. Trochim W, Kane C, Graham MJ, Pincus HA. Evaluating translational research: a process marker model. *Clin Transl Sci*. 2011; 4 (3): 153–62.
10. Knapton S. British scientists granted permission to genetically modify human embryos. *The Daily Telegraph*. 2016 Feb 1.
11. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015 Apr 3; 348 (6230): 36–3. doi: 10.1126/science.aab1028.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ МЕЛЬДОНИЯ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМА P450 3A4

А. В. Кузиков^{1,2}, Т. В. Булко¹, Р. А. Масамрех², А. А. Махова³, А. И. Арчаков^{1,2}, С. А. Усанов⁴, Е. В. Ших³, В. В. Шумянцова^{1,2}✉

¹ Лаборатория биоэлектрохимии, отдел персонализированной медицины, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва

² Кафедра биохимии, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

³ Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, лечебный факультет, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

⁴ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Исследовано влияние мельдония на каталитические функции цитохрома P450 3A4. Анализ каталитической активности проводили электрохимическими методами с использованием иммобилизованного на электроде цитохрома P450 3A4. В присутствии 50 мкМ мельдония в электрохимической системе не наблюдали увеличения электрокаталитической константы цитохром P450 3A4-зависимого N-деметилирования эритромицина. Электрокаталитические константы k_{cat} , рассчитанные по образованию продукта, составили $6,1 \pm 0,6 \text{ мин}^{-1}$ (P450 3A4 + эритромицин) и $5,5 \pm 1,4 \text{ мин}^{-1}$ (P450 3A4 + эритромицин + мельдоний). Таким образом, электроанализ каталитической активности цитохрома P450 3A4 показал возможность проведения безопасной и эффективной комплексной фармакотерапии с использованием мельдония при одновременном приеме макролидного антибиотика эритромицина.

Ключевые слова: цитохром P450 3A4, антигипоксанта средства, электроанализ, ферментные электроды, лекарственная интерференция, мельдоний

Финансирование: работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг.

✉ **Для корреспонденции:** Шумянцова Виктория Васильевна
ул. Погодинская, д. 10, г. Москва, 119121; v_shumyantseva@mail.ru

Статья получена: 28.11.2016 Статья принята к печати: 06.12.2016

ANALYSIS OF MILDRONATE EFFECT ON THE CATALYTIC ACTIVITY OF CYTOCHROME P450 3A4

Kuzikov AV^{1,2}, Bulko TV¹, Masamrekh RA², Makhova AA³, Archakov AI^{1,2}, Usanov SA⁴, Shikh EV³, Shumyantseva VV^{1,2}✉

¹ Laboratory of Bioelectrochemistry, Department of Personalized Medicine, Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² Department of Biochemistry, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, Faculty of General Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴ Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus

In this work, we have studied the effect of mildronate on the catalytic properties of cytochrome P450 3A4. The analysis of the catalytic activity was carried out using electrochemical methods, with cytochrome P450 3A4 immobilized on the electrode surface. In the presence of 50 μM mildronate, no increase was observed in the turnover number of cytochrome P450 3A4-dependent N-demethylation of erythromycin. The values of the turnover number k_{cat} calculated from the product formed by the reaction were $6.1 \pm 0.6 \text{ min}^{-1}$ (P450 3A4 + erythromycin) and $5.5 \pm 1.4 \text{ min}^{-1}$ (P450 3A4 + erythromycin + mildronate). Thus, electroanalysis of cytochrome P450 3A4 catalytic activity demonstrated the possibility of a safe and effective complex drug therapy with concurrent administration of mildronate and the macrolide (erythromycin).

Keywords: cytochrome P450 3A4, antihypoxic drugs, electroanalysis, enzyme electrodes, drug interference, mildronate

Funding: this work was conducted under the Federal Fundamental Scientific Research Program for 2013–2020.

✉ **Correspondence should be addressed:** Victoria Shumyantseva
ul. Pogodinskaya, d. 10, Moscow, Russia, 119121; v_shumyantseva@mail.ru

Received: 28.11.2016 Accepted: 06.12.2016

Трансляционная медицина — современное направление развития молекулярной медицины, предусматривающее тесную связь и трансляцию фундаментальных исследований в сферу практического применения в медицине. Изоферменты цитохрома P450 (CYP) — суперсемейство

гем-содержащих монооксигеназ, осуществляющих I фазу биотрансформации ксенобиотиков, в том числе около 75 % лекарственных препаратов, а также метаболизм эндогенных физиологически активных соединений [1, 2]. Цитохром P450-зависимый метаболизм лекарственных

препаратов — главная причина различий в фармакокинетике и индивидуальной реакции на фармакотерапию. Среди 57 изоферментов цитохрома P450 человека 5 основных форм (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5) осуществляют примерно 95 % реакций биотрансформации [3–5]. Изоферменты цитохрома P450 катализируют различные химические реакции: гидроксирование, O-, S-, N-деалкилирование, эпоксирирование, сульфокисление, дезаминирование, дегалогенирование и др. Так как цитохромы P450 имеют широкую субстратную специфичность, исследование взаимодействия лекарственных препаратов в цитохром P450-системах имеет особую клиническую значимость [6–8]. Для доклинической оценки лекарственной интерференции и скорости биотрансформации лекарственных средств в системах *in vitro* разработаны методы электроанализа клинически значимых форм цитохромов P450 [9–12].

В каталитическом цикле цитохромов P450 участвуют белки редокс-партнеры цитохром P450 редуктаза, цитохром b_5 , а донором электронов является никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН). Для проявления каталитической активности необходимо участие всех компонентов сложной цепи переноса электронов. Анализ каталитической активности цитохромов P450 электрохимическими методами не требует белков редокс-партнеров и доноров электронов НАДФН (рис. 1). Электроанализ цитохромов P450 является модельной неинвазивной системой в исследовании механизма биотрансформации ксенобиотиков, лекарственной интерференции. Электрохимические подходы перспективны для исследования фермент-субстратных взаимодействий вследствие высокой чувствительности [13]. В результате каталитической цитохром P450-зависимой реакции в электрохимической системе регистрируется катодный (восстановительный) ток, увеличение которого соответствует дополнительному потоку электронов к органическому субстрату (лекарственному препарату). Катодный ток (имеющий отрицательное значение в отличие от анодных процессов с положительным значением тока) является мерой электрокаталитической активности фермента. Исследование электроаналитических характеристик цитохромов P450 является важным этапом в поиске новых субстратов/ингибиторов этих гемопротеинов в качестве лекарственных препаратов, а также при изучении лекарственной интерференции [14, 15].

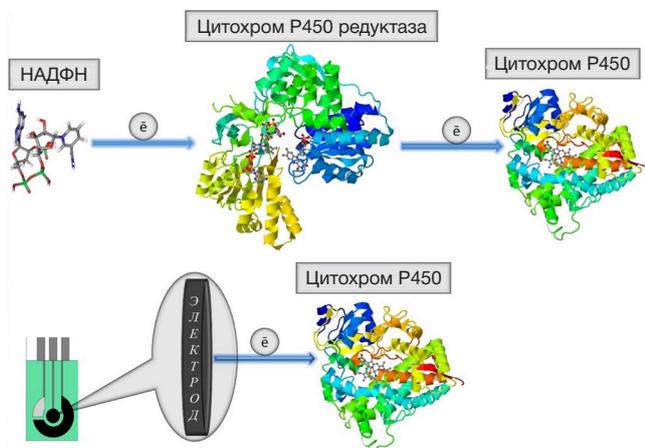


Рис. 1. Схема переноса электронов в монооксигеназной цитохром P450-содержащей системе (сверху) и в электрохимической системе (снизу) Структуры белков взяты из базы данных PDB [16], структура НАДФН — из PubChem [17].

Разработанный нами метод электроанализа каталитической активности цитохромов P450 позволяет использовать систему электрод/фермент на стадии доклинических испытаний как неинвазивный инструмент оценки каталитических функций цитохромов P450 с целью поиска новых субстратов, ингибиторов, модуляторов этих ферментов [18].

Несмотря на значительные достижения медицины в вопросах диагностики и лечения, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) продолжают лидировать в структуре заболеваемости и смертности наиболее трудоспособной части населения большинства экономически развитых стран, в том числе и России. Разрабатываются новые стратегии лечения ССЗ. Когда была выявлена взаимосвязь свободных жирных кислот (ЖК) с риском смертности от сердечно-сосудистой патологии атеросклеротического генеза, начались исследования ингибиторов парциального β -окисления ЖК pFOX (partial fatty acid oxidation inhibitors) [19]. Метаболические средства, повышающие эффективность использования кислорода, переключаящие метаболизм на более экономные пути, защищающие ткани от последствий оксидативного стресса при реперфузии, должны обладать антиишемическим эффектом за счет влияния на обменные процессы в миокарде [20].

В середине 1970-х гг. в Институте органического синтеза Латвии был синтезирован триметилгидразиния пропионат (мельдоний), который ограничивает транспорт ЖК через мембраны [21]. Показано, что мельдоний способен обеспечить замедление скорости β -окисления ЖК в митохондриях и ограничение транспорта ЖК через клеточные мембраны, что актуально в условиях избыточного накопления ЖК [22]. Мельдоний обеспечивает процессы ишемического preconditionирования за счет снижения скорости трансмембранного транспорта ЖК, ацил-CoA и ацилкарнитина в клетке, уменьшения потребления кислорода, замедления β -окисления ЖК и повышения скорости биосинтеза γ -бутиробетинаина; индуцирует биосинтез NO в эндотелии кровеносных сосудов, уменьшая сопротивление периферических кровеносных сосудов и агрегацию тромбоцитов, увеличивает эластичность мембран эритроцитов; позволяет минимизировать метаболический ацидоз, развивающийся в результате активации анаэробного гликолиза и накопления молочной кислоты. Мельдоний используется в составе комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний; при пониженной работоспособности, физическом перенапряжении, в послеоперационный период для ускорения реабилитации; при синдроме абстиненции при хроническом алкоголизме [23, 24].

Несмотря на активное использование мельдония в клинике как метаболического антигипоксанта средства в составе комбинированной терапии, его влияние на каталитические функции цитохромов P450 как основных ферментов I фазы биотрансформации ксенобиотиков не исследовалось. При проведении комбинированной фармакотерапии необходимо учитывать, что лекарственная интерференция может иметь как положительные, так и отрицательные последствия для пациента. В связи с этим особое значение приобретает информация о наличии субстратных свойств, возможности ингибирования или индукции изоферментов цитохрома P450 лекарственными средствами, которые используются преимущественно в составе комплексной терапии.

Ранее нами электрохимическими методами были исследованы витамин-антиоксиданты (витамины С, А и Е), а также витаминоподобные вещества (таурин и коэнзим Q),

которые обладали положительным влиянием на электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4 [18, 25]. В связи с этим цель работы состояла в изучении влияния мельдония на каталитические функции цитохрома P450 3A4 — изофермента, участвующего в биотрансформации более 50 % лекарственных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата/гальваностата Autolab PGSTAT 12 (Metrohm Autolab, Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES (версия 4.9.7). Все измерения проводили при комнатной температуре. Электрохимические исследования цитохрома P450 3A4 проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4. В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО «КолорЭлектроник», Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного Ag/AgCl электрода сравнения. Спектральные измерения проводили с помощью спектрофотометра Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies, США), снабженного программным обеспечением Cary WinUV.

Цикловольтамперограммы регистрировали при скорости развертки потенциала от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании катодной квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА): начальный потенциал +100 мВ, конечный потенциал -600 мВ, шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц.

В работе использовали следующие реактивы: дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ) и эритромицин фирмы Sigma-Aldrich (США), мельдоний фирмы Grindeks (Латвия), уксусная кислота, аммония ацетат и ацетилацетон фирмы ООО «Спектр-Хим». Препарат рекомбинантного P450 3A4 человека (182 мкМ в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2 % CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20 % глицерин) был получен генно-инженерным способом, выделен и охарактеризован в Институте биоорганической химии (Минск, Беларусь). Концентрация фермента определялась спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы с углерода монооксидом, используя коэффициент поглощения $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [26].

На поверхность рабочего графитового электрода наносили 1 мкл 0,1 М ДДАБ в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл 18,2 мкМ цитохрома P450 3A4. Электроды оставляли на 12 ч при +4 °С во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов.

N-деметилазную электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4 по отношению к эритромицину определяли по накоплению одного из продуктов реакции — формальдегида, который образует окрашенное соединение с реактивом Nash (4 М ацетат аммония, 0,1 М ледяная уксусная кислота, 0,04 М ацетилацетон), коэффициент поглощения $\epsilon_{412} = 4 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [27, 28]. Ферментный электрод помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл электролитного буфера, содержащего 100 мкМ эритромицина. Электролиз проводили в течение 20 мин при контролируемом потенциале рабочего электрода -0,5 В. После проведения электролиза инкубационную смесь смешивали в соотно-

шении 1 : 1 с реактивом Nash и инкубировали при +37 °С в течение 30 мин для развития окраски. Концентрацию формальдегида, образовавшегося в процессе электрокатализа, определяли спектрально.

На рисунках 3, 4 и в таблице приведены средние значения \pm стандартное отклонение из 3–5 независимых опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мельдоний относится к классу антигипоксантных средств и используется в составе комбинированной фармакотерапии для различных патологических состояний. Влияние мельдония на каталитические функции цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на электроде, полученном методом трафаретной печати (ПГЭ), модифицированном дидодецилдиметиламмония бромидом (ПГЭ/ДДАБ), исследовали методом циклической вольтамперометрии, регистрируя максимальное значение катодного пика. Как следует из рис. 2, мельдоний не влияет на электрохимическое восстановление цитохрома P450 3A4, не вызывает увеличения или снижения восстановительного тока цитохрома P450 3A4, т. е. не проявляет как субстратных, так и ингибиторных свойств по отношению к ферменту. Кроме того, проведенный нами спектральный анализ связывания цитохрома P450 3A4 с мельдонием показал, что мельдоний не вызывает ни I (субстратного), ни II (ингибиторного) типов изменения дифференциального спектра цитохрома P450 3A4, что согласуется с данными, полученными с помощью электрохимической системы.

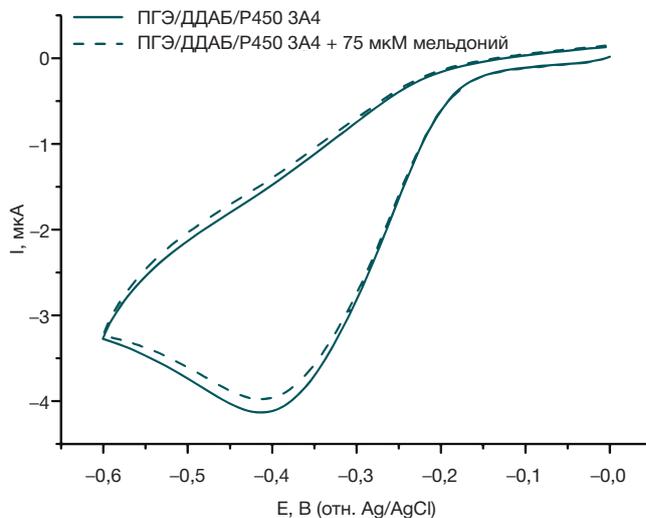


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы цитохрома P450 3A4 (—) и в присутствии 75 мкМ мельдония (---)

Фермент был иммобилизован на электроде, модифицированном ДДАБ. Диапазон сканирования от 0 до -0,6 В (отн. Ag/AgCl), скорость развертки потенциала 0,05 В/с.

Таблица. Кинетические параметры P450 3A4-зависимой электрокаталитической N-деметилазной активности в отношении эритромицина

Электрохимическая система	k_{cat} , мин ⁻¹
P450 3A4 + эритромицин	6,1 ± 0,6
P450 3A4 + мельдоний (50 мкМ) + эритромицин	5,5 ± 1,4

Примечание. Электролиз проводился при контролируемом напряжении -0,5 В (отн. Ag/AgCl) в течение 20 мин в присутствии 100 мкМ эритромицина.

Исследование концентрационной зависимости мельдония в диапазоне концентраций 10–75 мкМ также подтвердило отсутствие влияния этого препарата на восстановление цитохрома P450 3A4 (рис. 3).

Влияние мельдония на цитохром P450 3A4-зависимую биотрансформацию эритромицина было исследовано при использовании 50 мкМ мельдония и 100 мкМ эритромицина. Реакцию N-деметилирования эритромицина, катализируемую цитохромом P450 3A4, регистрировали по образованию формальдегида. В результате реакции Ханша формальдегид образует окрашенное производное, которое регистрировали спектрально при 412 нм [26]. Как следует из таблицы, каталитические константы k_{cat} электрокаталитических цитохром P450-зависимых реакций имеют близкие значения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эффективность катализа и лекарственную интерференцию оценивали по электрохимической активности иммобилизованного на электроде фермента цитохрома P450 3A4. Для исследования электроаналитических характеристик были использованы вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью циклической вольтамперометрии и квадратно-волновой вольтамперометрии. Субстраты соответствующих форм цитохромов P450 вызывают существенное повышение каталитического тока (рис. 4, опыты 2, 5), а ингибиторы не изменяют или снижают максимальные амплитуды токов [13]. Итраконазол, ингибитор цитохрома P450 3A4, не дает увеличение катодного тока при связывании с ферментом, так как не происходит дополнительных процессов переноса электронов в системе (рис. 4, опыт 3).

Ранее было изучено стимулирующее влияние метаболитических антиоксидантных препаратов на первую стадию каталитического цикла цитохромов P450 — восстановление иона железа гема [18]. Исследование лекарственной интерференции при одновременном взаимодействии субстрата цитохрома P450 3A4 диклофенака и таких лекарственных препаратов, как элькар (L-карнитин), антиоксидантное витаминоподобное вещество тиоктовая (альфа-липовая) кислота, показало, что эти препараты не

влияют на каталитический ток, регистрируемый при взаимодействии диклофенака с ферментом (рис. 4, опыты 6–8). Все лекарственные препараты были исследованы в диапазоне концентраций 10–400 мкМ. Такой диапазон рабочих концентраций был выбран на основе анализа данных по определению электрохимической константы Михаэлиса и из данных о концентрации лекарственных препаратов в плазме крови [29]. Направленная регуляция каталитического цикла цитохрома P450 может приводить как к снижению скорости метаболизма лекарственных препаратов, так и к активации биотрансформации субстратов [30–32].

В присутствии 50 мкМ липоевой кислоты в электрохимической системе не наблюдается увеличение электрокаталитической константы P450 3A4-зависимого N-деметилирования эритромицина. Сравнение кинетических параметров позволяет сделать выводы о возможности комбинированной терапии и отсутствии лекарственной интерференции для макролидного антибиотика эритромицина и антиоксидантного метаболитического препарата тиоктовой кислоты.

Препарат мельдоний, так же как и L-карнитин, липоевая кислота, не оказывает влияния на электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4.

ВЫВОДЫ

С помощью электроанализа проведено исследование лекарственной интерференции типичных субстратов цитохрома P450 3A4 диклофенака и эритромицина с метаболитическими лекарственными препаратами, обладающими антиоксидантными свойствами, а также с антигипоксантами препаратом мельдонием. Препарат мельдоний, так же как и L-карнитин, липоевая кислота, не оказывает влияния на электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4, в результате чего снижается вероятность возникновения межлекарственного взаимодействия на уровне метаболизма лекарственных препаратов при его использовании в составе комплексной фармакотерапии. Данную информацию необходимо учитывать врачам различного профиля при выборе оптимального препарата с антиоксидантными и антигипоксантами свойствами при назначении его в комплексной терапии коморбидных пациентов.

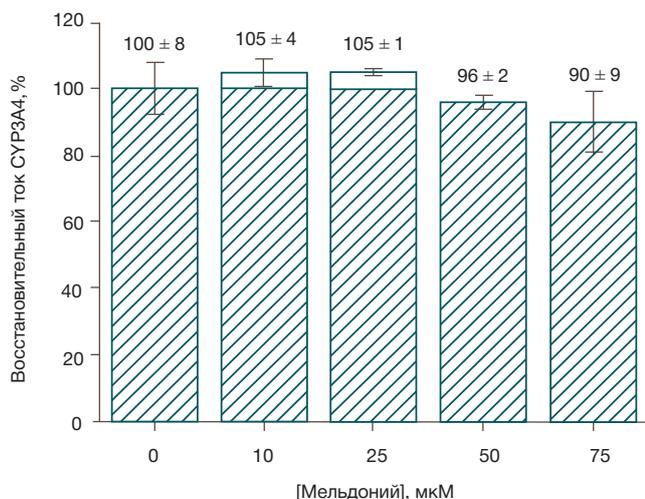


Рис. 3. Зависимость восстановительного тока P450 3A4 (%) от концентрации мельдония (мкМ)

Регистрация проводилась методом циклической вольтамперометрии. Диапазон сканирования от 0 до -0,6 В (отн. Ag/AgCl), скорость развертки потенциала 0,05 В/с.

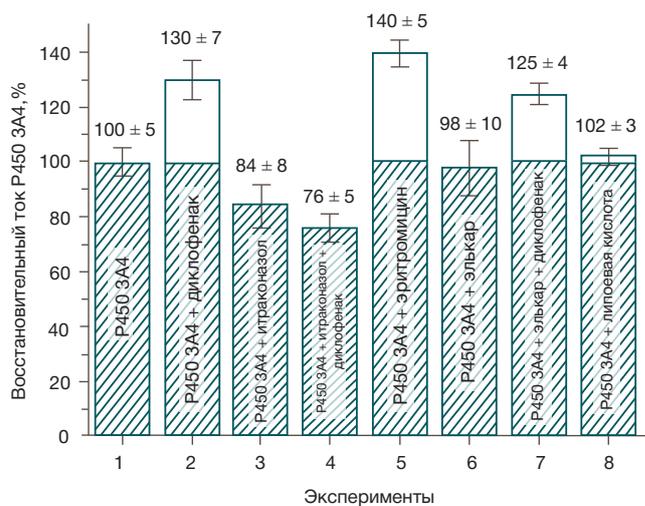


Рис. 4. Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: (1) P450 3A4; (2) P450 3A4 + диклофенак; (3) P450 3A4 + итраконазол; (4) P450 3A4 + итраконазол + диклофенак; (5) P450 3A4 + эритромицин; (6) P450 3A4 + элькар; (7) P450 3A4 + элькар + диклофенак; (8) P450 3A4 + липоевая (тиоктовая) кислота. Значения амплитуд токов КВВА были скорректированы по базовой линии

Литература

- Guengerich FP. Human Cytochrome P450 Enzymes. In: Ortiz de Montellano PR, editor. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. San Francisco: Springer; 2015. p. 523–785.
- Hrycay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol*. 2015; 74: 35–84.
- Hrycay EG, Bandiera SM. The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys*. 2012 Jun 15; 522 (2): 71–89.
- Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013 Apr; 138 (1): 103–41.
- Nebert DW, Russel DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. 2002 Oct 12; 360 (9340): 1155–62.
- Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, Li C, Wang G. Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 2007 Dec; 29 (6): 687–710.
- Hisaka A, Ohno Y, Yamamoto T, Suzuki H. Prediction of pharmacokinetic drug–drug interaction caused by changes in cytochrome P450 activity using in vivo information. *Pharmacol Ther*. 2010 Feb; 125 (2): 230–48.
- Zhang L, Reynolds KS, Zhao P, Huang SM. Drug interactions evaluation: an integrated part of risk assessment of therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Mar; 243 (2): 134–45.
- Carrara S, Cavallini A, Erokhin V, De Micheli G. Multi-panel drugs detection in human serum for personalized therapy. *Biosens Bioelectron*. 2011 May 15; 26 (9): 3914–9.
- Schneider E, Clark DS. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. *Biosens Bioelectron*. 2013 Jan 15; 39 (1): 1–13.
- Rua F, Sadeghi SJ, Castrignanò S, Valetti F, Gilardi G. Electrochemistry of *Canis familiaris* cytochrome P450 2D15 with gold nanoparticles: An alternative to animal testing in drug discovery. *Bioelectrochemistry*. 2015 Oct; 105: 110–6.
- Panicco P, Dodhia VR, Fantuzzi A, Gilardi G. Enzyme-based amperometric platform to determine the polymorphic response in drug metabolism by cytochromes P450. *Anal Chem*. 2011 Mar 15; 83 (6): 2179–86.
- Shumyantseva VV, Bulko TV, Suprun EV, Chalenko YaM, Vagin MYu, Rudakov YuO, et al. Electrochemical investigations of cytochrome P450. *Biochem Biophys Acta*. 2011 Jan; 1814 (1): 94–101.
- Yarman A, Wollenberger U, Scheller FW. Sensors based on cytochrome P450 and CYP mimicking systems. *Electrochim Acta*. 2013; 110: 63–72.
- Fantuzzi A, Mak LH, Capria E, Dodhia V, Panicco P, Collins S, et al. A new standardized electrochemical array for drug metabolic profiling with human cytochromes P450. *Anal Chem*. 2011 May 15; 83 (10): 3831–9.
- The Protein Data Bank [база данных, Интернет]. Rutgers (NJ): the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; 2003– [процитировано 01.12.2016]. Доступно по: <http://www.rcsb.org/>
- PubChem [база данных, Интернет]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004– [процитировано 01.12.2016]. Доступно по: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Shumyantseva VV, Makhova AA, Bulko TV, Kuzikov AV, Shich EV, Kukes VG, et al. Electrocatalytic cycle of P450 cytochromes: the protective and stimulating roles of antioxidants. *RSC Adv*. 2015; 5: 71306–13.
- Задюченко В. С., Шехян Г. Г., Ялымов А. А., Асымбекова Э. У., Туреева Э. Ф., Шерстянникова О. М. Место мельдония в метаболической цитопротекции. *РМЖ*. 2013; (9): 448–52.
- Михин В. П., Поздняков Ю. М., Хлебодаров Ф. Е., Кольцова О. Н. Милдронат в кардиологической практике — итоги, новые направления, перспективы. *Кардиоваскул. тер. и профил.* 2012; 11 (1): 96–103.
- Стаценко М. Е., Туркина С. В. Метаболическая кардиопротекция мельдонием при ишемической болезни сердца: итоги и перспективы. *Леч. врач*. 2012; (7): 35–9.
- Садовникова И. И. Кардиопротекторы. Недооцененные возможности. *РМЖ*. 2009; (18): 1132–4.
- Самородская И. В. Мельдоний: обзор результатов исследований. *РМЖ*. 2013; (36): 1818–24.
- Сыркин А. Л., Добровольский А. В. Антиишемические препараты метаболического действия. *Consilium Medicum*. 2002; 4 (11): 572–5.
- Шумянцова В. В., Махова А. А., Булко Т. В., Бернхардт Р., Кузиков А. В., Ших Е. В. и др. Таурин как модулятор каталитической активности цитохрома P450 3A4. *Биохимия*. 2015; 80 (3): 439–48.
- Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem*. 1964 Jul; 239: 2379–85.
- Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J*. 1953 Oct; 55 (3): 416–21.
- Sadeghi S, Ferrero S, Di Nardo G, Gilardi G. Drug–drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4. *Bioelectrochemistry*. 2012 Aug; 86: 87–91.
- Baj-Rossi C, Müller C, von Mandach U, De Micheli G, Carrara S. Faradic Peaks Enhanced by Carbon Nanotubes in Microsomal Cytochrome P450 Electrodes. *Electroanalysis*. 2015; 27: 1507–15.
- Makhova AA, Shumyantseva VV, Shich EV, Bulko TV, Kukes VG, Sizova OS, et al. Electroanalysis of cytochrome P450 3A4 catalytic properties with nanostructured electrodes: The influence of vitamins B group on diclofenac metabolism. *BioNanoSci*. 2011; 1: 46–52.
- Shumyantseva VV, Makhova AA, Bulko TV, Shich EV, Kukes VG, Usanov SA, et al. The effect of antioxidants on electrocatalytic activity of cytochrome P450 3A4. *Biochem (Mosc) Suppl Ser B Biomed Chem*. 2013; 7: 160–4.
- Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, Hatano T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol*. 2010 Jan; 48 (1): 429–35.

References

- Guengerich FP. Human Cytochrome P450 Enzymes. In: Ortiz de Montellano PR, editor. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. San Francisco: Springer; 2015. p. 523–785.
- Hrycay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol*. 2015; 74: 35–84.
- Hrycay EG, Bandiera SM. The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys*. 2012 Jun 15; 522 (2): 71–89.
- Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013 Apr; 138 (1): 103–41.
- Nebert DW, Russel DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. 2002 Oct 12; 360 (9340): 1155–62.
- Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, Li C, Wang G. Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 2007 Dec; 29 (6): 687–710.
- Hisaka A, Ohno Y, Yamamoto T, Suzuki H. Prediction of pharmacokinetic drug–drug interaction caused by changes in cytochrome P450 activity using in vivo information. *Pharmacol Ther*. 2010 Feb; 125 (2): 230–48.
- Zhang L, Reynolds KS, Zhao P, Huang SM. Drug interactions evaluation: an integrated part of risk assessment of therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Mar; 243 (2): 134–45.

9. Carrara S, Cavallini A, Erokhin V, De Micheli G. Multi-panel drugs detection in human serum for personalized therapy. *Biosens Bioelectron.* 2011 May 15; 26 (9): 3914–9.
10. Schneider E, Clark DS. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2013 Jan 15; 39 (1): 1–13.
11. Rua F, Sadeghi SJ, Castrignanò S, Valetti F, Gilardi G. Electrochemistry of *Canis familiaris* cytochrome P450 2D15 with gold nanoparticles: An alternative to animal testing in drug discovery. *Bioelectrochemistry.* 2015 Oct; 105: 110–6.
12. Panicco P, Dodhia VR, Fantuzzi A, Gilardi G. Enzyme-based amperometric platform to determine the polymorphic response in drug metabolism by cytochromes P450. *Anal Chem.* 2011 Mar 15; 83 (6): 2179–86.
13. Shumyantseva VV, Bulko TV, Suprun EV, Chalenko YaM, Vagin MYu, Rudakov YuO, et al. Electrochemical investigations of cytochrome P450. *Biochem Biophys Acta.* 2011 Jan; 1814 (1): 94–101.
14. Yarman A, Wollenberger U, Scheller FW. Sensors based on cytochrome P450 and CYP mimicking systems. *Electrochim Acta.* 2013; 110: 63–72.
15. Fantuzzi A, Mak LH, Capria E, Dodhia V, Panicco P, Collins S, et al. A new standardized electrochemical array for drug metabolic profiling with human cytochromes P450. *Anal Chem.* 2011 May 15; 83 (10): 3831–9.
16. The Protein Data Bank [database on the Internet]. Rutgers (NJ): the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; 2003– [cited 2016 Dec 1]. Available from: <http://www.rcsb.org/>
17. PubChem [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004– [cited 2016 Dec 1]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
18. Shumyantseva VV, Makhova AA, Bulko TV, Kuzikov AV, Shich EV, Kukes VG, et al. Electrocatalytic cycle of P450 cytochromes: the protective and stimulating roles of antioxidants. *RSC Adv.* 2015; 5: 71306–13.
19. Zadionchenko VS, Shekhyan GG, Yalymov AA, Asymbekova EU, Tugeeva EF, Sherstyannikova OM. Mesto mel'doniya v metabolicheskoi tsitoprotektsii. *Russkii meditsinskii zhurnal.* 2013; (9): 448–52. Russian.
20. Mikhin VP, Pozdnyakov YuM, Khlebodarov FE, Koltsova ON. [Mildronate in cardiology practice — current evidence, ongoing research, and future perspectives]. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika.* 2012; 11 (1): 96–103. Russian.
21. Statsenko ME, Turkina SV. Metabolicheskaya kardioprotektsiya mel'doniem pri ishemicheskoi bolezni serdtsa: itogi i perspektivy. *Lechashchii vrach.* 2012; (7): 35–9. Russian.
22. Sadovnikova II. Kardioprotektory. *Nedootsenennyye vozmozhnosti. Russkii meditsinskii zhurnal.* 2009; (18): 1132–4. Russian.
23. Samorodskaya IV. Mel'donii: obzor rezul'tatov issledovaniy. *Russkii meditsinskii zhurnal.* 2013; (36): 1818–24. Russian.
24. Syrkin AL, Dobrovolskii AV. Antiishemicheskie preparaty metabolicheskogo deystviya. *Consilium Medicum.* 2002; 4 (11): 572–5. Russian.
25. Shumyantseva VV, Makhova AA, Bulko TV, Bernhardt R, Kuzikov AV, Shich EV, et al. Taurine modulates catalytic activity of cytochrome P450 3A4. *Biochemistry (Mosc).* 2015 Mar; 80 (3): 366–73.
26. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem.* 1964 Jul; 239: 2379–85.
27. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J.* 1953 Oct; 55 (3): 416–21.
28. Sadeghi S, Ferrero S, Di Nardo G, Gilardi G. Drug–drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4. *Bioelectrochemistry.* 2012 Aug; 86: 87–91.
29. Baj-Rossi C, Müller C, von Mandach U, De Micheli G, Carrara S. Faradic Peaks Enhanced by Carbon Nanotubes in Microsomal Cytochrome P450 Electrodes. *Electroanalysis.* 2015; 27: 1507–15.
30. Makhova AA, Shumyantseva VV, Shich EV, Bulko TV, Kukes VG, Sizova OS, et al. Electroanalysis of cytochrome P450 3A4 catalytic properties with nanostructured electrodes: The influence of vitamins B group on diclofenac metabolism. *BioNanoSci.* 2011; 1: 46–52.
31. Shumyantseva VV, Makhova AA, Bulko TV, Shich EV, Kukes VG, Usanov SA, et al. The effect of antioxidants on electrocatalytic activity of cytochrome P450 3A4. *Biochem (Mosc) Suppl Ser B Biomed Chem.* 2013; 7: 160–4.
32. Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, Hatano T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol.* 2010 Jan; 48 (1): 429–35.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДА ПРИ ПОМОЩИ РЕНТГЕНОВСКОЙ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ ДЛЯ ДОЗИМЕТРИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ФОТОН-ЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

А. А. Липенгольц^{1,2,3}✉, Ю. А. Будаева^{2,3}, М. Блайкнер⁴, А. А. Черепанов¹, М. А. Меньков¹, В. Н. Кулаков², Е. Ю. Григорьева¹

¹ Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина, Москва

² Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна, Москва

³ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

⁴ Австрийский технологический институт, Вена, Австрия

Количественное определение *in vivo* дозоповышающих агентов, то есть элементов с $Z > 52$, при фотон-захватной терапии (ФЗТ) необходимо для внедрения метода в клиническую практику. Проведено исследование возможности количественного определения йода ($Z = 53$) в тканеэквивалентном объекте (полиэтиленовом фантоме) при помощи рентгеновской компьютерной томографии (КТ). Показано, что зависимость значений рентгеноплотности водных растворов йода на томограммах фантома от концентрации йода носит линейный характер в диапазоне концентраций йода от 0,5 до 50 мг/мл. Характеристики предлагаемого метода количественного определения йода при помощи КТ соответствуют потребностям ФЗТ. Отклонение измеренного по томограммам содержания йода в растворах от их истинных значений не превышает 5 % в диапазоне концентраций йода от 10 до 50 мг/мл. Для растворов с концентрацией йода менее 5 мг/мл отклонение достигает 80 %. Однако и этот результат является приемлемым для ФЗТ, так как для концентраций йода менее 5 мг/мл неопределенность величиной в 80 % в измерении концентрации йода приводит к неопределенности определения величины поглощенной дозы не более чем в 2,8 %. Изменение спектра рентгеновского излучения в тканеэквивалентном объекте не оказывает существенного влияния на характеристики предлагаемого метода. Сравнение градуировочных кривых, построенных для растворов, расположенных около поверхности объекта и в его глубине, показало, что разница между определяемыми по ним значениями концентрации йода не превышает 2 %.

Ключевые слова: фотон-захватная терапия, компьютерная томография, йод, количественное определение, дозиметрия

✉ Для корреспонденции: Липенгольц Алексей Андреевич
Каширское шоссе, д. 24, г. Москва, 115478; lipengolts@mail.ru

Статья получена: 01.12.2016 Статья принята в печать: 06.12.2016

IODINE QUANTIFICATION WITH COMPUTED TOMOGRAPHY FOR THE PURPOSE OF DOSE ASSESSMENT IN CONTRAST ENHANCED RADIOTHERAPY

Lipengolts AA^{1,2,3}✉, Budaeva JA^{2,3}, Blaickner M⁴, Cherepanov AA¹, Menkov MA¹, Kulakov VN², Grigorieva EYu¹

¹ N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

² A. I. Burnazyan Federal Medical and Biophysical Center, Moscow, Russia

³ National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

⁴ Austrian Institute of Technology, Vienna, Austria, Russia

In vivo quantitative determination of high-Z elements such as iodine gadolinium, gold, etc. is an important issue for contrast enhanced radiotherapy (CERT) that aggravates its clinical implementation. X-ray computed tomography (CT) could be a reliable, convenient and universal method for this task. The aim of this study was to demonstrate the feasibility of iodine quantification with CT in a tissue equivalent phantom, meeting the demands for CERT. The results show a linear relationship between iodine concentration and radiopacity on tomographic images expressed in Hounsfield units (HU) over an iodine concentration range of 0.5–50 mg/ml. Furthermore, iodine quantification with CT proved to be suitable for CERT since the deviation between CT-derived and actual iodine concentration does not exceed 5 % in the concentration range of 10–50 mg/ml. More significant deviations were observed for concentrations below 5 mg/ml with up to 80 %, which is still acceptable for CERT since the corresponding error for the absorbed dose in that range is less than 2.8 %. X-ray beam hardening within the tissue equivalent object does not significantly influence the accuracy of iodine quantification. The placement of iodine water solutions at the surface or in the centre of a visualized object during iodine quantification leads to a less than 2 % change in the determined iodine concentration.

Keywords: contrast enhanced radiotherapy, computed tomography, iodine, quantification, dosimetry

✉ Correspondence should be addressed: Alexey Lipengolts
Kashirskoe shosse, d. 24, Moscow, Russia, 115478; lipengolts@mail.ru

Received: 01.12.2016 Accepted: 06.12.2016

Эффективность и перспективность фотон-захватной терапии (ФЗТ) в лечении злокачественных опухолей, особенно опухолей мозга, показана во многих российских и зарубежных исследованиях [1–5]. Данный метод основан на преимущественном поглощении внешнего рентгеновского излучения ортовольтового диапазона (от 30 до 300 кэВ) дозоповышающими агентами (ДПА), локализованными в опухоли: это приводит к увеличению поглощаемой опухолью дозы излучения. ДПА в ФЗТ являются химические элементы с порядковым номером $Z > 52$, которые обладают большей поглощающей способностью по сравнению с химическими элементами, составляющими биологические мягкие ткани (Н, С, О, N и др.) [6].

Первые клинические испытания фазы I ФЗТ опухолей мозга были проведены в США на модифицированном компьютерном томографе в 1990-х гг. [2]. В настоящее время такие испытания проводят во Франции в Европейском центре синхротронного излучения [7]. Несмотря на обнадеживающие результаты, полученные в этих исследованиях, ФЗТ может так и остаться на этапе клинических испытаний фазы I и не перейти к следующим фазам, если не будет решена проблема получения количественных данных о распределении ДПА в опухоли и окружающих ее тканях до и во время сеанса облучения. Дело в том, что величина поглощенной дозы при ФЗТ определяется величиной концентрации ДПА в мишени и в зависимости от нее может увеличиваться в 1,5–5 раз по сравнению с дозой, поглощенной такой же, но не содержащей ДПА мишенью [8–12]. В связи с этим планирование облучения и контроль величины доставленной поглощенной дозы в ткани пациента, необходимые для продолжения клинических испытаний, невозможны без разработки метода получения количественных данных о содержании ДПА в опухолевых и здоровых тканях.

Планирование облучения в обоих упомянутых исследованиях осуществлялось без учета нахождения в мишени ДПА; режим и длительность облучения определяли исходя лишь из взаимодействия рентгеновского излучения с мягкими тканями, без учета дополнительного энерговыделения на атомах ДПА. Поэтому режим облучения в данных исследованиях был фракционированным, аналогичным для традиционной дистанционной лучевой терапии. Оценка увеличения поглощенной дозы за счет взаимодействия с ДПА производилась лишь позднее: на этапе анализа полученных результатов, с использованием усредненных по всем пациентам данных рентгеновской компьютерной томографии (КТ), полученных на этапе подготовки исследования. При расчете величины поглощенной дозы распределение ДПА в мишени вынужденно считалось однородным. Определение параметров оценки содержания ДПА, а также их влияния на итоговую величину поглощенной опухолью дозы в данных исследованиях не проводилось. Очевидно, что достоверное количественное определение ДПА в тканях пациента *in vivo* является основополагающим фактором эффективного и безопасного применения ФЗТ в лечении злокачественных опухолей.

КТ является наиболее вероятным методом количественного определения ДПА при ФЗТ. КТ и ФЗТ основаны на одних и тех же физических принципах, а именно: на поглощении рентгеновского излучения в веществе. КТ широко применяется в клинической практике и является одним из основных методов медицинской визуализации. Принципиальная возможность количественного определения ДПА с помощью КТ очевидна, исходя из физических основ КТ, и была экспериментально подтверждена рядом

исследователей [13–15]. Однако метрологические характеристики метода количественного определения ДПА при помощи КТ до сих пор остаются неисследованными.

Целью данной работы являлись демонстрация принципиальной возможности определения йода в тканеэквивалентном фантоме при помощи КТ, оценка различных характеристик метода, а также оценка влияния на них значения напряжения рентгеновской трубки КТ-сканера и изменения рентгеновского полихроматического спектра в толще тканеэквивалентного фантома, вызванного неодинаковым ослаблением его компонент.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании был использован специально изготовленный прямоугольный полиэтиленовый фантом размером $134 \times 134 \times 63$ мм. В нем были проделаны два перпендикулярных ряда отверстий от поверхности к центру (вглубь) для размещения микропробирок объемом 250 мкл с водными растворами йода, имевшими концентрацию йода от 0,5 до 50 мг/мл (рис. 1). В качестве йодсодержащего вещества использовался йопромид в форме лекарственного средства «Ультравист-370» (Bayer Schering Pharma AG, Германия). Приготовление йодсодержащих растворов осуществлялось путем разбавления исходного раствора «Ультрависта-370», содержавшего 370 мг/мл йода, при помощи автоматических дозаторов. Визуализация фантома с микропробирками осуществлялась на томографе Siemens Biograph 40 (Siemens, Германия). Сканирование проводилось при напряжениях рентгеновской трубки КТ-сканера 80, 100, 120 и 140 кВ и токе трубки 200 мА. Реконструкция изображений осуществлялась с помощью программного ядра V30f стандартного программного обеспечения томографа. Количественный анализ томограмм в стандартном формате DICOM проводился при помощи программы ImageJ (National Institutes of Health, США). Измерение средних значений рентгеновской плотности (в единицах Хаунсфилда, HU) йодсодержащих растворов, а также величин стандартного отклонения осуществлялось встроенными средствами программы ImageJ. Линейная аппроксимация полученных средних значений осуществлялась в программной среде R (R Foundation).

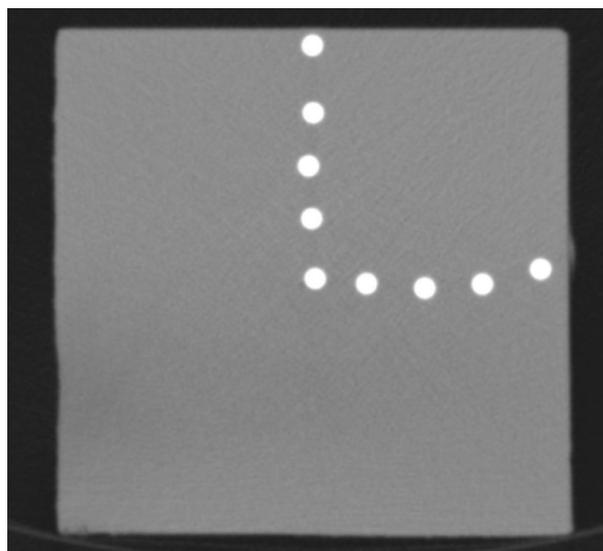


Рис. 1. Пример томограммы полиэтиленового фантома с микропробирками, содержащими водный раствор йода с концентрацией 35 мг/мл. Сканирование произведено при напряжении 80 кВ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зависимость значений рентгеноплотности водных растворов йода от его концентрации в них приведена на рис. 2. Зависимость носит линейный характер ($R^2 = 0,998$) во всем диапазоне исследованных концентраций — от 0,5 до 50 мг/мл. По полученным экспериментальным точкам были построены градуировочные кривые. Отклонение рассчитанных по градуировочным кривым значений концентрации йода для исследуемых растворов йода приведены в таблице. В диапазоне концентраций от 10 до 50 мг/мл отклонение не превышало 5 %. Для концентрации 5 мг/мл отклонение составило 5–10 %. Наибольшее отклонение (до 80 %) наблюдалось для растворов с концентрацией йода менее 1 мг/мл. Наблюдалось незначительное изменение величины рентгеноплотности в НУ в зависимости от местоположения микропробирки с раствором в фантоме. Градуировочные кривые, построенные для растворов, располагавшихся около поверхности, систематически оказались ниже градуировочных кривых, построенных для растворов, располагавшихся в центре (в глубине) фантома. Однако различие между расчетными концентрациями одного и того же раствора по этим градуировочным кривым не превысило 2 % для всех использованных напряжений КТ-сканера.

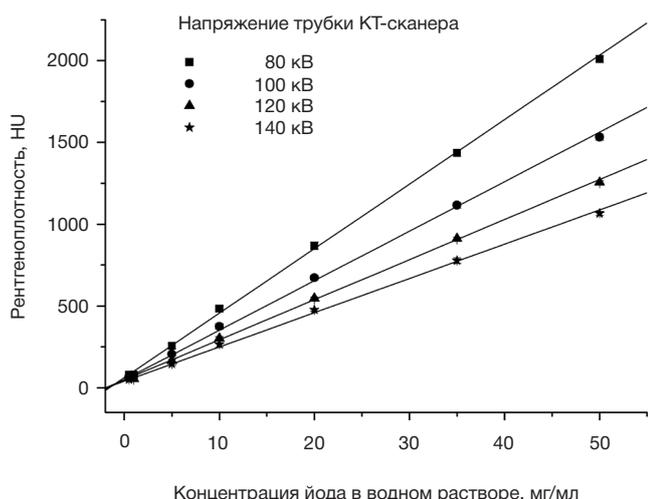


Рис. 2. Градуировочные кривые зависимости значений рентгеноплотности (в единицах Хаунсилда, НУ) от концентрации йода для напряжений на трубке КТ-сканера 80, 100, 120 и 140 кВ для растворов, расположенных в глубине фантома

Измеренные при помощи рентгеновской компьютерной томографии значения концентрации йода в водных растворах и их отклонения от истинных значений при разных напряжениях трубки КТ-сканера

Истинная концентрация йода в водном растворе, мг/мл	Напряжение трубки КТ-сканера							
	80 кВ		100 кВ		120 кВ		140 кВ	
	Измеренная при помощи КТ концентрация йода в растворе (мг/мл) и ее отличие от истинной концентрации (%)							
	мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%
0,50 ± 0,01	0,11 ± 0,08	77,1	0,18 ± 0,13	63,3	0,28 ± 0,2	43,9	0,13 ± 0,09	74,8
1,00 ± 0,02	0,18 ± 0,07	81,9	0,39 ± 0,16	60,8	0,10 ± 0,15	89,8	0,63 ± 0,25	37,5
5,0 ± 0,1	4,7 ± 0,2	7,1	4,80 ± 0,2	3,8	4,7 ± 0,2	6,9	4,7 ± 0,2	5,5
10,0 ± 0,2	10,50 ± 0,2	5,0	10,5 ± 0,2	4,7	10,3 ± 0,2	2,5	10,5 ± 0,2	4,9
20,0 ± 0,4	20,4 ± 0,3	1,8	20,4 ± 0,3	2,2	20,3 ± 0,3	1,4	20,7 ± 0,3	3,4
35,0 ± 0,6	34,9 ± 0,4	0,4	35,3 ± 0,4	0,7	35,2 ± 0,4	0,7	35,2 ± 0,4	0,6
50,0 ± 0,9	49,6 ± 0,4	0,8	49,2 ± 0,4	1,6	49,3 ± 0,4	1,3	49,1 ± 0,4	1,7

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Впервые проведено исследование количественного определения ДПА на клиническом компьютерном томографе с оценкой характеристик предлагаемого метода, необходимого для фотон-захватной терапии. Была исследована зависимость значений рентгеноплотности водных растворов йода от напряжения на рентгеновской трубке КТ-сканера во время измерения и от местоположения пробирок с растворами (расстояния от поверхности) в тканезквивалентном фантоме. Зависимость значений рентгеноплотности водных растворов йода от его концентрации носит линейный характер в диапазоне концентраций 0,5–50 мг/мл для всех использованных значений напряжения трубки КТ-сканера. Как и ожидалось, для напряжения 80 кВ наблюдается большая чувствительность количественного определения йода, чем для напряжений 100, 120 и 140 кВ. Однако наблюдаемая разница в чувствительности не принципиальна для ФЗТ и не влияет на точность количественного определения ДПА с помощью КТ (таблица), на которую в большей степени влияет разброс НУ в области проведения анализа. По этой причине выбор оптимального напряжения для количественного определения ДПА может быть сделан исходя из других, более важных требований ФЗТ [6, 16].

Несмотря на существенное отклонение измеренных значений концентраций йода от истинных значений в диапазоне концентраций от 0,5 до 5 мг/мл (до 80 %), следует отметить, что при планировании и оценке поглощенных доз в ФЗТ для этих концентраций такое отклонение приемлемо. Как нами было показано ранее [16], увеличение поглощенной дозы при ФЗТ зависит от концентрации ДПА, и данная зависимость может быть описана линейным законом ($R^2 = 0,99764$). По этой причине для вычисления поглощенной дозы при ФЗТ имеет значение абсолютная, а не относительная величина погрешности количественного определения ДПА. Наблюдаемая неопределенность в 80 % для концентраций 1 мг/мл соответствует абсолютной погрешности в 0,8 мг/мл, что, в свою очередь, приводит к относительному изменению поглощенной дозы при ФЗТ не более чем на 2,8 %. Такая ошибка при определении величины поглощенной дозы является приемлемой в лучевой терапии.

Таким образом, предлагаемый метод количественного определения йода при помощи КТ позволяет использовать получаемые количественные данные о распределении ДПА для планирования облучения и контроля поглощенной дозы в ФЗТ. Точность количественного определения ДПА

при помощи КТ, вероятно, может быть улучшена путем разработки специализированных алгоритмов реконструкции изображений, нацеленных на получение изображений с меньшим контрастом и резкостью, но при этом и меньшим разбросом НУ для однородного рентгеноплотного объекта. Степень ужесточения спектра рентгеновского излучения в исследованном объекте существенно не влияет на количественное определение йода. При количественном относительном определении ДПА при помощи КТ *in vivo* возможно расположение образцов сравнения в непосредственной близости с пациентом и не требует создания и размещения дополнительного антропоморфного фантома для градуировки.

ВЫВОДЫ

Экспериментально подтверждена принципиальная возможность количественного определения йода при помощи КТ в тканеэквивалентном фантоме. Метод показал себя достаточно надежным, пригодным для планирования и дозиметрического сопровождения ФЗТ. Метод обладает стабильными характеристиками в широком для ФЗТ диапазоне напряжений трубки КТ-сканера и концентраций ДПА, а также для исследования различных по протяженности и форме объектов. КТ является наиболее универсальным для ФЗТ методом количественного определения широкого спектра ДПА.

Литература

1. Norman A, Ingram M, Skillen RG, Freshwater DB, Iwamoto KS, Solberg T. X-ray phototherapy for canine brain masses. *Radiat Oncol Investig.* 1997; 5 (1): 8–14.
2. Rose JH, Norman A, Ingram M, Aoki C, Solberg T, Mesa A. First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999; 45 (5): 1127–32.
3. Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol.* 2004; 49 (4904): N309–15.
4. Hainfeld JF, Smilowitz HM, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine (Lond).* 2013; 8 (10): 1601–9. DOI: 10.2217/nnm.12.165.
5. Lipengolts AA, Cherepanov AA, Kulakov VN, Grigorieva EY, Sheino IN, Klimanov VA. Antitumor efficacy of extracellular complexes with gadolinium in Binary Radiotherapy. *Appl Radiat Isot.* 2015 Dec 1; 106: 233–6. DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.07.051.
6. Кулаков В. Н., Липенгольц А. А., Григорьева Е. Ю., Шимановский Н. Л. Препараты для дистанционной бинарной лучевой терапии и их применение при злокачественных новообразованиях (обзор). *Хим.-фарм. журнал.* 2016; 50 (6): 19–25.
7. Adam J, Vautrin M, Obeid L, Tessier A, Prezado Y, Renier M, et al. Contrast-enhanced Synchrotron Stereotactic Radiotherapy Clinical Trials from a Medical Physicist Point of View. *Int J Radiat Oncol.* 2014; 90 (1): S16–7.
8. Solberg TD, Iwamoto KS, Norman A. Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours. *Phys Med Biol.* 1992 Feb; 37 (2): 439–43.
9. Cho SH. Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. *Phys Med Biol.* 2005; 50 (15): N163–73. DOI: 10.1088/0031-9155/50/15/N01.
10. Roeske JC, Nunez L, Hoggarth M, Labay E, Weichselbaum RR. Characterization of the Theoretical Radiation Dose Enhancement from Nanoparticles. *Technol Cancer Res Treat.* 2007; 6 (5): 395–401.
11. Verhaegen F, Reniers B, Deblois F, Devic S, Seuntjens J, Hristov D. Dosimetric and microdosimetric study of contrast-enhanced radiotherapy with kilovolt x-rays. *Phys Med Biol.* 2005; 50 (15): 3555–69. DOI: 10.1088/0031-9155/50/15/005.
12. Robar JL, Riccio SA, Martin MA. Tumour dose enhancement using modified megavoltage photon beams and contrast media. *Phys Med Biol.* 2002; 47 (14): 2433–49.
13. Hainfeld JF, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN, Adams DJ, Smilowitz HM. Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions. *Br J Radiol.* 2011; 84 (1002): 526–33. DOI: 10.1259/bjr/42612922.
14. Rousseau J, Boudou C, Estève F, Elleaume H. Convection-Enhanced Delivery of an Iodine Tracer Into Rat Brain for Synchrotron Stereotactic Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 68 (3): 943–51. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2007.01.065.
15. Le Duc G, Corde S, Charvet A-M, Elleaume H, Farion R, Le Bas J-F, et al. In Vivo Measurement of Gadolinium Concentration in a Rat Glioma Model by Monochromatic Quantitative Computed Tomography. *Invest Radiol.* 2004; 39 (7): 385–93.
16. Черепанов А. А., Липенгольц А. А., Воробьева Е. С., Кулаков В. Н., Климанов В. А., Григорьева Е. Ю. Исследование увеличения энерговыделения в среде за счет присутствия тяжелого элемента с использованием дозиметра Фрике. *Медицинская физика.* 2016; 72 (4): 38–41.

References

1. Norman A, Ingram M, Skillen RG, Freshwater DB, Iwamoto KS, Solberg T. X-ray phototherapy for canine brain masses. *Radiat Oncol Investig.* 1997; 5 (1): 8–14.
2. Rose JH, Norman A, Ingram M, Aoki C, Solberg T, Mesa A. First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999; 45 (5): 1127–32.
3. Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol.* 2004; 49 (4904): N309–15.
4. Hainfeld JF, Smilowitz HM, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine (Lond).* 2013; 8 (10): 1601–9. DOI: 10.2217/nnm.12.165.
5. Lipengolts AA, Cherepanov AA, Kulakov VN, Grigorieva EY, Sheino IN, Klimanov VA. Antitumor efficacy of extracellular complexes with gadolinium in Binary Radiotherapy. *Appl Radiat Isot.* 2015 Dec 1; 106: 233–6. DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.07.051.
6. Kulakov VN, Lipengolts AA, Grigorieva EYu, Shimanovskii NL. [Pharmaceuticals for Binary Radiotherapy and Their Use for the Treatment of Malignancies (A Review)]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 2016; 50 (6): 19–25. Russian.
7. Adam J, Vautrin M, Obeid L, Tessier A, Prezado Y, Renier M, et al. Contrast-enhanced Synchrotron Stereotactic Radiotherapy Clinical Trials from a Medical Physicist Point of View. *Int J Radiat Oncol.* 2014; 90 (1): S16–7.
8. Solberg TD, Iwamoto KS, Norman A. Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours. *Phys Med Biol.* 1992 Feb; 37 (2): 439–43.
9. Cho SH. Estimation of tumour dose enhancement due to gold

- nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. *Phys Med Biol.* 2005; 50 (15): N163–73. DOI: 10.1088/0031-9155/50/15/N01.
10. Roeske JC, Nunez L, Hoggarth M, Labay E, Weichselbaum RR. Characterization of the Theoretical Radiation Dose Enhancement from Nanoparticles. *Technol Cancer Res Treat.* 2007; 6 (5): 395–401.
 11. Verhaegen F, Reniers B, Deblois F, Devic S, Seuntjens J, Hristov D. Dosimetric and microdosimetric study of contrast-enhanced radiotherapy with kilovolt x-rays. *Phys Med Biol.* 2005; 50 (15): 3555–69. DOI: 10.1088/0031-9155/50/15/005.
 12. Robar JL, Riccio SA, Martin MA. Tumour dose enhancement using modified megavoltage photon beams and contrast media. *Phys Med Biol.* 2002; 47 (14): 2433–49.
 13. Hainfeld JF, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN, Adams DJ, Smilowitz HM. Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions. *Br J Radiol.* 2011; 84 (1002): 526–33. DOI: 10.1259/bjr/42612922.
 14. Rousseau J, Boudou C, Estève F, Elleaume H. Convection-Enhanced Delivery of an Iodine Tracer Into Rat Brain for Synchrotron Stereotactic Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 68 (3): 943–51. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2007.01.065.
 15. Le Duc G, Corde S, Charvet A-M, Elleaume H, Farion R, Le Bas J-F, et al. In Vivo Measurement of Gadolinium Concentration in a Rat Glioma Model by Monochromatic Quantitative Computed Tomography. *Invest Radiol.* 2004; 39 (7): 385–93.
 16. Cherepanov AA, Lipengolts AA, Vorobyeva ES, Kulakov VN, Klimanov VA, Grigorieva EYu. [Experimental study of x-rays absorbed dose increase in medium containing high-Z element using fricke dosimeter]. *Meditinskaya fizika.* 2016; 72 (4): 38–41. Russian.

ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *GJB2* И *GALT*, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТИ И ГАЛАКТОЗЕМИИ

Д. Д. Абрамов¹✉, М. В. Белоусова², В. В. Кадочникова², А. А. Рагимов³, Д. Ю. Трофимов¹

¹ ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

² ГНЦ Институт иммунологии, Москва

³ Центр крови,

Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

Статья продолжает цикл работ, посвященных определению частоты носительства в российской популяции мутаций, ассоциированных с развитием распространенных моногенных заболеваний. Целью исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *GJB2* и *GALT* у доноров первичной кроводачи. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации, обнаружены 37 носителей мутаций в гене *GJB2*, ассоциированных с развитием нейросенсорной тугоухости (частота в выборке составила 3,7 %, или 1 : 27), и 6 носителей мутаций в гене *GALT*, ассоциированных с развитием галактоземии (частота в выборке — 0,6 %, или 1 : 167). Выявлен 1 случай сочетанного носительства мутаций, и, таким образом, всего обнаружены 42 носителя мутаций в генах *GJB2* и *GALT* (частота в выборке — 4,2 %, или 1 : 24).

Ключевые слова: тугоухость, *GJB2*, галактоземия, *GALT*, генотипирование, российская популяция

✉ **Для корреспонденции:** Абрамов Дмитрий Дмитриевич
Каширское ш., д. 24, корп. 2, г. Москва, 115478; d.d.abramov@mail.ru

Статья получена: 06.12.2016 Статья принята в печать: 12.12.2016

CARRIER FREQUENCY OF *GJB2* AND *GALT* MUTATIONS ASSOCIATED WITH SENSORINEURAL HEARING LOSS AND GALACTOSEMIA IN THE RUSSIAN POPULATION

Abramov DD¹✉, Belousova MV², Kadochnikova VV², Ragimov AA³, Trofimov DY¹

¹ DNA-Technology LLC, Moscow, Russia

² National Research Center — Institute of Immunology, Moscow, Russia

³ Blood Center,

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

This article continues a series of works estimating carrier frequencies of mutations associated with the development of common monogenic disorders in the Russian population. The study aimed to establish the frequency of *GJB2* and *GALT* mutations in first-time blood donors. Genotyping of 1000 first-time blood donors who identify themselves as Russians and permanently reside in the Russian Federation detected 37 carriers of *GJB2* mutations associated with sensorineural hearing loss (carrier frequency in the sample was 3.7 %, or 1 : 27) and 6 carriers of *GALT* mutations associated with galactosemia (carrier frequency in the sample was 0.6 %, or 1 : 167). In one carrier, concurrent mutations were detected; thus, in total 42 carriers of *GJB2* and *GALT* mutations were detected (carrier frequency in the sample was 4.2 %, or 1 : 24).

Keywords: sensorineural hearing loss, *GJB2*, galactosemia, *GALT*, genotyping, Russian population

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry Abramov
Kashirskoe sh., d. 24, korp. 2, Moscow, Russia, 115478; d.d.abramov@mail.ru

Received: 06.12.2016 Accepted: 12.12.2016

Нейросенсорная несиндромальная тугоухость — наследственное заболевание (OMIM #220290), связанное с врожденным нарушением слуховой функции. Среди наследственных нарушений слуха в развитых странах чаще всего встречается аутосомно-рецессивная несиндромальная тугоухость, связанная с мутацией в гене *GJB*, кодирующем белок коннексин 26. Известно более 90 мутаций гена *GJB2*, ассоциированных с тугоухостью, однако для популяций России и Европы наиболее значимой является мутация 35delG, приводящая к появлению преждевременного стоп-кодона. Частота носительства мутации *GJB2*:35delG

может варьировать от 1 : 100 до 1 : 30 для европейских популяций и от 1 : 50 до 1 : 25 для некоторых российских популяций [1–5].

Галактоземия — наследственное заболевание, обусловленное пониженной активностью ферментов, участвующих в превращении галактозы в глюкозу. Галактоза поступает в организм с пищей в составе дисахарида лактозы (молочный сахар). Считают, что патологические повреждения обусловлены накоплением в клетках больных больших количеств галактозо-1-фосфата, что приводит к нарушению клеточного метаболизма. Наибольшие изменения

возникают в печени, почках, хрусталике глаза, мозге. Без лечения больные погибают в первые месяцы жизни от инфекций, сепсиса или печеночной недостаточности, у всех больных развивается умственная отсталость с характерными нарушениями речи (хаотичная речь). При раннем назначении диеты дети могут развиваться нормально. В основе патогенеза болезни — снижение активности фермента галактозо-1-фосфат уридилтрансферазы, обусловленное мутациями в гене *GALT*. В норме фермент катализирует продукцию глюкозо-1-фосфата и уридилдифосфат-галактозы из галактозо-1-фосфата и уридилдифосфат-глюкозы. Галактоземия наследуется по аутосомно-рецессивному типу, в российской популяции встречается в среднем у 1 на 20 000 новорожденных. Наиболее значимыми для российской популяции являются мутации Q188R, K285N, M142K, L358P, IVS3-2A>C [6, 7].

Целью данного исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *GJB2* и *GALT* у доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для настоящего исследования использовали коллекцию периферической крови 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских).

Выделение ДНК проводили из 0,1 мл периферической крови при помощи набора реагентов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» («ДНК-Технология», Россия). Методика выделения основана на лизисе биоматериала с последующими сорбцией ДНК на носителе, отмывке примесей, элюцией ДНК с сорбента. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования либо хранили при -20°C . Концентрация ДНК, определенная на специализированном флуориметре Qubit (Invitrogen, США), составляла в среднем 50–100 мкг/мл.

Определение замен одиночных нуклеотидов проводили с использованием комплекта реагентов «Скрининг моногенных заболеваний» («ДНК-Технология», Россия). Принцип их действия основан на применении метода примыкающих проб (adjacent probes, kissing probes) [8, 9]. Комплект реагентов позволяет выявлять 5 мутаций в гене *GJB2*, ассоциированные с развитием несиндромальной нейросенсорной тугоухости, а также 1 мутацию в гене *GALT*, ассоциированную с развитием галактоземии.

В каждый из комплектов реагентов входят амплификационные смеси для определения конкретной мутации. Каждая из смесей содержит праймеры, общие для дикого и мутантного вариантов нуклеотидной последовательности, один общий олигонуклеотид с гасителем флуоресценции и два сиквенс-специфичных олигонуклеотида (пробы), несущих различные флуорофоры. Олигонуклеотидные пробы, соответствующие тому или иному варианту последовательности, мечены различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта в одной пробирке.

При идентификации замен одиночных нуклеотидов проводили ПЦР, затем понижали температуру реакционной смеси для гибридизации полученной матрицы с олигонуклеотидными пробами. Определение генотипа выполняли после ПЦР и гибридизации путем измерения уровня флуоресценции в ходе температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидов и полученных матриц. Данное

измерение проходило в режиме «реального времени», в результате были получены кривые плавления (рисунок). Если анализируемый образец содержал только один вариант нуклеотидной последовательности гена, т. е. был гомозиготен по данному полиморфизму, температура плавления для пробы, образующей совершенный дуплекс, была существенно выше, нежели для пробы, образующей несовершенный дуплекс. Если же анализировали гетерозиготный образец, содержащий оба варианта нуклеотидной последовательности, оба варианта проб могли образовать совершенный дуплекс, поэтому температуры их плавления были практически одинаковы.

Применяемый подход выгодно отличается от большинства молекулярно-генетических методов определения полиморфизмов одиночных нуклеотидов, в т. ч. использующих технологию TaqMan. Определение генотипа происходит дважды, независимо по двум каналам флуоресценции, что существенно повышает надежность генотипирования и практически нереализуемо другими способами.

Полимеразную цепную реакцию и определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с помощью детектирующего амплификатора DTprime («ДНК-Технология», Россия). Использовали следующий температурный режим амплификации: 94°C — 10 с, 64°C — 30 с в течение 50 циклов. По завершении реакции амплификации реакционную смесь остужали до 25°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Кривые плавления получали следующим образом: температуру реакционной смеси повышали с 25°C до 75°C с шагом в 1°C , измеряя уровень флуоресценции на каждом шаге. В ходе выполнения работы применяли комплекс отечественного оборудования для автоматизирования основных этапов проведения исследований, что позволило проводить генотипирование до 100 образцов по 40 мутациям в день.

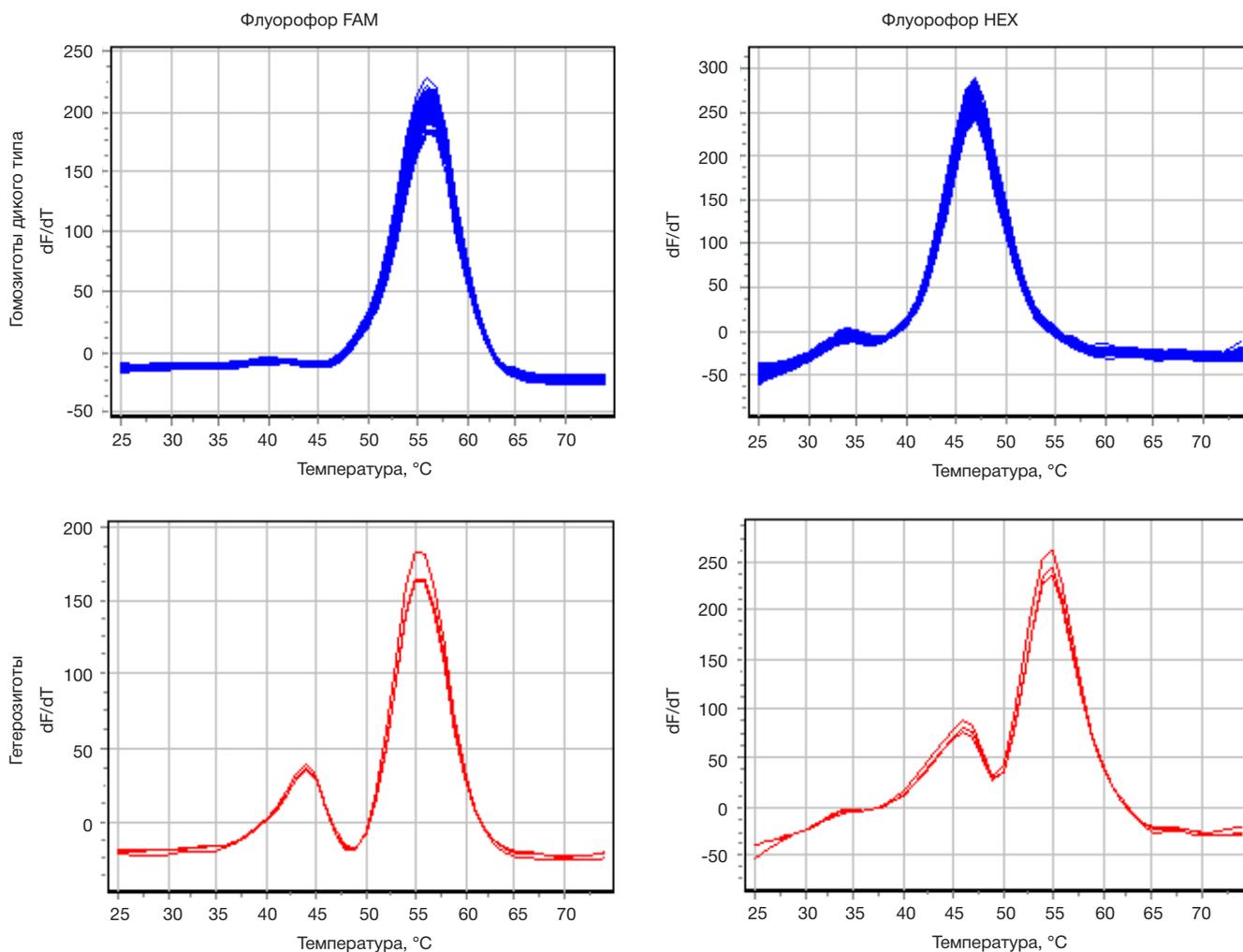
В качестве подтверждающего метода проводили выборочное автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), использовали реактивы и рекомендации производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты по частотам встречаемости мутаций в генах *GJB2* и *GALT* у 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации) представлены в таблице. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи были обнаружены 37 носителей мутаций в гене *GJB2*, ассоциированных с развитием нейросенсорной тугоухости (частота в выборке составила 3,7 %, или 1 : 27) и 6 носителей мутаций в гене *GALT*, ассоциированных с развитием галактоземии (частота в выборке — 0,6 %, или 1 : 167). Выявлен 1 случай сочетанного носительства мутаций. Всего обнаружены 42 носителя мутаций в генах *GJB2* и *GALT* (частота в выборке — 4,2 %, или 1 : 24).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Всего обнаружены 42 носителя мутаций в генах *GJB2* и *GALT* (частота в выборке — 4,2 %, или 1 : 24), при этом



Кривые плавления для различных вариантов генотипа, полученные при определении мутации Q188R в гене *GALT*

в нашем исследовании выявлен 1 случай сочетанного носительства мутаций. Результаты настоящего исследования в целом согласуются с опубликованными данными для российской популяции [1, 3–5], но нами была получена несколько более высокая, чем в среднем для европейских популяций, частота носительства мутации *GJB2*:35delG — единственной из обнаруженных в данном исследовании мутаций, ассоциированных с несиндромальной тугоухостью.

Выводы

В результате исследования были установлены частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *GJB2* и *GALT* у здоровых индивидов. Всего обнаружены 42 носителя мутаций (частота в выборке — 4,2 %, или 1 : 24). Подобная достаточно высокая частота распространения носительства наследственных заболеваний позволяет сделать предположение о необходимости проведения не только неонатального скрининга, но и молекулярно-генетической диагностики в составе комплекса мероприятий при планировании беременности, в том числе при решении вопроса о применении вспомогательных репродуктивных технологий для преодоления бесплодия.

Наиболее подходящей платформой для таких исследований является ПЦР «в реальном времени». Данный подход открывает принципиально новые возможности для массового высокопропускного генотипирования, позволяет роботизировать работу лаборатории при высокой надежности получаемых результатов.

Выявленные гетерозиготы по мутациям в генах *GJB2*, *GALT*, а также случаи сочетанного носительства мутаций у 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских

Мутация	Выявлено гетерозигот
В гене <i>GJB2</i>	
35delG	37
167delT	0
235delC	0
313_326del14	0
358_360delGAG	0
В гене <i>GALT</i>	
Q188R	6
Сочетание мутаций	
<i>GJB2</i> :35delG + <i>GALT</i> :Q188R	1

Литература

1. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG*. *Eur J Hum Genet*. 2000 Jan; 8 (1): 19–23.
2. Некрасова Н. Ю., Шагина И. А., Петрин А. Н., Поляков А. В. Частота мутации 35delG в гене коннексина 26 у детей страдающих ранней детской нейросенсорной тугоухостью. *Мед. ген.* 2002; 1 (6): 290–4.
3. Anichkina A, Kulenich T, Zinchenko S, Shagina I, Polyakov A, Ginter E, et al. On the origin and frequency of the 35delG allele in GJB2-linked deafness in Europe. *Eur J Hum Genet*. 2001 Feb; 9 (2): 151.
4. Джемилева Л. У., Посух О. Л., Барашков Н. А., Федорова С. А., Терютин Ф. М., Ахметова В. Л. и др. Оценка гаплотипического разнообразия и реконструкция предкового гаплотипа, ассоциированного с мутацией с.35delG гена GJB2 (Cx26), в популяциях Волго-Уральского региона. *Acta Naturae*. 2011; 3 (10): 54–65.
5. Джемилева Л. У., Барашков Н. А., Посух О. Л., Хусаинова

6. Яблонская М. И., Новиков П. В., Боровик Т. Э., Бушueva Т. В., Захарова Е. Ю., Денисенкова Е. В. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению галактоземии. М.: Минздрав России; 2013. 20 с.
7. Матулевич С. А. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни обмена как часть системы медико-генетической помощи населению [автореф. диссертации]. М.: Медико-генетический научный центр РАМН; 2009. 44 с.
8. Кофиади И. А., Ребриков Д. В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. *Генетика*. 2006; 42 (1): 22–32.
9. Сергеев И. В., Хайтов М. Р., Трофимов Д. Ю., Абрамов Д. Д., Грудаква Е. Г., Гончарова Е. В. и др. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа. *Физиол. и патол. иммун. системы*. 2009; 13 (4): 21–6.

References

1. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG*. *Eur J Hum Genet*. 2000 Jan; 8 (1): 19–23.
2. Nekrasova NYu, Shagina IA, Petrin AN, Polyakov AV. Chastota mutatsii 35delG v gene konneksina 26 u detei stradayushchikh rannei detskoj neirosensornoj tugoukhost'yu. *Meditinskaya genetika*. 2002; 1 (6): 290–4. Russian.
3. Anichkina A, Kulenich T, Zinchenko S, Shagina I, Polyakov A, Ginter E, et al. On the origin and frequency of the 35delG allele in GJB2-linked deafness in Europe. *Eur J Hum Genet*. 2001 Feb; 9 (2): 151.
4. Dzhemileva LU, Posukh OL, Barashkov NA, Fedorova SA, Teryutin FM, Akhmetova VL, et al. Haplotype Diversity and Reconstruction of Ancestral Haplotype Associated with the c.35delG Mutation in the GJB2 (Cx26) Gene among the Volgo-Ural Populations of Russia. *Acta Naturae*. 2011; 3 (10): 52–63.
5. Dzhemileva LU, Barashkov NA, Posukh OL, Khusainova RI, Akhmetova VL, Kutuev IA, et al. Analiz geterozigotnogo nositel'stva mutatsii 35delG, 235delC, i 167delT v gene GJB2 v

- populyatsiyakh Evrazii. *Meditinskaya genetika*. 2009; 8: 20–8. Russian.
6. Yablonskaya MI, Novikov PV, Borovik TE, Bushueva TV, Zakharova EYu, Denisenkova EV. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu galaktozemii. Moscow: Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 2013. 20 p. Russian.
7. Matulevich SA. Massovyi skringing novorozhdennykh na nasledstvennye bolezni obmena kak chast' sistemy mediko-geneticheskoi pomoshchi naseleniyu [abstract of dissertation]. Moscow: Mediko-geneticheskii nauchnyi tsentr RAMN; 2009. 44 p. Russian.
8. Kofiadi IA, Rebrikov DV. Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: Allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe. *Russ J Genet*. 2006; 42 (1): 16–26.
9. Sergeev IV, Khaitov MR, Trofimov DYU, Abramov DD, Grudakova EG, Goncharova EV, et al. Razrabotka metodov dlya provedeniya shirokomasshtabnykh issledovaniy polimorfizma genov, reguliruyushchikh razlichnye komponenty immunnogo otveta. *Fiziologiya i patologiya immunnoi sistemy*. 2009; 13 (4): 21–6. Russian.

КРИТЕРИИ ОТБОРА ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К МНОГОФАКТОРНЫМ ФЕНОТИПИЧЕСКИМ ОСОБЕННОСТЯМ

И. И. Низамутдинов¹✉, Д. О. Коростин¹, В. В. Ильинский¹, А. С. Ракитко^{1,2}

¹ ООО «Генотек», Москва

² Кафедра теории вероятностей, механико-математический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Принцип наследования многофакторных фенотипических особенностей (МФО) заключается в наличии значительного количества генетических маркеров, каждый из которых вносит некоторый вклад в вероятность развития данной особенности. В данной работе предложен алгоритм отбора ДНК-маркеров с целью разработки прогностических тест-систем для определения индивидуальной предрасположенности к МФО. Метод заключается в отборе генетических маркеров, показавших статистически достоверную ассоциацию с данной МФО, а также функционально значимые полиморфизмы, для которых описаны механизмы влияния на развитие МФО. Если функциональная значимость полиморфизма не описана, критерием его статистически достоверной ассоциации с МФО является достижение полногеномной значимости в одном из исследований и подтверждение данной ассоциации на независимой выборке. Научные публикации, используемые для оценки ассоциации генетических маркеров с МФО, в зависимости от типа исследования должны соответствовать приведенным критериям.

Ключевые слова: генетический маркер, мультифакториальная болезнь, однонуклеотидный полиморфизм, критерии отбора, полногеномное исследование, функциональная значимость, метаанализ, исследование случай–контроль

✉ **Для корреспонденции:** Низамутдинов Игорь Игоревич
пер. Наставнический, д. 17, стр. 1, корп. 15, г. Москва, 105120; igor@genotek.ru

Статья получена: 16.12.2016 **Статья принята к печати:** 21.12.2016

CRITERIA FOR THE SELECTION OF GENETIC MARKERS IN THE ASSESSMENT OF PREDISPOSITION TO MULTIFACTORIAL TRAITS

Nizamutdinov II¹✉, Korostin DO¹, Il'inskii VV¹, Rakitko AS^{1,2}

¹ Genotek Inc, Moscow, Russia

² Department of Probability Theory, Faculty of Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The principle of multifactorial traits (MTs) inheritance relies on the presence of a large number of genetic markers, with each marker contributing to the probability of developing those traits. This work proposes an algorithm for the selection of DNA markers that could be used to develop a prognostic test system for the assessment of individual predisposition to MTs. The method is based on the selection of genetic markers that have demonstrated a statistically significant association with an MT under consideration and have been described as functionally significant polymorphisms affecting MT development. If the functional significance of a polymorphism has not been described so far, then to be reliably associated with an MT, this polymorphism is expected to achieve genome-wide significance in one of the studies and such significance must be confirmed in an independent sample. Papers that are used to assess the association of genetic markers with MTs are expected to meet the proposed criteria depending on the study type.

Keywords: genetic marker, multifactorial disease, single nucleotide polymorphism, selection criteria, genome-wide association study, functional significance, meta-analysis, case-control study

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor Nizamutdinov
per. Nastavnicheskii, d. 17, str. 1, korp. 15, Moscow, Russia, 105120; igor@genotek.ru

Received: 16.12.2016 **Accepted:** 21.12.2016

Генетическое тестирование — важный элемент персонализированной медицины, позволяющий выявлять риски развития широко распространенных заболеваний и особенности функционирования организма. Информация о генетической предрасположенности может быть использована для подбора методов индивидуальной профилактики и ранней диагностики заболеваний, коррекции образа жизни, а также при составлении плана питания и физических упражнений.

Индивидуальная предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям, например, может быть вызвана нарушениями в большом количестве систем организма: изменениями коагуляционных свойств крови, дислипидемией, нарушениями в ренин-ангиотензиновой системе, повышением уровня гомоцистеина, рядом врожденных состояний, значительно повышающих риск сердечно-сосудистых патологий (болезни Фабри, Моямая и пр.). Большинство таких нарушений обусловлено генетическими

факторами, что создает возможности для индивидуальной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, нацеленной на устранение факторов риска, свойственных конкретному индивиду. В случае отсутствия профилактики информация о генетической предрасположенности может быть полезна для ранней диагностики и более пристального наблюдения за симптомами болезни. Например, известно, что некоторые мутации в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* или *EPCAM* могут повышать риск развития колоректального рака более чем в 10 раз [1]. Данная форма рака хорошо поддается лечению на ранних стадиях, с пятилетней выживаемостью пациентов около 94 %, и практически неизлечима на IV стадии. Помимо ранней диагностики и профилактики заболеваний информация о генетических факторах может быть использована для коррекции образа жизни. Например, известно, что полиморфизм гена *GC*, продукт которого отвечает за связывание и транспорт кальциферола и его метаболитов, может приводить к пониженной концентрации витамина D и его метаболитов в крови [2]. Увеличение в рационе количества продуктов, содержащих витамин D, может компенсировать данную генетическую особенность.

При занятиях фитнесом и спортом также важно учитывать генетические факторы. Например, в случае высокой генетической предрасположенности к варикозной болезни вен из программы тренировок необходимо исключить упражнения, сопровождающиеся сильным натуживанием.

Завершение проекта «Геном человека» привело к активному развитию направления индивидуального генетического тестирования. Прогностические тест-системы, выявляющие наличие ДНК-маркеров, ассоциированных с различными фенотипическими особенностями и заболеваниями, находят широкое применение во всем мире. Одним из существенных ограничений разработки таких тест-систем является проблема перехода от теории к практике (*from bench to bedside*) [3]: ассоциация генетических маркеров с фенотипическими особенностями демонстрируется в научных исследованиях путем изучения больших выборок людей, соответственно, возникает задача интерпретации наличия данных маркеров у конкретного человека.

Другая значительная проблема — это количество генетических маркеров, которое необходимо использовать при разработке тест-систем для определения индивидуальной предрасположенности к многофакторным фенотипам. Использование всех маркеров, для которых была показана ассоциация с исследуемой особенностью, неизбежно приводит к снижению специфичности тест-системы и повышению ее стоимости. В то же время небольшое количество используемых маркеров негативно сказывается на чувствительности и снижает прогностические свойства тест-системы. В настоящее время существует несколько подходов для решения указанных проблем.

Одним из подходов создания генетических тест-систем является учет небольшого количества ДНК-маркеров, статистически достоверная ассоциация которых была показана во многих исследованиях. Например, при оценке индивидуального риска инфаркта миокарда могут учитываться генетические маркеры в генах-кандидатах *eNOS* и *CX37* [4], при этом игнорируется возможность наличия у индивида других генетических маркеров, таких как мутация Лейдена, значительно повышающая риск развития этого острого состояния [5]. Подобный подход не позволяет полноценно оценить наличие всевозможных нарушений, приводящих к заболеванию, и, как следствие, имеет

невысокую чувствительность. С другой стороны, на сегодняшний день известно более 400 генетических маркеров, статистически значимая ассоциация которых с инфарктом миокарда была продемонстрирована в некоторых исследованиях типа случай-контроль. Учет всех известных генетических маркеров ограничивает набор лабораторных методов, которые можно использовать при анализе. Наиболее доступные для большинства лабораторий методы (ПЦР «в реальном времени», анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов и ряд других методов) при поточной работе подходят для тестирования небольшого количества генетических маркеров (нескольких десятков). Увеличение числа тестируемых маркеров приводит либо к увеличению времени анализа указанными выше методами, либо значительному повышению стоимости тест-системы из-за использования более дорогих технологий (ДНК-микрочипов).

Кроме того, использование большого количества генетических маркеров приводит к проблеме переобучения: хороших прогностических свойств алгоритма на обучающей выборке, но низкой чувствительности и специфичности на общей популяции.

В настоящей работе предлагается алгоритм отбора и оценки генетических маркеров с целью разработки прогностических тест-систем развития многофакторных фенотипических особенностей (МФО). Основная идея и особенность метода заключается в том, что отбор проходят не только те генетические маркеры, которые показали полногеномную ассоциацию, но и маркеры, не достигшие статистической значимости после поправки на множественность в полногеномных исследованиях, однако удовлетворяющие некоторым иным критериям (в частности, критерию функциональной значимости). Статья посвящена описанию и обсуждению данных критериев.

Выбор фенотипических особенностей

Фенотипические особенности (ФО) условно можно разделить на четыре типа: с низким или нулевым вкладом генетических факторов в формирование данной особенности, моногенные, полигенные и мультифакторные. В соответствии с настоящими критериями мы предлагаем разработывать генетические тест-системы только для ФО, наследуемость которых не ниже 30 %. Меньшее значение наследуемости свидетельствует о преобладании факторов внешней среды в формировании ФО, вероятность развития которой должна оцениваться исходя из образа жизни и условий окружающей среды.

За формирование моногенных особенностей отвечает мутация одного гена, примерами могут служить моногенные заболевания (муковисцидоз, фенилкетонурия). При разработке тест-систем для определения возможности развития моногенных ФО необходимо учитывать пенетрантность известных мутаций и процент случаев проявления фенотипа, за который они ответственны.

Полигенные особенности развиваются в результате полиморфизма большого количества генов, каждый из которых вносит некоторый вклад в их формирование. Примером полигенной особенности является цвет глаз, который почти полностью определяется генетическими факторами [6].

В данной работе мы не будем рассматривать подобные ФО, а сосредоточимся на мультифакторных признаках, в которые соизмеримый вклад вносят как генетические факторы, так и факторы внешней среды. При разработке

тест-систем для оценки вероятности развития у индивида мультифакторных особенностей необходимо оценивать статистическую значимость ассоциации генетических маркеров с исследуемой ФО и их функциональное влияние на проявление данной особенности.

Оценка статистической значимости ассоциации генетических маркеров

В настоящее время для широко распространенных МФО известно большое количество генетических маркеров. В исследованиях, посвященных изучению роли генетических факторов в развитии МФО, статистические параметры, характеризующие степень ассоциации генетических маркеров с МФО, и *p*-значение рассчитываются отдельно для каждого маркера. Степень ассоциации полиморфизма может быть охарактеризована различными статистическими параметрами, но в большинстве случаев это соотношение шансов (ОШ), относительный риск, бета-коэффициент или частоты аллелей среди больных и здоровых.

Параметром, определяющим достоверность полученных различий между людьми с МФО и без нее, является *p*-уровень значимости. Общепринятым критерием для заключения, что обнаруженные различия не случайны, является значение $p < 0,05$ [7]. При тестировании нескольких гипотез (исследовании нескольких полиморфных локусов) необходимо корректировать порог *p*-значения методом Бонферрони. В дальнейшем мы будем подразумевать необходимость наличия данной поправки при оценке статистической значимости генетического маркера.

В случае отсутствия функциональной значимости полиморфизма (см. раздел ниже) достоверно ассоциированными с МФО необходимо считать генетические маркеры, ассоциация которых была продемонстрирована в полногеномных исследованиях (GWAS), достигла полногеномной значимости ($p < 5 \cdot 10^{-8}$) и была подтверждена на независимой выборке [8].

Оценка функциональной значимости генетических маркеров

Функциональная значимость полиморфизма оценивается путем анализа его влияния на формирование исследуемой особенности. Например, при разработке тест-систем для оценки индивидуального риска развития заболевания необходимо учитывать генетические маркеры, вовлеченные в патогенез. Важность данного подхода обусловлена тем, что некоторые редко встречающиеся генетические маркеры не достигают полногеномной значимости и, соответственно, отсеиваются в ходе GWAS. Для заключения о наличии функциональной значимости маркера необходимо, чтобы он соответствовал одному из следующих критериев.

1) Известен механизм влияния генетического полиморфизма на формирование МФО

Данные полиморфизмы находятся в генах-кандидатах, для которых установлена вовлеченность в механизм формирования МФО. Например, продукт гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) играет важную роль в метаболизме витамина В9: катализирует процесс образования активной формы фолиевой кислоты, необходимой для превращения гомоцистеина в метионин. Полиморфизм

rs1801133 приводит к аминокислотной замене в белке *MTHFR*, что снижает его сродство к субстрату и, как следствие, приводит к снижению метаболизма гомоцистеина [9]. Нарушение метаболизма гомоцистеина является фактором риска развития гипергомоцистеинемии. При этом важно отметить, что наличие данного полиморфизма — не единственный фактор риска развития данного заболевания и в случае отсутствия других факторов не гарантирует его развитие.

2) Известен опосредованный механизм влияния генетического полиморфизма на формирование МФО

Например, полиморфизм *rs1799983* в гене эндотелиальной NO-синтазы является миссенс-мутацией, приводит к нарушению процессинга белка, что в итоге ведет к снижению активности фермента. Измененный белок синтезирует меньшее количество оксида азота (II), необходимого для вазодилатации сосудов. Это приводит к повышению давления и является фактором риска развития гипертонии [10]. Повышенное артериальное давление также является рисковым фактором ишемической болезни сердца (путем сужения просвета сосудов и развития эндотелиальной дисфункции). Данный полиморфизм может быть рассмотрен как генетический маркер, ассоциированный с риском развития ишемии.

Ассоциация всех функционально значимых маркеров с фенотипическими особенностями должна быть экспериментально подтверждена в исследованиях типа случай–контроль.

Критерии отбора научных публикаций

Научные публикации, посвященные анализу ассоциации генетического полиморфизма с фенотипическими особенностями, можно разделить на три типа: исследования случай–контроль и исследования количественных параметров, метаанализы и обзорные статьи.

Поскольку обзорные статьи не проводят статистического анализа ассоциации генетических маркеров с исследуемыми МФО, они должны быть исключены из рассмотрения при анализе целесообразности включения генетических маркеров в разрабатываемые тест-системы. В то же время данный тип публикаций может быть использован при составлении изначального списка генетических маркеров, которые в дальнейшем анализируются в соответствии с настоящими критериями.

В исследованиях случай–контроль анализируется ассоциация генетических маркеров с каким-либо заболеванием или физиологическим свойством организма путем сравнения частот аллелей среди людей с МФО и контрольной группой. Данные исследования делятся на два типа: полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) и исследования ассоциации полиморфизма некоторых генов-кандидатов с МФО.

Полногеномный поиск ассоциаций — направление биологических исследований, связанных с поиском различий между геномами людей с определенными фенотипическими характеристиками и без них. В данных исследованиях проводится анализ ассоциации генетических маркеров, распределенных по всему геному с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности.

В работах, посвященных исследованию ассоциации отдельных генов с МФО, ограничен набор исследуемых

генетических маркеров, и внимание сосредоточено на генах с известным или предполагаемым механизмом вовлеченности в развитие данных МФО.

Метаанализ — это исследование, в котором проводится анализ наличия ассоциации путем обобщения данных множества исследований. Основной принцип метаанализа — все исследования, включенные в анализ, должны проверять одну и ту же гипотезу.

В силу специфики различных типов исследований критерии, применяемые для отбора научных публикаций, несколько различаются.

Для уменьшения отбора генетических маркеров, для которых в ходе GWAS был получен ложноположительный результат, необходимо чтобы исследования соответствовали следующим критериям [11]:

1. В первичном полногеномном исследовании должно быть не менее 750 пациентов. Меньшие размеры выборки могут приводить к некорректной работе статистических тестов и, как следствие, увеличению количества ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

2. Необходимо учитывать только генетические маркеры с $p < 0,01$.

3. Обнаруженные ассоциации должны быть подтверждены хотя бы в одном исследовании (в случае редких болезней подтверждения может и не быть). При этом необходимо, чтобы в этих исследованиях: $p < 0,01$; 95 % доверительные интервалы для ОШ должны пересекаться во всех исследованиях; публикации должны быть в журналах с импакт-фактором > 2 .

Публикации, посвященные исследованию влияния полиморфизма небольшого числа генов на развитие МФО, должны включать следующие условия:

1. Данные должны быть получены при исследовании тканей (прижизненная биопсия, материал аутопсии, послеоперационный материал) или биологических жидкостей участников.

2. Ассоциации должны быть экспериментально получены в рассматриваемой научной публикации. Публикации, в которых авторы цитируют выводы других авторов относительно исследуемых генетических маркеров, необходимо исключить из анализа.

3. $p < 0,05$.

4. Размеры выборки участников должны быть достаточно велики для возможности обнаружения ассоциации генетических маркеров с определенными частотами встречаемости [12].

5. Если есть несколько публикаций, в которых исследовали ассоциацию данного генетического маркера с риском развития заболевания, то для анализа выбирают: а) более раннюю (например, из двух статей 2009 и 2015 гг. — статью за 2015 г.); б) в которой исследование проводилось на большем количестве образцов.

При наличии метаанализа, посвященного исследованию ассоциации генетических маркеров с формированием МФО, полученные в нем данные являются приоритетными. При этом необходимо учитывать информацию, приведенную только в метаанализах высокого уровня, соответствующих следующим критериям [13]:

1. В настоящий момент не описаны четкие механизмы влияния исследованных в метаанализе генетических маркеров на патогенез заболевания. Если такие механизмы известны, то необходим анализ функциональной значимости полиморфизма.

2. В исследовании проведен сравнительный поиск литературы. Критерии отбора научных публикаций для ме-

таанализа должны подразумевать включение как публикаций, в которых ассоциация полиморфизма с заболеванием была подтверждена, так и тех, в которых ассоциация была опровергнута.

3. Указаны источники информации и ключевые слова, по которым проводился поиск.

4. Анализ целесообразности включения в метаанализ статей, список которых был получен автоматически, должен производиться вручную.

5. Должны быть указаны и обоснованы критерии включения и исключения публикаций (объем выборки, статьи только на английском языке, демографические характеристики участников и пр.).

6. Данные исследований должны быть комбинируемыми.

7. В исследовании должен быть проведен анализ предвзятости отдельных публикаций методом воронкообразного графика или анализа чувствительности.

8. Если в метаанализе рассматривали различные популяции и статистически значимая ассоциация была показана только для европейских популяций (Caucasian), то данный генетический маркер рассматривается в качестве ДНК-маркера, ассоциированного с фенотипической особенностью, при условии анализа нескольких публикаций, в которых исследовались европейские популяции.

9. В исследованиях, в которых была обнаружена значимая ассоциация полиморфизма, 95 % доверительные интервалы для ОШ (или других статистических параметров, характеризующих степень ассоциации) должны пересекаться.

Алгоритм оценки целесообразности включения генетического маркера в тест-систему

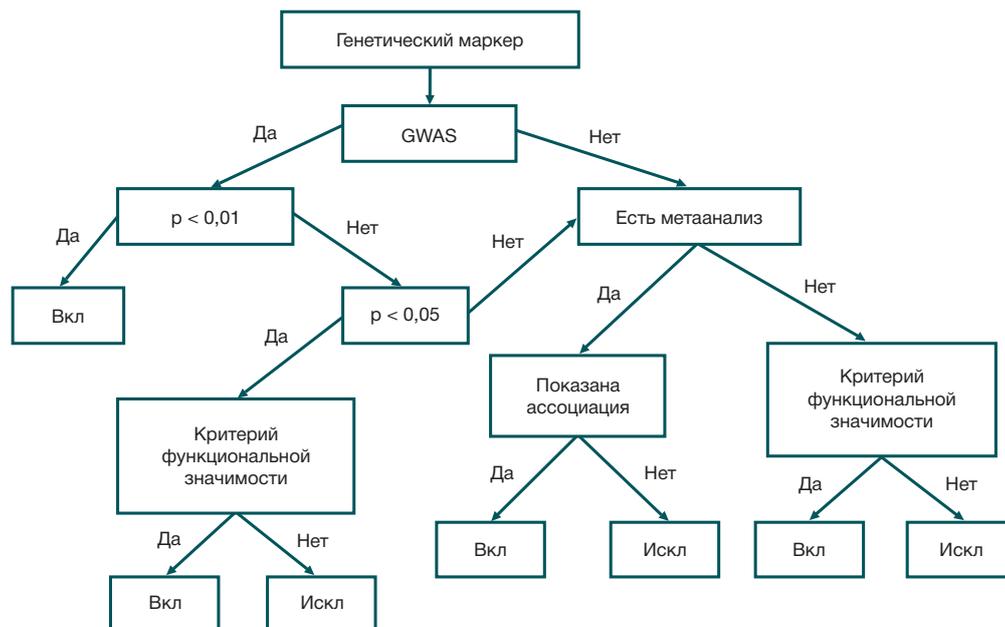
Последовательность действий при анализе необходимости включения генетических маркеров в тест-систему для определения вероятности развития МФО можно представить в виде следующей последовательности действий (рисунок).

Если ассоциацию генетического маркера исследовали в ходе GWAS и показали ее статистически достоверную значимость, а само исследование соответствовало описанным выше критериям, то такой маркер должен быть включен в тест-систему. Если же в ходе GWAS p -значение ассоциации генетического маркера оказалось больше 0,01, но меньше 0,05, то необходим анализ функциональной значимости данного маркера.

Если генетический маркер не исследовали в ходе GWAS либо отсеяли на первом этапе исследования, но был проведен метаанализ высокого уровня, который показал значимую ассоциацию с МФО, то данный генетический маркер также необходимо учитывать при разработке прогностических тест-систем. При наличии обучающей выборки необходимо убедиться, что добавление подобного маркера в тест-систему не приводит к увеличению эмпирического риска.

Если генетический маркер не исследовался в ходе GWAS и нет метаанализа его ассоциации, но при этом он функционально значим и есть исследования генов-кандидатов, подтверждающие его ассоциацию, то его также следует включать в прогностическую тест-систему.

После формирования списка генетических маркеров, которые целесообразно учитывать при разработке прогностической тест-системы, необходим анализ неравновесного сцепления генов.



Алгоритм отбора генетических маркеров для тест-систем, оценивающих индивидуальную предрасположенность к многофакторным фенотипическим особенностям

Пример составления списка генетических маркеров МФО

На сегодняшний день известно 6 генетических маркеров, ассоциация которых с риском развития ишемического инсульта достигает полногеномной значимости и была подтверждена на независимых выборках [14–16]. При этом в данный перечень не входят полиморфизмы генов *F5*, *F2*, *F7*, *F13B*, *MTHFR*, *ACE*, *APOE*, *GP1IIa*, *eNOS*, *PAI*, *GP1BA*, *ITGA2*, *ITGA2B*, *LPL*, *IL6* и *PON1*, ассоциация которых с риском развития инсульта была показана ранее при исследовании отдельных генов-кандидатов [17]. Полиморфизмы данных генов необходимо рассмотреть с позиции функциональной значимости и наличия метаанализов высокого уровня, в которых исследовалась их связь с ишемическим инсультом.

Коагуляционный фактор V (ген *F5*) является важным компонентом системы свертывания крови. Его функция заключается в активизации реакции образования тромбина из протромбина. Полиморфизм *rs6025* гена *F5*, известный также как мутация Лейдена, приводит к повышению устойчивости фермента к ингибиторам и, как следствие, к повышенной коагуляции крови. При этом был проведен метаанализ, в котором была подтверждена ассоциация данной мутации с риском развития инсульта [17]. Гиперкоагуляция является фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, включая инсульт, соответственно, данный полиморфизм также может быть рассмотрен и как функционально значимый.

Полиморфизм *rs179963* (*G20210A*) в гене протромбина (*F2*) локализован в 3'-нетранслируемой области и приводит к повышению уровня протромбина [18], что может приводить к гиперкоагуляции. Согласно результатам метаанализа [17], данный полиморфизм ассоциирован с риском развития ишемического инсульта.

Как было показано выше, полиморфизм *rs1801133* гена *MTHFR* ассоциирован с риском развития гипергомоцистеинемии. Повышенный уровень гомоцистеина — фактор риска повреждения сосудов [19]. Данный полиморфизм также был исследован в метаанализе высокого уровня, где

была показана его ассоциация с риском развития ишемического инсульта [17].

Ангиотензинпревращающий фермент играет важную роль в регуляции давления крови путем превращения ангиотензина I в ангиотензин II. Как было показано ранее, полиморфизм *rs1799752* приводит к изменению активности фермента [20], что ведет к повышению тонуса сосудов и развитию атеросклероза. Согласно результатам метаанализа [17] данный полиморфизм ассоциирован с риском развития ишемического инсульта.

Полиморфизм генов *F5*, *F2*, *MTHFR* и *ACE* необходимо учитывать при разработке тест-систем для определения индивидуального риска развития ишемического инсульта, поскольку в метаанализе высокого уровня была показана их ассоциация с данным заболеванием.

Ассоциацию полиморфизма генов *F7*, *F13B*, *APOE*, *GP1IIa*, *eNOS*, *PAI*, *GP1BA*, *ITGA2B* и *LPL* также исследовали в ходе метаанализа высокого уровня [17], однако не было обнаружено их значимой ассоциации с риском развития ишемического инсульта. Полиморфизм этих генов не следует учитывать при разработке тест-систем для определения индивидуального риска развития ишемического инсульта.

Несмотря на отсутствие ассоциации полиморфизма гена аполипопротеина E (*APOE*) с ишемическим инсультом в общей популяции, была показана его значимая ассоциация с данным заболеванием у людей в возрасте до 45 лет [21]. Полиморфизм этого гена является функционально значимым и играет важную роль в неврологических патологиях и нарушениях липидного спектра. Аллель *e4* гена *APOE* ассоциирован с повышенным уровнем общего холестерина в крови, а также толщиной комплекса интима-медиа сонной артерии. Кроме того, аллель *e4* значимо ассоциирован с риском развития некоторых неврологических заболеваний и нарушений (болезнь Альцгеймера, сотрясение мозга, более длительное восстановление после травмы головы) [22]. В нервной системе продукт гена *APOE* осуществляет выведение через гематоэнцефалический барьер β-амилоида, образующегося в результате повреждений отдельных нейронов (травмы, гематомы и пр.) и оказывающего

токсическое действие на здоровые клетки. Аллель *e4* снижает сродство APOE к β -амилоиду и, как следствие, приводит к его накоплению и гибели нейронов. Данный полиморфизм может быть рассмотрен в качестве функционально значимого, но может учитываться только при разработке тест-систем, специфичных к ранней форме ишемического инсульта.

Ген *ITGA2* кодирует $\alpha 2$ -субъединицу интегринов — белков, осуществляющих связь тромбоцитов с тканевыми белками, обнажаемыми при повреждении стенки сосудов. Образование монослоя из тромбоцитов в месте повреждения ткани сосуда является необходимым условием запуска каскада реакций свертывания крови. Полиморфизм *rs1126643 (c.759C>T)* приводит к увеличению скорости адгезии тромбоцитов и ассоциирован с риском развития тромбофилии [23]. Данный полиморфизм непосредственно влияет на скорость протекания патофизиологических процессов, являющихся факторами риска ишемического инсульта, и может быть рассмотрен в качестве функционально значимого.

Ген *IL6* кодирует интерлейкин 6 и активно экспрессируется в атеросклеротических бляшках. *IL6* совместно с другими медиаторами воспаления оказывает значительное влияние на жесткость сосудов, даже находящихся на значительном расстоянии от очага инсульта [24]. Несмотря на влияние *IL6* на развитие и прогрессирование инсульта, функциональная значимость полиморфизма *rs1800795* в этом гене не очевидна. Данный полиморфизм находится в промоторной области гена и влияет на концентрации *IL6* и C-реактивного белка. В метаанализе также не была подтверждена ассоциация этого полиморфизма с риском развития инсульта [25], поэтому его не следует рассматривать в качестве генетического маркера риска ишемического инсульта.

Параоксоназа (ген *PON1*) — фермент, играющий важную роль в предотвращении атеросклероза, препятствуя окислению липидов в ЛПНП путем их гидролиза, дифференцировке моноцитов в макрофаги, захвату макрофагами окисленных ЛПНП и превращению макрофагов в пенные клетки [26]. Полиморфизм *rs854560* приводит к снижению концентрации параоксоназы, что может быть рассмотрено как фактор риска атеросклероза и, как следствие, инсульта. Однако результаты метаанализа не подтвердили ассоциацию данного полиморфизма с риском развития инсульта [27], поэтому данный генетический маркер не должен учитываться при разработке тест-системы для определения индивидуального риска развития ишемического инсульта.

ВЫВОДЫ

В соответствии с настоящими критериями при разработке прогностических тест-систем, основанных на анализе генетического полиморфизма, отбор ДНК-маркеров необходимо осуществлять, руководствуясь их статистически значимой ассоциацией с исследуемой МФО или функциональной значимостью для проявления этой особенности.

Существующие на сегодняшний день подходы к разработке прогностических тест-систем предполагают учет

либо генетических маркеров, показавших статистически достоверную ассоциацию с МФО, либо учет некоторого числа функционально значимых полиморфизмов. Оба подхода имеют существенные недостатки, которые сказываются на прогностических свойствах тест-системы. Отбор генетических маркеров на основании статистически значимой ассоциации [11] может приводить к исключению функционально значимых полиморфизмов в процессе отправки на множественность либо из-за их сравнительно невысокой частоты встречаемости.

В то же время механизмы формирования многих МФО сегодня изучены недостаточно хорошо, поэтому не для всех ассоциированных генетических маркеров известен механизм влияния на развитие МФО. Учет только полиморфизмов, для которых установлена функциональная значимость и ассоциация которых была подтверждена в некоторых исследованиях, посвященных изучению генов-кандидатов МФО, может приводить к снижению чувствительности и специфичности разрабатываемой тест-системы. Например, оценка индивидуального риска развития ишемического инсульта только по полиморфизму гена *PDE4D* [28] будет приводить к значительному количеству ложноотрицательных результатов, поскольку, как было показано выше, полиморфизм значительно большего количества генов ассоциирован с патофизиологическими процессами, приводящими к инсульту. Данный подход также будет приводить к ложноположительным результатам, поскольку в метаанализе [29] не была подтверждена ассоциация полиморфизма гена *PDE4D* с риском развития инсульта в европейских популяциях. Функциональная значимость генетических маркеров в данном гене также не установлена.

Указанные выше недостатки устраняются в данных критериях путем анализа целесообразности включения в прогностические тест-системы обоих типов маркеров. При этом если в настоящее время не установлена функциональная значимость генетического маркера, за статистически достоверную ассоциацию принимается полногеномная ассоциация с подтверждением на независимой выборке. Данный подход позволяет уменьшить включение генетических маркеров, для которых была получена ложноположительная ассоциация. Учет данных метаанализов позволяет решить вопрос целесообразности включения в разрабатываемые тест-системы генетических маркеров, ассоциация которых не достигла полногеномной значимости в ходе GWAS. В случае отсутствия GWAS и метаанализа генетический маркер учитывается при разработке тест-системы только в случае установленного влияния на развитие МФО.

Дальнейшая валидация представленного метода будет осуществлена путем составления перечня генетических маркеров, ассоциированных с МФО в соответствии с данными критериями, а также критериями других авторов. На основании упомянутых перечней маркеров станет возможным построение нескольких предсказательных моделей в зависимости от используемых критериев. Сравнение данных моделей на реальных данных генотипирования позволит установить целесообразность использования предлагаемых критериев.

Литература

- Giardiello FM, Allen JL, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management

of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.*

- 2014 Aug; 109 (8): 1159–79.
- Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 2010 Jul 17; 376 (9736): 180–8.
 - Lin JS, Thompson M, Goddard KAB, Piper MA, Heneghan C, Whitlock EP. Evaluating genomic tests from bench to bedside: a practical framework. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2012 Oct 19; 12: 117.
 - Андреевко Е. Ю., Балацкий А. В., Бойцов С. А., Самоходская Л. М., Ткачук В. А., авторы; Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Российский кардиологический научно-производственный комплекс, патентообладатели. Способ определения наследственной предрасположенности к развитию инфаркта миокарда у лиц без клинических проявлений ишемической болезни сердца. Патент РФ № 2469096. 10.12.2012. Доступно по: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2469096&TypeFile=html
 - Dowaidar M, Settin A. Risk of myocardial infarction related to factor V Leiden mutation: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Aug; 14 (4): 493–8.
 - Bito LZ, Matheny A, Cruickshanks KJ, Nondahl DM, Carino OB. Eye color changes past early childhood. *The Louisville Twin Study. Arch Ophthalmol*. 1997 May; 115 (5): 659–63.
 - Nuzzo R. Scientific method: statistical errors. *Nature*. 2014 Feb 13; 506 (7487): 150–2.
 - Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*. 2008 Mar 19; 299 (11): 1335–44.
 - Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*. 2015 Jul 7; 132 (1): e6–9.
 - Kingah PL, Luu HN, Volcik KA, Morrison AC, Nettleton JA, Boerwinkle E. Association of NOS3 Glu298Asp SNP with hypertension and possible effect modification of dietary fat intake in the ARIC study. *Hypertens Res*. 2010 Feb; 33 (2): 165–9.
 - Hsu A, Naughton B, Wu Sh. 23andMe. White Paper 23-03. Guidelines on Vetting Genetic Associations [файл из Интернета]. 2007- [изменено 10.06.2010; процитировано 20.12.2016]. 115 KB. Доступно по: https://23andme.https.internapcdn.net/res/pdf/trmm3vmf1BU5d3Qw_qlGg_23-03_Vetting_Genetic_Associations_2010_06.pdf
 - Wang WYS, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*. 2005 Feb; 6 (2): 109–18.
 - Russo MW. How to Review a Meta-analysis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2007 Aug; 3 (8): 637–42.
 - Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, Fornage M, DeStefano AL, Aulchenko YS, et al. Genomewide association studies of stroke. *N Engl J Med*. 2009 Apr 23; 360 (17): 1718–28.
 - Dichgans M, Malik R, König IR, Rosand J, Clarke R, Gretarsdottir S, et al. Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease: a genome-wide analysis of common variants. *Stroke*. 2014 Jan; 45 (1): 24–36.
 - Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Manolescu A, Styrkarsdottir U, Helgadottir A, Gschwendtner A, et al. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2008 Oct; 64 (4): 402–9.
 - Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol*. 2004 Nov; 61 (11): 1652–61.
 - Franco RF, Trip MD, ten Cate H, van den Ende A, Prins MH, Kastelein JJ, et al. The 20210G → A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol*. 1999 Jan; 104 (1): 50–4.
 - Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002 Nov 23; 325 (7374): 1202.
 - Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Feb; 20 (2): 484–92.
 - Xin X-Y, Song Y-Y, Ma J-F, Fan C-N, Ding J-Q, Yang G-Y, et al. Gene polymorphisms and risk of adult early-onset ischemic stroke: A meta-analysis. *Thromb Res*. 2009 Nov; 124 (5): 619–24.
 - Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997 Oct 22–29; 278 (16): 1349–56.
 - Santoro SA, Zutter MM. The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost*. 1995 Sep; 74 (3): 813–21.
 - Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des*. 2008; 14 (33): 3574–89.
 - Jin XF, Wang DL, Zhou Y, Xiong H. Association between the interleukin-6-174 G/C polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2015 Oct 26; 14 (4): 13076–83.
 - Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995 Dec; 96 (6): 2882–91.
 - Shao P, Qu D-J, Song R-Y, Chen M-L, Wang L-H. Association between PON1 L55M polymorphism and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Mar 15; 8 (3): 3429–37.
 - Бондаренко Е. А., Тупицына Т. В., Шамалов Н. А., Шлетова И. М., Скворцова В. И., Наседкина Т. В. и др., авторы; Российский государственный медицинский университет, Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство образования и науки Российской Федерации, патентообладатели. Аллель SNP41 гена PDE4D, его применение для прогнозирования индивидуальной предрасположенности к инсульту в русской популяции, применение молекулярно-генетического маркера индивидуальной предрасположенности к инсульту и способ прогнозирования индивидуальной предрасположенности к инсульту. Патент РФ № 2422523. 27.06.2011. Доступно по: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2422523&TypeFile=html
 - Domingues-Montanari S, Fernández-Cadenas I, del Rio-Espinola A, Corbeto N, Krug T, Manso H, et al. Association of a genetic variant in the ALOX5AP with higher risk of ischemic stroke: a case-control, meta-analysis and functional study. *Cerebrovasc Dis*. 2010; 29 (6): 528–37.

References

- Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2014 Aug; 109 (8): 1159–79.
- Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 2010 Jul 17; 376 (9736): 180–8.
- Lin JS, Thompson M, Goddard KAB, Piper MA, Heneghan C, Whitlock EP. Evaluating genomic tests from bench to bedside: a practical framework. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2012 Oct 19; 12: 117.
- Андреевко Е. Ю., Балатский А. В., Бойцов С. А., Самоходская Л. М., Ткачук В. А., авторы; Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Российский кардиологический научно-производственный комплекс, патентообладатели. Способ определения наследственной предрасположенности к развитию инфаркта миокарда у лиц без клинических проявлений ишемической болезни сердца. Патент РФ № 2469096. 10.12.2012. Доступно по: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2469096&TypeFile=html

- инфаркта миокарда у лиц без клинических проявлений ишемической болезни сердца. Russian Federation patent RU 2469096. 2012 Dec 10. Available from: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2469096&TypeFile=html. Russian.
5. Dowaidar M, Settin A. Risk of myocardial infarction related to factor V Leiden mutation: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Aug; 14 (4): 493–8.
 6. Bito LZ, Matheny A, Cruickshanks KJ, Nondahl DM, Carino OB. Eye color changes past early childhood. The Louisville Twin Study. *Arch Ophthalmol*. 1997 May; 115 (5): 659–63.
 7. Nuzzo R. Scientific method: statistical errors. *Nature*. 2014 Feb 13; 506 (7487): 150–2.
 8. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*. 2008 Mar 19; 299 (11): 1335–44.
 9. Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*. 2015 Jul 7; 132 (1): e6–9.
 10. Kingah PL, Luu HN, Volcik KA, Morrison AC, Nettleton JA, Boerwinkle E. Association of NOS3 Glu298Asp SNP with hypertension and possible effect modification of dietary fat intake in the ARIC study. *Hypertens Res*. 2010 Feb; 33 (2): 165–9.
 11. Hsu A, Naughton B, Wu Sh. 23andMe. White Paper 23-03. Guidelines on Vetting Genetic Associations [file on the Internet]. 2007- [revised 2010 Jun 10; cited 2016 Dec 20]. 115 KB. Available from: https://23andme.https.internapcdn.net/res/pdf/trmm3vmf11BU5d3Qw_qIGg_23-03_Vetting_Genetic_Associations_2010_06.pdf
 12. Wang WYS, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*. 2005 Feb; 6 (2): 109–18.
 13. Russo MW. How to Review a Meta-analysis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2007 Aug; 3 (8): 637–42.
 14. Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, Fornage M, DeStefano AL, Aulchenko YS, et al. Genomewide association studies of stroke. *N Engl J Med*. 2009 Apr 23; 360 (17): 1718–28.
 15. Dichgans M, Malik R, König IR, Rosand J, Clarke R, Gretarsdottir S, et al. Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease: a genome-wide analysis of common variants. *Stroke*. 2014 Jan; 45 (1): 24–36.
 16. Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Manolescu A, Styrkarsdottir U, Helgadóttir A, Gschwendtner A, et al. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2008 Oct; 64 (4): 402–9.
 17. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol*. 2004 Nov; 61 (11): 1652–61.
 18. Franco RF, Trip MD, ten Cate H, van den Ende A, Prins MH, Kastelein JJ, et al. The 20210 G→A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol*. 1999 Jan; 104 (1): 50–4.
 19. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002 Nov 23; 325 (7374): 1202.
 20. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Feb; 20 (2): 484–92.
 21. Xin X-Y, Song Y-Y, Ma J-F, Fan C-N, Ding J-Q, Yang G-Y, et al. Gene polymorphisms and risk of adult early-onset ischemic stroke: A meta-analysis. *Thromb Res*. 2009 Nov; 124 (5): 619–24.
 22. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997 Oct 22–29; 278 (16): 1349–56.
 23. Santoro SA, Zutter MM. The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost*. 1995 Sep; 74 (3): 813–21.
 24. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des*. 2008; 14 (33): 3574–89.
 25. Jin XF, Wang DL, Zhou Y, Xiong H. Association between the interleukin-6-174 G/C polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2015 Oct 26; 14 (4): 13076–83.
 26. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995 Dec; 96 (6): 2882–91.
 27. Shao P, Qu D-J, Song R-Y, Chen M-L, Wang L-H. Association between PON1 L55M polymorphism and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Mar 15; 8 (3): 3429–37.
 28. Bondarenko EA, Tupitsyna TV, Shamalov NA, Shetova IM, Skvortsova VI, Nasedkina TV, et al, inventors; Russian State Medical University, the Ministry of Education and Science of the Russian Federation on Russian Federation behalf, assignees. Allel' SNP41 gena PDE4D, ego primeneniye dlya prognozirovaniya individual'noi predraspolozhennosti k insul'tu v russkoi populyatsii, primeneniye molekulyarno-geneticheskogo markera individual'noi predraspolozhennosti k insul'tu i sposob prognozirovaniya individual'noi predraspolozhennosti k insul'tu. Russian Federation patent RU 2422523. 2011 Jun 27. Available from: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2422523&TypeFile=html. Russian.
 29. Domingues-Montanari S, Fernández-Cadenas I, del Rio-Espinola A, Corbeto N, Manso H, et al. Association of a genetic variant in the ALOX5AP with higher risk of ischemic stroke: a case-control, meta-analysis and functional study. *Cerebrovasc Dis*. 2010; 29 (6): 528–37.

ВОЗМОЖНОСТИ ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЫ В ДИАГНОСТИКЕ АНГИОПАТИЙ ПОЧЕК И СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И НАРУШЕНИЕМ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ

Д. С. Харина^{1,2}✉, Т. А. Полетаева¹, А. К. Кондаков^{1,2}, Д. Ю. Мосин¹, И. А. Знаменский^{1,2}

¹ Центральная клиническая больница РАН, Москва

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Число больных сахарным диабетом (СД) растет, и требуется разработка эффективных подходов к ранней диагностике заболевания. Перспективными являются радионуклидные методы диагностики. Проведен ретроспективный анализ истории болезни и скинтиграмм пациентов с СД 2 типа ($n = 83$) и нарушением толерантности к глюкозе ($n = 52$) для оценки эффективности динамической нефросцинтиграфии и перфузионной томосцинтиграфии (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, ОФЭКТ) миокарда в покое при выявлении ангиопатий почек и сердца. В группу сравнения ($n = 45$) включили пациентов с нормальным содержанием глюкозы в крови. Оценивали функциональное состояние паренхимы почек путем качественного анализа скинтиграмм и ренографических кривых, скорость клубочковой фильтрации (СКФ) — по методам Gates и Кокрофта–Голта, наличие и площадь повреждений миокарда — по данным перфузионной ОФЭКТ, синхронизированной с эхокардиографией. Функциональная активность почечной паренхимы значительно снизилась только у пациентов с СД 2 типа (критерий χ^2 Пирсона, $p = 0,03$ при сопоставлении с группой сравнения). СКФ по Gates в обеих опытных группах была значительно ниже, чем в группе сравнения (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0,0004$ и $p = 0,0002$ соответственно), а в группе пациентов с СД 2 типа — ниже, чем в группе пациентов с нарушением толерантности к глюкозе ($p = 0,0004$). Для показателя СКФ по Кокрофту–Голту наблюдали те же закономерности, но различия при сопоставлении группы пациентов с нарушением гликемии и группы сравнения были недостоверными ($p = 0,08$). Корреляция между значениями СКФ, полученными разными методами, во всех группах была средней силы (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,53$ при $p = 0,038$). Рубцовые повреждения миокарда в обеих опытных группах выявлялись достоверно чаще, чем в группе сравнения, но различия по показателю между опытными группами были незначимыми.

Ключевые слова: сахарный диабет, нарушение толерантности к глюкозе, динамическая нефросцинтиграфия, перфузионная томосцинтиграфия миокарда

✉ Для корреспонденции: Харина Дина Сергеевна
ул. Литовский бульвар, д. 1а, г. Москва, 117593; sardina.sl@mail.ru

Статья получена: 25.11.2016 Статья принята к печати: 10.12.2016

NUCLEAR MEDICINE IN THE DIAGNOSIS OF RENAL AND CORONARY ANGIOPATHIES IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES AND IMPAIRED GLUCOSE TOLERANCE

Kharina DS^{1,2}✉, Poletaeva TA¹, Kondakov AK^{1,2}, Mosin DY¹, Znamensky IA^{1,2}

¹ Central Clinical Hospital of RAS, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The number of patients suffering from diabetes mellitus (DM) is increasing necessitating the development of new strategies for early detection of the disease. Here, radionuclide imaging may be a promising diagnostic technique. We have conducted a retrospective analysis of medical records and scintigrams of patients with type 2 diabetes ($n = 83$) and impaired glucose tolerance ($n = 52$) to evaluate the effectiveness of dynamic renal scintigraphy and myocardial perfusion scintigraphy at rest (single-photon emission computed tomography, SPECT) in detecting coronary and renal angiopathies. The control group consisted of patients with normal levels of blood sugar. To evaluate the functional state of the renal parenchyma, we conducted a qualitative analysis of patients' scintigrams and renographic curves; the glomerular filtration rate (GFR) was evaluated using Gates and Cockcroft-Gault methods; myocardial scarring was evaluated using perfusion SPECT images synchronized with ECG. The functional activity of the renal parenchyma was shown to decrease significantly in patients with type 2 DM (Pearson's chi-squared test was applied, p -value was 0.03). With Gates method applied, GFR in both experimental groups was significantly lower than in the controls (Mann-Whitney U was calculated; p -value was 0.0004 and 0.0002, respectively). In patients with type 2 DM, GFR was lower than in patients with impaired glucose tolerance ($p = 0.0004$). With Cockcroft–Gault method applied, we observed the same GFR pattern; however, the difference between patients with impaired glucose tolerance and the controls was insignificant ($p = 0.08$). The correlation between GFR values obtained using different methods was moderate in all groups (Spearman's rank correlation coefficient $r_s = 0.53$, with $p = 0.038$).

Keywords: diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, dynamic renal scintigraphy, myocardial perfusion scintigraphy

✉ Correspondence should be addressed: Dina Kharina
Litovsky bulvar, d. 1a, Moscow, Russia, 117593; sardina.sl@mail.ru

Received: 25.11.2016 Accepted: 10.12.2016

Сахарный диабет (СД) — это широко распространенное хроническое заболевание, основным симптомом которого является гипергликемия, вызываемая дефектами синтеза и секреции инсулина или инсулиновой недостаточностью, а также сочетанием этих двух причин [1–3]. СД представляет собой серьезную медико-социальную проблему, что обусловлено его высокой распространенностью и тенденцией к росту числа пациентов, хроническим течением заболевания и высоким уровнем инвалидизации. По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время в мире насчитывается около 250 млн больных СД, и ожидается, что к 2025 г. эта цифра вырастет до 380 млн [4].

Существует несколько классификаций сахарного диабета, в том числе — по наличию осложнений: диабетической микро- и макроангиопатии, артро-, полинейро-, офтальмо-, ретино-, нефро- и энцефалопатии [5]. Одними из наиболее распространенных осложнений СД являются патологические изменения в мелких кровеносных сосудах (микроангиопатии), которые чаще всего вызывают нефропатию, и — в средних и крупных кровеносных сосудах (макроангиопатии), являющиеся эквивалентами ишемической болезни сердца [6–9].

Диагностика ранних осложнений сахарного диабета требует комплексного подхода. Поражения почек чаще всего выявляют методами клинической лабораторной диагностики (по микроальбуминурии) либо ультразвуковым исследованием (по изменению эхогенности почечной паренхимы и размеров почек). Макроангиопатии, проявляющиеся поражением сердечных сосудов, выявляют стандартными для ишемической болезни сердца методами диагностики, включающими определение уровня кардиоспецифичных маркеров, функциональные (электрокардиографию, эхокардиографию, нагрузочные пробы) и лучевые (визуализацию сосудов сердца — коронароангиографию) методы. Наряду с перечисленными методами, которые в основном позволяют определить структурные и морфологические изменения органов и тканей уже при наличии клинических проявлений заболевания, для верификации ангиопатий в отсутствие клинических признаков СД и недостаточной выраженности структурных изменений органов используются современные методы визуализации: однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионная томография [10, 11].

Особую группу пациентов составляют лица с нарушением толерантности к глюкозе, выявляемым при проведении глюкозотолерантного теста (при двухчасовом тестировании содержание глюкозы в крови составляет от 7,8 до 11,1 ммоль/л). У них на фоне нестойкого увеличения содержания глюкозы в крови могут развиваться как микро-, так и макроангиопатии еще до установления диагноза «сахарный диабет» [12]. Поэтому в отношении пациентов с нарушением толерантности к глюкозе следует иметь настороженность по поводу развития почечной патологии, т. к. сосуды почек при прогрессировании патологии и развитии сахарного диабета 2 типа будут поражены в первую очередь [13]. Кроме того, у таких пациентов могут возникать изменения в миокарде левого желудочка, даже если наличие макроангиопатии еще не установлено рутинными методами клинической и инструментальной диагностики [14]. Это связано с тем, что при нарушении толерантности к глюкозе имеющееся нестойкое увеличение содержания глюкозы в крови может быть достаточным для повреждения эндотелия сосудов мелкого калибра [15]. Кроме того, возможно развитие поздних кардиальных событий, таких как безболевого ишемия миокарда, ранний инфаркт

и др. [16]. В случае с пациентами с нарушением толерантности к глюкозе результаты исследований с помощью радионуклидных методов диагностики, в частности, перфузионной томосцинтиграфии миокарда, могут повлиять на выбор терапии. Известно, что радионуклидные методы диагностики позволяют выявить нарушение функции органа на ранних стадиях развития заболевания [17].

В связи с вышесказанным целью нашего исследования являлось определение диагностической эффективности методов радионуклидной диагностики — динамической нефросцинтиграфии и синхронизированной с электрокардиографией (ЭКГ) перфузионной ОФЭКТ миокарда в покое — при выявлении микро- и макроангиопатий почек и сердца у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе и сахарным диабетом 2 типа.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Был проведен ретроспективный анализ историй болезни и скинтиграмм 180 пациентов, находившихся на лечении в Центральной клинической больнице РАН в 2011–2016 гг. В исследование включали пациентов с диагнозом «сахарный диабет 2 типа» либо с нарушением толерантности к глюкозе, которым были проведены динамическая нефросцинтиграфия (ДНСГ) и перфузионная томосцинтиграфия (ОФЭКТ) миокарда. Критериями исключения являлись: ранее установленный инфаркт миокарда, признаки миокардита, хроническая почечная недостаточность, единственная почка, врожденные нарушения развития (подковообразная почка, I- и S-образное слияние почек), опухолевые заболевания и тяжелая сопутствующая патология (множественное метастатическое поражение, хроническая болезнь почек 4–5 стадии).

Из 180 пациентов (средний возраст — $69,0 \pm 11,6$ года, соотношение полов М : Ж — 1 : 0,8) 83 был установлен диагноз «сахарный диабет 2 типа» (группа 1), у 52 — выявлено нарушение толерантности к глюкозе без установления диагноза «сахарный диабет» (группа 2), а еще 45 человек, направленные на исследования по другим причинам (боли стенокардитического характера, аритмии неясного генеза, нарушения мочеиспускания, боли опоясывающего характера в поясничной области) и не имевшие патологических отклонений по содержанию глюкозы в крови, составили группу сравнения. Участников исследования разделили на подгруппы по типу проведенного радионуклидного исследования, демографические характеристики подгрупп приведены в таблице 1. Исследования проводились на совмещенном ОФЭКТ/КТ-томографе Infinia 4 Hawkeye (General Electric, США). Также использовали данные биохимического анализа крови, выполненного за 3 дня до или после радионуклидного исследования, о содержании тропонина, креатинина и гликированного гемоглобина в крови и данные эхокардиографии (ЭКГ) о фракции выброса (ФВ).

Динамическая нефросцинтиграфия позволяет оценить индивидуальную ренальную функцию, изучить нарушения концентрационной и выделительной функций каждой почки, вызванные в том числе нарушением микроциркуляции крови. При ДНСГ определялись относительный почечный захват радиофармацевтического препарата (РФП), скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по методу Gates [18], нормализованная по вводимой дозе РФП максимальная амплитуда кривых активности–время для обеих почек и ее среднее значение. Для косвенной оценки количества функционирующей паренхимной ткани почки визуальное

Таблица 1. Демографические характеристики подгрупп пациентов по типу радионуклидного исследования

Параметр	Динамическая нефросцинтиграфия			Перфузионная ОФЭКТ миокарда		
	Группа 1 (СД 2 типа)	Группа 2 (НТГ)	Группа сравнения	Группа 1 (СД 2 типа)	Группа 2 (НТГ)	Группа сравнения
Число пациентов n	25	17	20	58	35	25
Средний возраст, лет (M ± SD)	71,7 ± 9,0	67,0 ± 14,4	67,0 ± 11,9	69,0 ± 9,8	67,9 ± 11,9	70,7 ± 12,3
Соотношение полов, М : Ж	1 : 0,4	1 : 0,7	1 : 0,6	1 : 0,9	1 : 0,4	1 : 1,1

Примечание. СД 2 типа — сахарный диабет 2 типа; НТГ — нарушение толерантности к глюкозе; М — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение.

анализировали как сами скинтиграммы, так и ход ренографических кривых с оценкой амплитуды кривой при максимальном накоплении РФП [19]. По совокупности данных для каждого пациента делали вывод о нормальном либо сниженном количестве функционирующей ткани.

Для проведения ДНСГ пациенту вводили внутривенно болюсно 200 МБк меченного технецием диэтилентриаминпентаоцетата — ^{99m}Tc-ДТПА («Пентатех, ^{99m}Tc» производства компании «Диамед», Россия). Запись продолжалась в течение 30 мин в режиме 1 кадр/мин в сочетании с проведением ангионейросцинтиграфии. Для получения информации о сосудистой фазе производилась запись 60 кадров по 1 с непосредственно после введения РФП [18]. Для расчета СКФ записывалась активность в полном шприце и шприце после инъекции по 10 с в матрицу 128 × 128 пикселей с определением разности в счете на полученных скинтиграммах и определялось суммарное накопление РФП на ренографической кривой между 2 и 3 минутами от начала поступления препарата [18, 19]. Динамическое изображение почек реконструировалось при помощи рабочей станции Xeleris 2.1 (General Electric) в программной среде Renal Analysis (Emory University Hospital, США). Пример реконструкции приведен на рис. 1.

Также рассчитывали СКФ по формуле Кокрофта–Голта по данным о содержании креатинина в сыворотке крови:

$$СКФ = K \times \frac{(140 - \text{возраст}) \times \text{вес}}{\text{содержание креатинина}},$$

где K — это коэффициент, для мужчин равный 1,23, для женщин — 1,05 [20].

Для проведения перфузионной томосцинтиграфии миокарда использовался метоксиизобутилизонитрил (РФП «Технетрил» производства компании «Диамед»), который вводили в дозе 750 МБк за 40 мин до исследования. Исследование проводилось в режиме ОФЭКТ, синхронизированной с эхокардиографией, с записью 120 проекций (по 60 — на каждый детектор) с экспозицией 32 с на проекцию. Изображения миокарда реконструировались с помощью программы Quantitative Gated SPECT/Quantitative Perfusion SPECT (Cedars-Sinai Hospital, США). Патологическими считали наличие дефекта перфузии на полярных картах, снижение локальной сократимости в той же области и повреждение более 5 % миокарда. Пример реконструкции приведен на рис. 2. В той же программной среде оценивались объемные показатели сердечного кровотока: конечные систолический (КСО) и диастолический (КДО) объемы (мл) и фракция выброса как отношение разности между КДО и КСО к КДО.

Статистическую обработку данных выполнили в программе STATA-13 MP (StatCorp LP, США). В связи с небольшим объемом выборок и отсутствием нормального

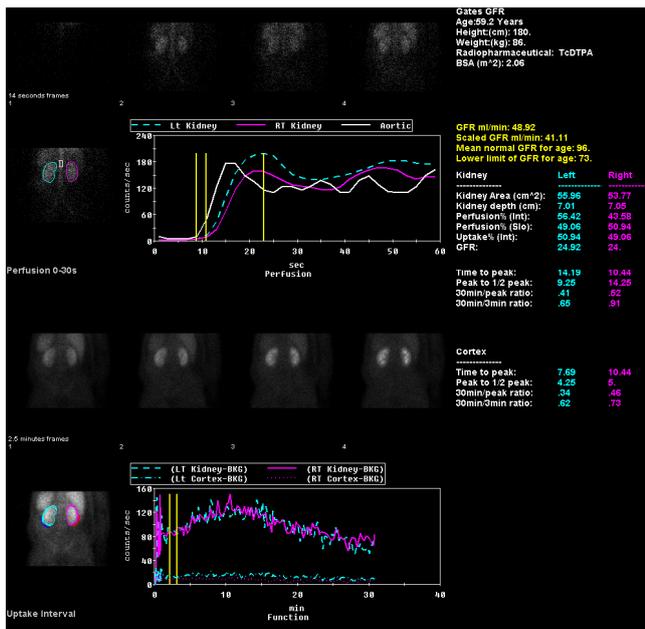


Рис. 1. Пример реконструкции изображений почки при динамической нефросцинтиграфии при помощи рабочей станции Xeleris 2.1 (General Electric, США) в программной среде Renal Analysis (Emory University Hospital, США)

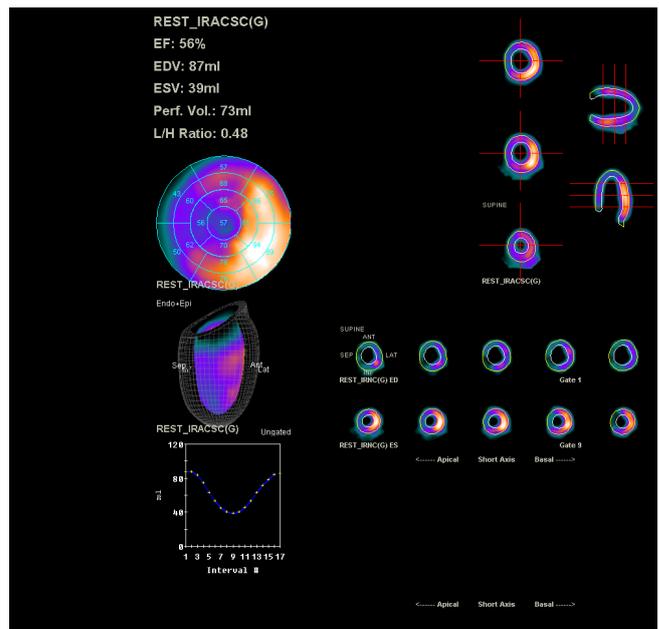


Рис. 2. Пример реконструкции изображений миокарда при перфузионной ОФЭКТ миокарда с помощью программы Quantitative Gated SPECT/Quantitative Perfusion SPECT (Cedars-Sinai Hospital, США)

распределения в них (оценивалось по критерию Шапиро–Уилка) применяли методы непараметрической статистики (U-критерий Манна–Уитни, тест Вилкоксона для парных сравнений, корреляцию по Спирмену, критерий χ^2 Пирсона; конкретные методы для каждого изучавшегося параметра указаны в «Результатах исследования»). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При анализе сцинтиграмм практически у всех пациентов с сахарным диабетом 2 типа (группа 1) было выявлено снижение количества функционирующей паренхимы почки по сравнению с пациентами группы сравнения (критерий χ^2 Пирсона, $p = 0,03$), в то время как у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе (группа 2) значимого снижения количества почечной паренхимы выявлено не было (критерий χ^2 Пирсона, $p = 0,23$).

Скорость клубочковой фильтрации по Gates у пациентов группы 1 и пациентов группы 2 была ниже, чем у пациентов группы сравнения (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0,0004$ и $p = 0,0002$ соответственно), а у пациентов группы 1 также ниже, чем у пациентов группы 2 ($42,7 \pm 15,9$ против $50,4 \pm 16,5$ при $p = 0,0004$) (табл. 2). СКФ, оцененная по методу Кокрофта–Голта, у пациентов группы 1 была ниже, чем у пациентов группы сравнения (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0,003$). У пациентов группы 2 — также ниже, однако различия по этому показателю между ними и пациентами группы сравнения были статистически незначимыми ($p = 0,08$). При сравнении двух опытных групп было установлено, что СКФ по Кокрофту–Голту ниже у пациентов с СД 2 типа ($58,2 \pm 23,3$ против $73,1 \pm 25,9$ при $p = 0,005$).

У пациентов группы 1 СКФ, оцененная по методу Кокрофта–Голта, значимо выше, чем СКФ, оцененная по методу Gates (парный критерий Вилкоксона, $p = 0,023$). У пациентов группы 2 наблюдали ту же закономерность ($p = 0,02$). В группе сравнения внутригрупповое различие между двумя показателями было статистически незначимым ($p = 0,243$). Корреляция между значениями СКФ,

полученными разными методами, во всех группах была средней силы, статистически значимой (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,53$ при $p = 0,038$).

При попарном сравнении групп с помощью критерия Манна–Уитни было показано, что у пациентов группы 1 содержание гликированного гемоглобина и тропонина в крови было выше, чем у пациентов группы сравнения ($p = 0,01$ и $p = 0,0007$ соответственно) (табл. 3). То же наблюдали при сравнении значений показателей у пациентов группы 2 и пациентов группы сравнения ($p = 0,027$ и $p = 0,0069$ соответственно). При сравнении двух опытных групп выявили значимо несколько более высокое содержание гликированного гемоглобина у пациентов с СД 2 типа ($6,96 \pm 2,03$ против $6,10 \pm 0,80$ при $p = 0,025$). Межгрупповые различия по содержанию тропонина были недостоверными ($p = 0,38$).

Значимых различий между группами пациентов с нормальным содержанием глюкозы в крови и пациентов с нарушением толерантности к глюкозе по показателю фракции выброса, характеризующей сократительную способность миокарда, не выявили ни для перфузионной ОФЭКТ миокарда, ни для ЭКГ (табл. 3). При сравнении значений показателя в группе сравнения и группе пациентов с СД 2 типа наблюдали достоверное снижение ФВ по данным ЭКГ (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0,01$). Межгрупповые различия по показателю по данным перфузионной ОФЭКТ были незначимыми. Также не обнаружили значимых различий по ФВ при сравнении опытных групп между собой при обоих типах исследования.

По результатам проведения перфузионной ОФЭКТ миокарда выяснили, что для пациентов с СД 2 типа частота рубцовых повреждений миокарда (30 %) и площадь повреждений, extent ($6,4 \pm 10,8$ %) достоверно выше, чем у пациентов группы сравнения (0 и $0,6 \pm 1,1$ % при $p = 0,02$ при расчете критерия χ^2 Пирсона и $p = 0,02$ при расчете U-критерия Манна–Уитни соответственно) (табл. 3). То же наблюдали при сравнении значений показателей в группе пациентов с нарушением толерантности к глюкозе и группе сравнения (p составил 0,001 для обоих статистических параметров). При сравнении значений показателей опытных групп значимых различий не выявили.

Таблица 2. Результаты определения скорости клубочковой фильтрации по данным динамической нефросцинтиграфии (метод Gates) и методу Кокрофта–Голта

Метод исследования	Группа 1 (СД 2 типа, n = 25)	Группа 2 (НТГ, n = 17)	Группа сравнения (n = 20)
Скорость клубочковой фильтрации по метод Кокрофта–Голта, мл/мин	$58,2 \pm 23,3$ (56,9)	$73,1 \pm 25,9$ (71,4)	$80,1 \pm 23,7$ (79,0)
Скорость клубочковой фильтрации по данным динамической нефросцинтиграфии (метод Gates), мл/мин	$42,7 \pm 15,9$ (44,0)	$50,4 \pm 16,5$ (57,3)	$71,9 \pm 25,7$ (69,8)

Примечание. СД 2 типа — сахарный диабет 2 типа; НТГ — нарушение толерантности к глюкозе. Данные в таблице представлены как $M \pm SD$ (μ), где M — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение, μ — медиана.

Таблица 3. Результаты биохимического анализа крови и перфузионной ОФЭКТ миокарда

Группа	Параметр					
	Содержание гликированного гемоглобина (HbA1C), %	Содержание тропонина (Tns), пг/мл	Фракция выброса по данным эхокардиографии, %	Фракция выброса по данным перфузионной ОФЭКТ миокарда, %	Частота рубцовых изменений, %	Площадь рубцовых изменений (extent), %
Группа 1 (СД 2 типа)	$6,96 \pm 2,03$ (6,90)	$30,9 \pm 104,8$ (8,8)	$50,2 \pm 8,8$ (52,0)	$56,5 \pm 14,2$ (59,0)	30	$6,4 \pm 10,8$ (1,0)
Группа 2 (НТГ)	$6,10 \pm 0,80$ (6,10)	$29,6 \pm 82,5$ (10,0)	$52,9 \pm 9,2$ (56,0)	$59,9 \pm 15,9$ (66,0)	36,3	$6,2 \pm 10,5$ (1,0)
Группа сравнения	$5,07 \pm 0,60$ (5,10)	$6,6 \pm 3,6$ (5,5)	$56,7 \pm 4,4$ (58,0)	$64,2 \pm 10,6$ (61,0)	0	$0,6 \pm 1,1$ (0)

Примечание. СД 2 типа — сахарный диабет 2 типа; НТГ — нарушение толерантности к глюкозе. Данные в таблице представлены как $M \pm SD$ (μ), где M — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение, μ — медиана.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сходство изменений в скорости клубочковой фильтрации, выявленных у пациентов с нарушением гликемии и пациентов с сахарным диабетом 2 типа, подтверждает предположение о первичном повреждении эндотелия сосудов почек в ходе прогрессирования заболевания, что подтверждается литературными данными [9, 13, 15, 16].

При оценке функциональной способности почек с помощью динамической нефросцинтиграфии у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе была выявлена тенденция к снижению СКФ (в том числе по данным анализа кривых активность–время), в то время как содержание креатинина в сыворотке крови по данным биохимического анализа было нормальным. Это означает, что СКФ, рассчитываемая по формуле Кокрофта–Голта, для таких пациентов неинформативна. По нашему мнению, целесообразно назначать таким пациентам проведение ДНСГ на этапе установления нарушения гликемии натощак для первичной оценки функции почек и принятия решения о проведении нефропротективной терапии. При этом стоит учитывать возможность наличия наравне с микроангиопатией других заболеваний почек, приводящих к снижению их функциональной активности, что является одним из ограничений исследования. Также известно, что при тяжелом нарушении функции почек (при снижении СКФ ниже 15 мл/мин) результаты оценки показателя по методу Gates недостоверны в связи со снижением эффективного регистрируемого счета импульсов детектором гамма-камеры [18, 21].

У пациентов с нарушением толерантности к глюкозе перфузионная ОФЭКТ миокарда позволила определить минимальные рубцовые повреждения миокарда левого желудочка, а также глубину его повреждения на ранней стадии заболевания, при этом содержание тропонина в сыворотке крови оставалось на уровне нормальных значений. Однако перфузионная ОФЭКТ, синхронизированная с ЭКГ, может выявить нарушения перфузии и оча-

гово-рубцовые повреждения, не связанные с нарушением гликемии, что потребует использования дополнительных методов исследования и сопоставления результатов анамнеза с историей заболевания. Это ограничивает применение перфузионной ОФЭКТ миокарда.

В связи с наличием лучевой нагрузки при проведении радионуклидных исследований следует оценивать их целесообразность для пациента. Критерием для их проведения является наличие таких факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, как повышенный уровень холестерина, курение, артериальная гипертензия, избыточное питание, гиперстеническое телосложение.

ВЫВОДЫ

В ходе исследования по данным динамической нефросцинтиграфии и перфузионной томосцинтиграфии миокарда были выявлены изменения в почечной и сердечной тканях как у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, так и у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе. Мы рекомендуем назначать динамическую нефросцинтиграфию всем пациентам с нарушением толерантности к глюкозе в рамках диспансерного наблюдения для выявления ранних изменений в сосудах почек и функциональности почечной ткани. Перфузионная ОФЭКТ миокарда может быть назначена при наличии факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Настоящее исследование было ограничено строгими критериями включения, в связи с чем выборки пациентов были небольшими. В настоящее время исследование продолжается. Остается невыясненной роль радионуклидных методов диагностики в прогнозировании развития заболевания и контроле эффективности лечения. Для решения этих задач требуется проведение широкого мультицентрового проспективного исследования достаточной длительности.

Литература

1. Kumar R, Nandhini LP, Kamalanathan S, Sahoo J, Vivekanadan M. Evidence for current diagnostic criteria of diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2016 Sep 15; 7 (17): 396–405. DOI: 10.4239/wjd.v7.i17.396.
2. Древалъ А. В., Мисникова И. В., Барсуков И. А., Пончакова Г. В., Кузнецов А. В. Распространенность сахарного диабета 2 типа и других нарушений углеводного обмена в зависимости от критериев диагностики. *Сахарный диабет*. 2010; (1): 116–21.
3. Аметов А. С., Курочкин И. О., Зубков А. А. Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания. *Русский медицинский журнал*. 2014; (13): 954.
4. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. 2005 Sep; 28 (9): 2130–5.
5. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Современные вопросы классификации, диагностики и критерии компенсации сахарного диабета. *Сахарный диабет*. 2003; (1): 10–5.
6. Ефимов А. С. *Диабетические ангиопатии*. М.: Изд-во «Медицина»; 1989. 287 с.
7. Liu M, Li XC, Lu L, Cao Y, Sun RR, Chen S, et al. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014 Oct; 18 (19): 2918–26.
8. Aggarwal A, Aggarwal S, Sharma V. Cardiovascular Risk Factors in Young Patients of Coronary Artery Disease: Differences over a Decade. *J Cardiovasc Thorac Res*. 2014; 6 (3): 169–173. DOI: 10.15171/jcvtr.2014.006.
9. Стаценко М. Е., Деревянченко М. В. Коррекция дисфункции эндотелия у больных артериальной гипертензией с сахарным диабетом 2-го типа на фоне комбинированной антигипертензивной терапии. *Терапевтический архив*. 2014; 86 (8): 90–3.
10. Таджієва Д. Ч., Тронько М. Д., Славнов В. М., Єфімов А. С. [Динамічна реносцинтиграфія та радіонуклідна ангіографія в діагностиці доклінічних форм діабетичної нефропатії]. *Український радіологічний журнал*. 1999; 7 (3): 318–21. Украинский.
11. Славнов В. Н., Савицкий С. Ю. Радионуклидные методы в диагностике осложнений сахарного диабета. *Артериальная гипертензия*. 2009; 2 (4): 14–26.
12. Kasim M, Currie GM, Tjahjono M, Siswanto BB, Harimurti GM, Kiat H. Myocardial Perfusion SPECT Utility in Predicting Cardiovascular Events Among Indonesian Diabetic Patients. *Open Cardiovasc Med J*. 2013 Sep 20; 7: 82–9. DOI: 10.2174/1874192401307010082.
13. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010 Mar; 11 (1): 61–74. DOI: 10.1007/s11154-010-9134-4.
14. Харина Д. С., Сервули Е. А., Полетаева Т. А., Кондаков А. К., Знаменский И. А. Комплексная радионуклидная диагностика ранних осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа.

- Вестник РНЦРР [Интернет]. 19 июня 2015 г. [дата обращения: 30.11.2015]; 15. Доступно по ссылке: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v15/papers/kharina_v15.htm.
15. Su Y, Siu XM, Sun YM, Wang YY, Luan Y, Wu Y. Endothelial dysfunction in impaired fasting glycemia, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2008 Aug 15; 102 (4): 497–8. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.03.087.
 16. Peix A. Usefulness of nuclear cardiology techniques for silent ischemia detection in diabetics. *MEDICC Rev.* 2013; 15 (1): 33–6.
 17. Bolus NE. Nuclear Medicine Instrumentation. *J Nucl Med Technol.* 2010; 38 (3): 172–3.
 18. Prasad N, Barai S, Gambhir S, Parasar DS, Ora M, Gupta A, et al. Comparison of glomerular filtration rate estimated by plasma clearance method with modification of diet in renal disease prediction equation and Gates method. *Indian J Nephrol.* 2012 Mar; 22 (2): 103–7. DOI: 10.4103/0971-4065.97123.
 19. Лишманов Ю. Б., Чернов В. И., редакторы. Национальное руководство по радионуклидной диагностике. Т1. Томск: STT; 2010. 199 с.
 20. Мухин Н. А. Снижение скорости клубочковой фильтрации — общепопуляционный маркер неблагоприятного прогноза. *Терапевтический архив.* 2007; 79 (6): 5–10.
 21. Kim YI, Ha S, So Y, Lee WW, Byun SS, Kim SE. Improved measurement of the glomerular filtration rate from Tc-99m DTPA scintigraphy in patients following nephrectomy. *Eur Radiol.* 2014 Feb; 24 (2): 413–22. DOI: 10.1007/s00330-013-3039-z.

References

1. Kumar R, Nandhini LP, Kamalanathan S, Sahoo J, Vivekanadan M. Evidence for current diagnostic criteria of diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2016 Sep 15; 7 (17): 396–405. DOI: 10.4239/wjd.v7.i17.396.
2. Dreval AV, Misnikova IV, Barsukov IA, Ponchakova NV, Kuznetsov AV. [Prevalence of type 2 diabetes mellitus and other abnormalities of carbohydrate metabolism depending on diagnostic criteria]. *Diabetes mellitus.* 2010. (1): 116–21. Russian.
3. Ametov AS, Kurochkin IO, Zubkov AA. Sakharniy diabet i serdechno-sosudistye zabolovaniya. *Russkiy meditsinskiy zhurnal.* 2014; (13): 954. Russian.
4. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care.* 2005 Sep; 28 (9): 2130–5.
5. Balabolkin MI, Klebanova EM, Kreminskaya VM. Sovremennye voprosy klassifikatsii, diagnostiki i kriterii kompensatsii sakharnogo diabeta. *Diabetes mellitus.* 2003; (1): 10–5. Russian.
6. Efimov AS. Diabeticheskie angiopatii. Moscow: Izd-vo «Meditsina»; 1989. 287 p. Russian.
7. Liu M, Li XC, Lu L, Cao Y, Sun RR, Chen S, et al. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014 Oct; 18 (19): 2918–26.
8. Aggarwal A, Aggarwal S, Sharma V. Cardiovascular Risk Factors in Young Patients of Coronary Artery Disease: Differences over a Decade. *J Cardiovasc Thorac Res.* 2014; 6 (3): 169–173. DOI: 10.15171/jcvtr.2014.006.
9. Statsenko ME, Derevianchenko MV. [Correction of endothelial dysfunction in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus during combined antihypertensive therapy]. *Terapevticheskij arkhiv.* 2014; 86 (8): 90–3. Russian.
10. Tadjieva DCh, Tronko MD, Slavnov VM, Efimov AS. Dinamichna reno-scintigrafija ta radionuklidna angiografija v diagnostici doklinichnih form diabetichnoji nefropatii. *Ukraiński radiologičnij zhurnal.* 1999; 7 (3): 318–21. Ukrain.
11. Slavnov VN, Savickij SYu. Radionuklidnye metody v diagnostike oslozhnennij saharinogo diabeta. *Arterial'naja gipertenzija.* 2009; 2 (4): 14–26. Russian.
12. Kasim M, Currie GM, Tjahjono M, Siswanto BB, Harimurti GM, Kiat H. Myocardial Perfusion SPECT Utility in Predicting Cardiovascular Events Among Indonesian Diabetic Patients. *Open Cardiovasc Med J.* 2013 Sep 20; 7: 82–9. DOI: 10.2174/1874192401307010082.
13. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010 Mar; 11 (1): 61–74. DOI: 10.1007/s11154-010-9134-4.
14. Kharina DS, Servuli EA, Poletaeva TA, Kondakov AK, Znamenskiy IA. [Complex radionuclide diagnostics of early complications in patients with diabetes mellitus type 2]. *Vestnik RNTsRR [Internet].* 2015 Jun 19 [cited 2015 Nov 30]; 15. Available from: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v15/papers/kharina_v15.htm. Russian.
15. Su Y, Siu XM, Sun YM, Wang YY, Luan Y, Wu Y. Endothelial dysfunction in impaired fasting glycemia, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2008 Aug 15; 102 (4): 497–8. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.03.087.
16. Peix A. Usefulness of nuclear cardiology techniques for silent ischemia detection in diabetics. *MEDICC Rev.* 2013; 15 (1): 33–6.
17. Bolus NE. Nuclear Medicine Instrumentation. *J Nucl Med Technol.* 2010; 38 (3): 172–3.
18. Prasad N, Barai S, Gambhir S, Parasar DS, Ora M, Gupta A, et al. Comparison of glomerular filtration rate estimated by plasma clearance method with modification of diet in renal disease prediction equation and Gates method. *Indian J Nephrol.* 2012 Mar; 22 (2): 103–7. DOI: 10.4103/0971-4065.97123.
19. Lishmanov YuB, Chernov VI, editors. Natsional'noe rukovodstvo po radionuklidnoj diagnostike. Vol. 1. Tomsk: STT; 2010. 199 p. Russian.
20. Mukhin NA. [A decreased glomerular filtration rate as a general population marker of an unfavorable prognosis]. *Terapevticheskij arkhiv.* 2007; 79 (6): 5–10. Russian.
21. Kim YI, Ha S, So Y, Lee WW, Byun SS, Kim SE. Improved measurement of the glomerular filtration rate from Tc-99m DTPA scintigraphy in patients following nephrectomy. *Eur Radiol.* 2014 Feb; 24 (2): 413–22. DOI: 10.1007/s00330-013-3039-z.

ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТИРЕОЦИТОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

И. В. Смелова¹ ✉, Е. С. Головнева²

¹ Многопрофильный центр лазерной медицины, Челябинск

² Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск

Лазерное воздействие представляет интерес в качестве метода терапии гипотиреоза и аутоиммунных тиреоидитов. Его эффективность зависит от применяемой дозы излучения. Дегрануляция стромальных тучных клеток щитовидной железы (мастоцитов) является дозозависимым процессом, а попадание содержимого клеточных гранул в окружающие ткани может привести к изменению микроциркуляции, повышению активности тиреоидного эпителия и усилению эндокринной функции железы. Целью исследования являлось изучение влияния инфракрасного лазерного облучения средней интенсивности при суммарной плотности дозы с поверхности кожи 112 и 450 Дж/см² на функциональное состояние тучных клеток и содержание гормонов щитовидной железы в сыворотке крови в норме и при гипотиреозе. Эксперимент провели на 78 беспородных половозрелых самцах крысы. Гипотиреоз моделировали пероральным введением «Мерказолила» («Акрихин», Россия) в дозе 25 мг/кг в течение 21 дня. Облучение производили с использованием аппарата «ИРЭ-Полус» с длиной волны 970 нм (НТО «ИРЭ-Полус», Россия) ежедневно в течение 5 дней. Животных выводили из эксперимента на 1, 7 и 30 сутки. Подсчитывали общее количество тучных клеток, количество дегранулированных мастоцитов, количество мастоцитов I, II и III степени дегрануляции, коэффициент дегрануляции, а также содержание в сыворотке крови тиреотропных гормонов. Показано, что тучные клетки интактной щитовидной железы малочувствительны к лазерному воздействию, но гормональный профиль изменяется в ранние сроки после облучения. При моделировании гипотиреоза тиамазолом (действующее вещество «Мерказолила») происходит активация тучных клеток в восстановительном периоде после прекращения дачи препарата. Моделирование гипотиреоза сопровождается изменением содержания в сыворотке крови гормонов ТТГ, Т₄ и Т₃. При сравнении результатов воздействия двух режимов лазерного излучения на железу животных с экспериментальным гипотиреозом отмечается повышение функциональной активности мастоцитов и нормализация уровня гормональной секреции при суммарной плотности дозы 112 Дж/см² и снижение активности тучных клеток при суммарной плотности дозы 450 Дж/см².

Ключевые слова: гипотиреоз, щитовидная железа, тучные клетки, мастоциты, дегрануляция, тиреотропный гормон, лазерное излучение

✉ Для корреспонденции: Смелова Ирина Викторовна
ул. Потемкина, д. 14, кв. 65, г. Челябинск, 454081; spiral.siv@mail.ru

Статья получена: 28.11.2016 Статья принята к печати: 12.12.2016

DYNAMICS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF THYROCYTES IN THE SETTING OF CHANGING MORPHOFUNCTIONAL ACTIVITY OF MAST CELLS OF THE THYROID GLAND UPON INFRARED LASER THERAPY

Smelova IV¹ ✉, Golovneva ES²

¹ Multi-specialty Center of Laser Medicine, Chelyabinsk, Russia

² South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Exposure to laser radiation is an interesting method of treating hypothyroidism and autoimmune thyroiditis. Its effect depends on the applied radiation dose. Degranulation of stromal mast cells of the thyroid gland (mastocytes) is dose dependent; release of granular contents into the surrounding tissues may affect microcirculation, result in the increased activity of the thyroid epithelium or stimulate the thyroid. Our study aimed to investigate the effect of moderate-intensity infrared laser radiation at total surface doses of 112 and 450 J/cm² on the functional state of mast cells and blood serum levels of thyroid gland hormones in healthy and hypothyroid subjects. The experiment was carried out in 78 random-bred mature male rats. Hypothyroidism was modeled by *per os* administration of 25 mg/kg Mercazolil (Akrikhin, Russia) for 21 days. Radiation therapy was performed using a IRE-Polus laser with a wavelength of 970 nm (NTO IRE-Polus, Russia). The animals received radiation therapy for 5 days and were sacrificed 1, 7, and 30 days after the experiment. Subsequently, we calculated the total number of mast cells, degranulated mastocytes, mastocytes with degree 1, 2 and 3 degranulation, degranulation coefficient, and levels of TSH in blood serum. Mast cells of the intact thyroid gland demonstrated low sensitivity to laser radiation, but hormone levels changed soon after radiation was discontinued. In the animals with hypothyroidism induced by thiamazole (the active component of Mercazolil), activation of mast cells was observed in the recovery period after the drug was discontinued. Hypothyroidism was accompanied by changes in TSH, T₄ and T₃ levels in blood serum. Comparison of the effects of two laser therapy modes in the animals with induced hypothyroidism revealed increased functional activity of mastocytes and normalized levels of secreted hormones at a total dose of 112 J/cm² and reduced mast cell activity at a total dose of 450 J/cm².

Keywords: hypothyroidism, thyroid gland, mast cells, mastocytes, degranulation, thyroid stimulating hormone, laser radiation

✉ Correspondence should be addressed: Irina Smelova
ul. Potemkina 14, kv. 65, Chelyabinsk, Russia, 454081; spiral.siv@mail.ru

Received: 28.11.2016 Accepted: 12.12.2016

В последнее десятилетие в клинической практике все большее распространение получают новые методы терапии с применением лазерных технологий. Наряду с активным использованием низкоинтенсивных режимов лазеров [1], разрабатываются методики на основе лазерного воздействия повышенной мощности, позволяющего достигать терапевтических доз в глубине ткани [2, 3].

Щитовидная железа доступна для прямого лазерного воздействия с поверхности тела. Лазерное облучение щитовидной железы может изменять ее функцию, способствовать повышению уровня секреции гормонов, улучшать микроциркуляцию и влиять на репарацию тканей органа, поэтому применяется при лечении гипотиреоза и аутоиммунных тиреоидитов [4–7]. Существует точка зрения, что триггером структурных изменений тиреоидного эпителия является воздействие фотонов света на строму железы, в том числе на содержащиеся в ней иммунные клетки. Известно, что при низкоинтенсивном лазерном воздействии на щитовидную железу возрастает секреция тиреоидных гормонов [8].

Гормоны щитовидной железы, точкой приложения которых является ядерный аппарат клетки, участвуют в обменных процессах всех видов, влияют на активность ферментных систем, способствуют росту, развитию и дифференцировке всех тканей организма. Неоспоримо влияние тиреоидных гормонов на центральную и периферическую нервную систему и высшую нервную деятельность и другие железы внутренней секреции.

Основная функция тиреотропного гормона (ТТГ), продуцируемого клетками передней доли гипофиза, — регуляция синтеза и секреции гормонов щитовидной железы по принципу обратной связи. Функциональное состояние щитовидной железы оценивается по содержанию гормонов тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3) в сыворотке крови, причем концентрация их свободных фракций является более надежным параметром.

Стромальные тучные клетки щитовидной железы (мастоциты) обладают высокой функциональной активностью за счет продукции большого числа медиаторов, цитокинов и ферментов. Показано их участие в регуляции микроциркуляции и ангиогенеза, ответе тканей на повреждающие экстремальные воздействия, воспалительных и аллергических реакций [9]. Биологически активные вещества дегранулированных тучных клеток влияют на состояние микроциркуляторного русла и эпителия фолликулов, а также играют важную роль в репаративной регенерации железы и могут изменять ее функциональную активность [10]. Лазерное воздействие на ткани вызывает дегрануляцию мастоцитов [11, 12].

Остаются неизученными эффекты среднеинтенсивного лазерного воздействия на функциональную активность тучных клеток щитовидной железы в зависимости от дозы излучения. Целью работы являлось изучение влияния различных доз среднеинтенсивного инфракрасного лазерного облучения на функциональное состояние стромальных тучных клеток с оценкой по степени их дегрануляции и функциональное состояние тиреоцитов с оценкой по содержанию тиреоидных гормонов в сыворотке крови в норме и при экспериментальном гипотиреозе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент провели на 78 беспородных половозрелых самцах лабораторной крысы весом 200–220 г, содержащихся в условиях вивария в клетках по 2–3 особи ad libitum,

на сбалансированном рационе и при обычном световом режиме (день–ночь). Опыт проведен с соблюдением норм и правил гуманного обращения с животными, в том числе в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к Приказу МЗ СССР № 755 от 12.09.77) и Хельсинкской декларацией 1964 г. с изменениями от 1975, 1983 и 1989 гг.

Животных разделили на 6 групп: 1) интактные животные; 2) животные с экспериментальным гипотиреозом; 3) интактные животные, для которых суммарная плотность дозы составила 112 Дж/см² (экспозиция — 45 с); 4) интактные животные, для которых суммарная плотность дозы составила 450 Дж/см² (экспозиция — 60 с) 5) животные с экспериментальным гипотиреозом, для которых суммарная плотность дозы составила 112 Дж/см² (экспозиция — 45 с); 6) животные с экспериментальным гипотиреозом, для которых суммарная плотность дозы составила 450 Дж/см² (экспозиция — 60 с). Лазером воздействовали в непрерывном режиме ежедневно в течение 5 дней, начиная со следующего дня после окончания моделирования гипотиреоза. Работали на аппарате «ИРЭ-Полюс» с длиной волны 970 нм (НТО «ИРЭ-Полюс», Россия). Режим лазерного воздействия с суммарной плотностью дозы 450 Дж/см² не вызывал термических повреждений тканей щитовидной железы.

Гипотиреоз моделировали ежедневным пероральным введением в течение 21 суток «Мерказолила» (действующее вещество — тиамазол; производство: «Акрихин», Россия) в дозе 25 мг/кг с помощью специального зонда [13]. Интактным животным по той же схеме перорально вводили 0,9 % физиологический раствор. Оценку гипотиреоза проводили по клиническим признакам: изменению массы тела, аппетита, состояния шерсти, температуры, — а также по морфологическому состоянию щитовидной железы и содержанию тиреоидных гормонов в сыворотке крови.

Выведение животных из эксперимента осуществляли под эфирным наркозом путем цервикальной дислокации через 1, 7 и 30 суток после окончания облучения.

Материал для морфологического исследования забирали в 10 % раствор нейтрального формалина, затем готовили стандартные гистологические парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином–эозином и толуидиновым синим (pH = 2,0). Микроскопические исследования проводили на микроскопе DMRXA (Leica, Германия). Результаты фиксировали с помощью программы анализа изображений «ДиаМорф Cito-W» (Россия), совмещенной с микроскопом. Морфометрический анализ гистологических срезов включал подсчет общего количества тучных клеток и тучных клеток в разной степени дегрануляции и расчет коэффициента дегрануляции. Подсчет тучных клеток проводили по 10 полям зрения в каждом препарате с последующим пересчетом на 1 мм². По степени дегрануляции мастоциты разделили на 3 группы: 1) I ст. — 1–2 гранулы за пределами цитоплазмы; 2) II ст. — 3–10 гранул за пределами цитоплазмы; 3) III ст. — более 10 гранул за пределами цитоплазмы. Коэффициент дегрануляции рассчитывали как отношение количества дегранулированных клеток к общему количеству тучных клеток.

Содержание гормонов в сыворотке крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Adaltis, Италия) с использованием набора реагентов компании Cusabio Biotech (Китай) — для определения

содержания ТТГ и набора реагентов компании «Вектор-Бест» (Россия) — для определения содержания тироксина и трийодтиронина в свободной и связанной фракциях.

Статистическую обработку результатов провели при помощи программного обеспечения Microsoft Excel, SPSS Statistics 20 (IBM, США), используя непараметрические методы: вычисление медианы, верхнего и нижнего квартилей. Для оценки значимости различий при межгрупповом сравнении использовали критерий Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У животных с экспериментальным гипотиреозом, не проходивших облучение, общее количество тучных клеток щитовидной железы достоверно не отличалось от значения этого показателя у интактных животных (табл. 1). У животных, выведенных из эксперимента через 1 сутки после моделирования гипотиреоза, было отмечено снижение количества тучных клеток I степени дегрануляции в сравнении с интактными крысами (табл. 2). Сравнение этих же групп при выведении животных из эксперимента через месяц показало достоверное повышение количества мастоцитов II и III степени дегрануляции и увеличение значения коэффициента дегрануляции.

При сопоставлении значений содержания гормонов T_4 и T_3 в сыворотке крови интактных животных и животных с экспериментальным гипотиреозом у последних наблюдали статистически значимое снижение содержания свободной фракции T_4 и повышение содержания ТТГ во все сроки выведения из эксперимента (табл. 3).

После лазерного облучения щитовидной железы интактных животных на ранних сроках (сутки и неделя) выведения из эксперимента изменения количества и активности мастоцитов не происходило независимо от суммарной плотности дозы, кроме снижения числа тучных клеток I степени дегрануляции через сутки выведения из эксперимента при дозе 112 Дж/см^2 (табл. 2). На 30-е сутки после облучения дозой 112 Дж/см^2 наблюдали увеличение общего количества дегранулированных мастоцитов, мастоцитов I и II степени дегрануляции, значения коэффициента дегрануляции и — снижение количества мастоцитов I степени дегрануляции. В этот же срок общее количество тучных клеток в щитовидной железе интактных животных после облучения достоверно не изменялось.

Лазерное облучение щитовидной железы интактных крыс при суммарной плотности дозы 112 Дж/см^2 способствовало понижению сывороточной концентрации ТТГ и повышению содержания свободного T_4 , свободного и общего T_3 при заборе крови через сутки после выведения животных из эксперимента (табл. 3).

В подгруппе животных с экспериментальным гипотиреозом, получивших облучение в дозе 112 Дж/см^2 и выведенных из эксперимента через сутки, наблюдали статистически значимое увеличение общего количества тучных клеток, общего количества дегранулированных мастоцитов, в том числе всех степеней дегрануляции, и значения коэффициента дегрануляции (при сравнении с крысами с гипотиреозом, не получивших облучения) (табл. 1, 2). Через месяц достоверно уменьшалось общее количество мастоцитов, общее количество дегранулированных тучных клеток и мастоцитов III степени дегрануляции. Также наблюдали статистически значимое изменение уровня гормональной секреции: уменьшение содержания ТТГ, уве-

личение содержания свободной и связанной фракций T_4 и T_3 через неделю и месяц после выведения животных из эксперимента.

При воздействии на щитовидную железу животных с экспериментальным гипотиреозом лазером в дозе 450 Дж/см^2 через неделю наблюдали снижение содержания тучных клеток II степени дегрануляции, а через месяц — снижение общего количества дегранулированных мастоцитов, тучных клеток II и III степени дегрануляции, значения коэффициента дегрануляции и содержания гормонов (при сравнении с крысами с гипотиреозом, не получивших облучения) (табл. 1, 2).

При сравнении между собой групп животных с экспериментальным гипотиреозом, получивших облучение в разных дозах, обнаружили, что лазерное воздействие с суммарностью плотностью дозы 450 Дж/см^2 приводило к уменьшению количества дегранулированных тучных клеток, значения коэффициента дегрануляции и снижению содержания гормонов во все сроки выведения животных из эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Механизм действия тиамазола заключается в нарушении синтеза гормонов тиреоцитами щитовидной железы вследствие блокирования фермента пероксидазы, участвующей в йодировании тиронина с образованием T_3 и T_4 , что способствует развитию гипотиреоза. Тучные клетки принимают участие в паракринной регуляции в норме и при патологии за счет содержания большого количества биологически активных веществ в их гранулах. Дегрануляция мастоцитов может регулироваться цитокинами, гормонами, нейропептидами. Это позволяет предположить наличие взаимосвязи между функциональным состоянием стромальных тучных клеток и функциональным состоянием тиреоцитов. Гипотеза требует проверки.

Анализируя полученные данные, можем предположить, что отсутствие существенных изменений уровня дегрануляции тучных клеток через 1 сутки после выведения животных с гипотиреозом из эксперимента (в сравнении с интактными животными, не получивших облучения) является косвенным свидетельством тормозящего эффекта тиамазола в отношении функциональной активности не только тиреоцитов, но и мастоцитов. Повышение количества мастоцитов II и III степени дегрануляции и увеличение значения коэффициента дегрануляции через месяц после выведения животных из эксперимента (при сравнении этих же групп), вероятно, отражает регенеративные процессы в ответ на повреждающее воздействие тиреостатика и является одним из показателей усиления функциональной активности щитовидной железы [10].

Снижение содержания свободной фракции T_4 и повышение содержания ТТГ во все сроки выведения из эксперимента у животных с экспериментальным гипотиреозом в сравнении с интактными крысами, отмеченные в нашем исследовании, подтверждают развитие гипотиреоза и угнетение компенсаторных механизмов организма. Увеличение содержания свободной фракции T_3 в эти сроки, вероятно, свидетельствует о повышенном дейодировании T_4 в периферических тканях для восстановления регуляторных функций.

Активация тучных клеток в щитовидной железе животных с гипотиреозом, получивших облучение в дозе 112 Дж/см^2 и выведенных из эксперимента через сутки,

Таблица 1. Сравнительная характеристика групп животных по общему количеству тучных клеток, в том числе дегранулированных, и коэффициенту дегрануляции

Группа		Общее количество тучных клеток (мм ²)	Количество дегранулированных тучных клеток (мм ²)	Коэффициент дегрануляции
Группа 1: интактные животные		15,4 (7,48;21,78)	5,06 (4,07;10,56) ^{#,1}	0,53 (0,35;0,58) ^{#,1}
Группа 2: интактные животные; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 112 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	8,58 (7,32;15,02)	4,07 (3,52;6,44)	0,45 (0,38;0,55)
	ч/з 1 неделю	10,78 (7,59;16,61)	6,27 (4,84;11,66)	0,66 (0,53;0,73)
	ч/ 1 месяц	18,15 (15,90;23,05)	12,87 (10,45;15,62) ^{#,°}	0,71 (0,59;0,80) ^{#,°}
Группа 3: интактные животные; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 450 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	11,65 (9,96;11,88)	3,30 (2,64;6,11)	0,40 (0,23;0,57)
	ч/з 1 неделю	13,20 (7,87;16,34)	3,96 (3,69;11,72)	0,46 (0,30;0,72)
	ч/ 1 месяц	12,54 (8,36;19,03)	4,84 (2,42;8,36) [°]	0,36 (0,30;0,49) [°]
Группа 4: животные с экспериментальным гипотиреозом	ч/з 1 сутки	13,86 (8,75;14,19) [*]	5,83 (5,34;6,82) [*]	0,47 (0,40;0,71) [*]
	ч/з 1 неделю	12,87 (8,47;16,23)	6,60 (5,17;11,61)	0,67 (0,39;0,79)
	ч/ 1 месяц	17,60 (16,28;20,68) [*]	14,74 (11,66;15,62) ^{1,*}	0,84 (0,73;0,92) ^{1,*}
Группа 5: животные с экспериментальным гипотиреозом; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 112 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	18,81 (16,78;20,85) [*]	17,05 (15,24;18,87) [°]	0,91 (0,90;0,91) [°]
	ч/з 1 неделю	15,51 (13,59;18,59) [*]	12,21 (11,06;16,17) [°]	0,82 (0,78;0,87) [°]
	ч/ 1 месяц	12,32 (10,34;15,18) [*]	10,78 (9,57;12,87) [°]	0,86 (0,83;0,95) [°]
Группа 6: животные с экспериментальным гипотиреозом; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 450 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	10,34 (8,58;14,41) [*]	6,27 (4,57;8,31) [°]	0,55 (0,52;0,66) [°]
	ч/з 1 неделю	9,35 (6,44;10,29) [*]	5,28 (3,80;6,60) [°]	0,60 (0,55;0,65) [°]
	ч/ 1 месяц	15,18 (14,63;16,06)	5,17 (4,57;5,94) [°]	0,35 (0,29;0,40) [°]

Примечание. Данные представлены в виде: медиана (нижний квартиль; верхний квартиль).

¹ — $p < 0,05$ при сравнении группы 4 с группой 1;

[#] — $p < 0,05$ при сравнении групп 2 и 3 с группой 1;

^{*} — $p < 0,05$ при сравнении групп 5 и 6 с группой 4;

[°] — $p < 0,05$ при сравнении между собой групп 2 и 3 и групп 5 и 6.

Таблица 2. Сравнительная характеристика групп животных по количеству тучных клеток в зависимости от степени их дегрануляции

Группа		Кол-во тучных клеток I ст. дегрануляции	Кол-во тучных клеток II ст. дегрануляции	Кол-во тучных клеток III ст. дегрануляции
Группа 1: интактные животные		2,64 (2,31;4,40) ^{#,1}	1,54 (0,88;2,53) ^{#,1}	0,44 (0,33;4,40) ¹
Группа 2: интактные животные; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 112 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	1,21 (0,44;3,47) [#]	0,99 (0,44;1,38)	2,64 (1,49;3,41) [°]
	ч/з 1 неделю	3,96 (1,93;6,16)	2,64 (1,60;4,35)	1,87 (1,21;3,52)
	ч/ 1 месяц	5,06 (4,40;6,05) ^{#,°}	4,51 (2,86;5,45) ^{#,°}	3,19 (1,87;5,39)
Группа 3: интактные животные; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 450 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	1,76 (1,54;2,64)	2,42 (1,43;4,07)	0,22 (0;0,94) [°]
	ч/з 1 неделю	3,30 (2,15;4,68)	2,09 (1,27;3,08)	0,22 (0,17;4,24)
	ч/ 1 месяц	0,88 (0,55;1,43) ^{#,°}	1,98 (0,66;2,64) [°]	1,54 (1,21;4,51)
Группа 4: животные с экспериментальным гипотиреозом	ч/з 1 сутки	1,54 (1,16;1,93) ^{1,*}	2,42 (1,60;3,74) [*]	1,87 (0,99;2,75) [*]
	ч/з 1 неделю	3,63 (2,09;6,60)	2,42 (1,71;3,91) [*]	1,65 (1,21;3,30) [*]
	ч/ 1 месяц	3,52 (1,98;3,96)	4,84 (1,98;5,50) ^{1,*}	5,94 (5,06;10,12) ^{1,*}
Группа 5: животные с экспериментальным гипотиреозом; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 112 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	4,07 (3,14;5,01) [°]	4,73 (4,46;5,01) [°]	8,25 (7,32;9,19) [°]
	ч/з 1 неделю	4,29 (2,53;4,90) [°]	3,96 (2,75;6,82) [°]	4,07 (3,30;6,82) [*]
	ч/ 1 месяц	3,74 (3,41;4,18) [°]	3,30 (2,75;3,63) [°]	3,74 (2,31;6,16) [*]
Группа 6: животные с экспериментальным гипотиреозом; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 450 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	1,10 (0,94;1,76) [°]	1,98 (1,16;5,45) [°]	2,75 (2,64;5,83) [°]
	ч/з 1 неделю	1,87 (1,21;5,50) [°]	1,21 (0,88;1,71) [°]	2,86 (1,21;3,69)
	ч/ 1 месяц	1,65 (0,66;1,98) [°]	1,32 (0,88;5,39) [°]	2,75 (1,54;3,96) [*]

Примечание. Данные представлены в виде: медиана (нижний квартиль; верхний квартиль).

¹ — $p < 0,05$ при сравнении группы 4 с группой 1;

[#] — $p < 0,05$ при сравнении групп 2 и 3 с группой 1;

^{*} — $p < 0,05$ при сравнении групп 5 и 6 с группой 4;

[°] — $p < 0,05$ при сравнении между собой групп 2 и 3 и групп 5 и 6.

и уменьшение их активности через месяц, а также снижение содержания ТТГ и увеличение содержания свободной и связанной фракций T_4 и T_3 через неделю и через месяц после лазерного воздействия позволяют говорить о стимулирующем эффекте этой дозы в отношении мастоцитов и ее положительном влиянии на функциональную актив-

ность тироцитов при гипотиреозе. Напротив, значения изучаемых показателей при дозе 450 Дж/см² (менее интенсивная дегрануляция тучных клеток, снижение содержания гормонов) позволяют сделать вывод об ослаблении функциональной активности как мастоцитов, так и цитовидной железы в целом.

Таблица 3. Содержание тиреотропного гормона (ТТГ), общей (об) и свободной (svob) фракций тироксина (Т-4) и трийодтиронина (Т-3) в сыворотке крови животных

Группа		ТТГ (mU/l)	Т-4-svob (pmol/l)	Т-4-ob (nmol/l)	Т-3sv (pmol/l)	Т-3-ob (nmol/l)
Группа 1: интактные животные		0,28 (0,21;0,75) ^{#,1}	18,87 (14,32;20,93) ^{#,1}	64,29 (39,29;138,27) ^{#,1}	2,09 (1,64;2,59) ^{#,1}	1,30 (0,96;1,39) ^{#,1}
Группа 2: интактные животные; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 112 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	0,19 (0,12;0,25) [°]	27,07 (22,60;27,67) [°]	72,45 (69,90;78,06) [°]	4,63 (4,52;6,59) [°]	1,89 (1,51;2,02) [°]
	ч/з 1 неделю	0,21 (0,09;0,26) [°]	19,55 (18,87;21,67)	90,82 (76,53;91,33) [°]	4,48 (4,35;4,82) [°]	2,05 (1,81;2,47) [°]
	ч/ 1 месяц	0,42 (0,31;0,45) [°]	23,87 (23,40;24,80) [°]	77,36 (75,00;78,06)	4,21 (3,59;4,77) [°]	2,10 (2,05;2,46) [°]
Группа 3: интактные животные; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 450 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	0,72 (0,49;0,83) [°]	15,85 (12,60;24,54)	22,40 (19,09;44,41) ^{#,°}	2,53 (1,96;2,74) [°]	1,21 (0,94;1,74)
	ч/з 1 неделю	1,49 (1,22;1,57) [°]	20,40 (15,59;26,66)	58,02 (46,99;62,76) [°]	2,32 (2,21;2,48) [°]	2,03 (1,88;2,17) [°]
	ч/ 1 месяц	0,10 (0,06;0,20) [°]	22,00 (18,11;23,07) [°]	86,74 (75,00;93,37)	4,72 (4,62;4,95) [°]	2,10 (1,93;2,40) [°]
Группа 4: животные с экспериментальным гипотиреозом	ч/з 1 сутки	1,52 (1,27;1,75) ^{1,*}	10,39 (7,61;14,87) ^{1,*}	25,96 (19,59;35,04) ¹	3,23 (3,08;3,50) ^{1,*}	1,53 (1,21;1,78) ^{1,*}
	ч/з 1 неделю	1,24 (1,17;1,39) ^{1,*}	5,64 (4,62;7,78) ^{1,*}	23,83 (22,32;42,35) ^{1,*}	2,98 (2,39;3,14) ^{1,*}	1,44 (1,32;1,95) ^{1,*}
	ч/ 1 месяц	2,36 (2,32;2,44) ^{1,*}	5,41 (5,07;8,45) ^{1,*}	57,30 (41,51;77,48) [*]	2,74 (2,64;3,12) ^{1,*}	0,99 (0,81;1,00) [*]
Группа 5: животные с экспериментальным гипотиреозом; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 112 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	0,38 (0,20;0,63) [*]	6,92 (5,16;8,65)	30,24 (24,03;59,13)	2,96 (2,64;3,83)	1,56 (1,06;1,95) [°]
	ч/з 1 неделю	0,34 (0,30;0,45) [°]	10,41 (8,91;11,29) [°]	51,22 (43,83;60,20) ^{°,*}	3,89 (3,72;4,44) [°]	2,68 (2,49;2,71) [°]
	ч/ 1 месяц	0,19 (0,10;0,57) [*]	12,21 (11,80;12,97) ^{°,*}	30,42 (28,74;41,43) [*]	3,57 (3,40;4,07) [°]	1,77 (1,37;1,96) [*]
Группа 6: животные с экспериментальным гипотиреозом; суммарная плотность дозы лазерного воздействия — 450 Дж/см ²	ч/з 1 сутки	0,61 (0,36;0,71) [*]	6,76 (6,46;7,68) [*]	38,33 (32,40;48,19)	3,76 (3,51;4,20) [*]	2,94 (2,65;3,44) [°]
	ч/з 1 неделю	0,51 (0,43;0,57) [°]	6,52 (4,57;8,33) [°]	13,92 (12,78;14,75) ^{°,*}	2,55 (2,49;2,71) [°]	2,14 (1,79;2,22) [°]
	ч/ 1 месяц	0,42 (0,31;0,70) [*]	9,26 (8,65;11,56) [°]	30,10 (29,14;34,64) [*]	2,96 (2,74;3,04) [°]	1,83 (1,77;2,10) [*]

Примечание. Данные представлены в виде: медиана (нижний квартиль; верхний квартиль).

¹ — p < 0,05 при сравнении группы 4 с группой 1;

[#] — p < 0,05 при сравнении групп 2 и 3 с группой 1;

^{*} — p < 0,05 при сравнении групп 5 и 6 с группой 4;

[°] — p < 0,05 при сравнении между собой групп 2 и 3 и групп 5 и 6.

В литературе описана дегрануляция тучных клеток в различных тканях как при низкоинтенсивном, так и при высокоинтенсивном лазерном воздействии [11–13], однако при этом высокоинтенсивное лазерное воздействие сопровождалось термическим повреждением тканей. Локальный нагрев ткани до температур, вызывающих коагуляцию белков, и выше являлся тем физическим фактором, который приводил к дегрануляции мастоцитов. Было показано, что охлаждение ткани во время высокоинтенсивного лазерного воздействия снижало дегрануляцию тучных клеток [14]. Использованный нами режим лазерного воздействия не вызывал термического повреждения тканей щитовидной железы, поэтому причиной наблюдаемого торможения дегрануляции мастоцитов, видимо, являлось превышение критических доз лазерной энергии в глубине тканей. Известно, что стимулирующие эффекты наблюдаются при дозах лазерной энергии, не превышающих 5 Дж/см², а большие дозы обладают ингибирующим действием, однако это показано только для поверхностных ран и культур тканей [15]. По мере продвижения лазерного излучения в глубину ткани происходит рассеивание и поглощение фотонов, поэтому доза энергии, реально получаемая клетками, несопоставима с дозой на поверхности кожи [2].

Изменение микроциркуляции щитовидной железы при лазерном воздействии может происходить за счет процессов, связанных с локальным синтезом оксида азота [1, 4]. Непосредственным воздействием лазера на усиление дегрануляции тучных клеток с выбросом медиаторов и цитокинов, таких как гепарин, гистамин, ферменты, факторы роста, можно объяснить усиление кровотока щито-

видной железы, что является одним из условий активации синтеза йодсодержащих гормонов тиреоидным эпителием [8, 12, 14].

Эффекты лазерного воздействия обусловлены поглощением фотонов митохондриальными и мембранными хромофорами, соответствующими длине волны лазера, изменениями в окислительно-восстановительном потенциале клетки и процессами с участием вторичных мессенджеров, запускающих каскады внутриклеточной сигнализации [15, 16]. В частности, усиление дегрануляции тучных клеток после лазерного воздействия традиционно связывают с повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция [11], следовательно, спад функциональной активности мастоцитов может быть связан со снижением проницаемости клеточных мембран для кальция, например из-за нарушения работы кальциевых каналов при воздействии высоких доз лазерной энергии.

ВЫВОДЫ

Моделирование гипотиреоза введением тиамазола изменяет содержание циркулирующих в сыворотке крови ТТГ, Т₄ и Т₃, однако не влияет на функциональную активность стромальных тучных клеток щитовидной железы: их реакция заметна только в период восстановления, после прекращения дачи препарата.

Воздействие лазера на щитовидную железу является дозозависимым и проявляется стимуляцией функциональной активности как тучных клеток, так и гормон-продуцирующей ткани щитовидной железы. Повышение функциональной активности мастоцитов и нормализация

содержания гормонов в сыворотке крови у животных с экспериментальным гипотиреозом отмечена при инфракрасном лазерном воздействии с суммарной плотностью дозы 112 Дж/см². Тормозящие эффекты наблюдаются при дозе 450 Дж/см².

Учитывая полученные нами результаты, лазерное инфракрасное воздействие с суммарной плотностью дозы на поверхности кожи 112 Дж/см² может быть дополнительно изучено с точки зрения возможности его использования для терапии гипотиреоза.

Литература

1. Москвин С. В. Эффективность лазерной терапии. Серия «Эффективная лазерная терапия». Т. 2. М.: Изд-во «Тверь»; 2015. 896 с.
2. Кравченко Т. Г., Зарезина А. С., Головнева Е. С. Оценка глубины проникновения лазерного излучения при терапевтическом воздействии методом компьютерного моделирования. Вестник новых медицинских технологий. 2007; 14 (2): 202–4.
3. Головнева Е. С., Кравченко Т. Г., Кудрина М. Г., Гужина А. О., Попов Г. К. Локальные эффекты системного лазерного облучения повышенной мощности. Вестник уральской академической науки. 2012; 2 (39): 126–127.
4. Hofling DB, Chavantes MC, Juliano AG, Cerri GG, Knobel M, Yoshimura EM, et al. As sessment of the effects of low-level laser therapy on the thyroid vascularization of patients with autoimmune hypothyroidism by color Doppler ultrasound. ISRN Endocrinol. 2012; 126720. DOI: 10.5402/2012/126720.
5. Hofling DB, Chavantes MC, Acencio MM, Cerry GG, Marui S, Yoshimura EM, et al. Effects of low-level laser therapy on the serum TGF- β concentrations in individuals with autoimmune thyroiditis. Photomed Laser Surg. 2014 Aug; 32 (8): 444–9. DOI: 10.1089/pho.2014.3716.
6. Morcos N, Omran M, Ghanem H, Elahdal M, Kamel N, Attia E. Phototherapeutic Effect of Low-Level Laser on Thyroid Gland of Gamma-Irradiated Rats. Photochem Photobiol. 2015 Jul–Aug; 91 (4): 942–51. DOI: 10.1111/php.12465.
7. Weber JBB, Mayer L, Cenci RA, et al. Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant placement in an experimental rabbit model. Laser Surg. 2014; 32 (11): 612–7.
8. Аристархов В. Г. Рекомендации по применению инфракрасного лазерного излучения у больных с патологией щитовидной железы. В сб.: Материалы научно-практической конференции ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России; 2014 г.; Рязань. Рязань: РИО РязГМУ; 2014.
9. Юшков Б. Г., Черешнев В. А., Климин В. Г., Арташян О. С. Тучные клетки. Физиология и патофизиология. М.: Изд-во «Медицина»; 2011. 240 с.
10. Арташян О. С., Храмова Ю. С., Юшков Б. Г. Участие тучных клеток в процессе репаративной регенерации щитовидной железы. Вестник уральской медицинской академической науки. 2013; 44 (2): 36–8.
11. Козель А. И., Соловьева Л. И., Попов Г. К. К механизму действия низкоинтенсивного лазерного излучения на клетку. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 128 (10): 397–9.
12. Головнева Е. С., Козель А. И., Попов Г. К. Патофизиологический механизм ревазуляризации тканей с помощью воздействия высокоинтенсивного лазерного излучения. Вестник Российской академии медицинских наук. 2003; (6): 23–6.
13. Isman CA, Yegen BC, Alican I. Methimazole-induced hypothyroidism in rats ameliorates oxidative injury in experimental colitis. J Endocrinol. 2003; 177 (3): 471–6.
14. Pinheiro AL, Browne RM, Frame JW, Matthews JB. Mast cells in laser and surgical wounds. Braz Dent J. 1995; 6 (1): 11–5.
15. Chaves ME, Araujo AR, Piancastelli AC, Pinotty M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. An Bras Dermatol. 2014 Jul–Aug; 89 (4): 616–23.
16. Залеский В. Н. К 50-летию лазерной медицины: молекулярные механизмы лазерной биостимуляции. Украинский медицинский журнал. 2010; 5 (79): 52–8.
17. Москвин СВ. Эффективност' lazernoy terapii. Seriya «Effektivnaya lazernaya terapiya». Vol. 2. Moscow: Izd-vo «Tver»; 2015. 896 p. Russian.
18. Kravchenko TG, Zarezina AS, Golovneva ES. Otsenka glubiny proniknoveniya lazernogo izlucheniya pri terapevticheskom vozdeystvii metodom komp'yuternogo modelirovaniya. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2007; 14 (2): 202–4. Russian.
19. Golovneva ES, Kravchenko TG, Kudrina MG, Gughyna AO, Popov GK. [Local effects of systemic high intensive laser radiation]. Journal of Ural Medical Academic Science. 2012; 2 (39): 126–127.
20. Hofling DB, Chavantes MC, Juliano AG, Cerri GG, Knobel M, Yoshimura EM, et al. As sessment of the effects of low-level laser therapy on the thyroid vascularization of patients with autoimmune hypothyroidism by color Doppler ultrasound. ISRN Endocrinol. 2012; 126720. DOI: 10.5402/2012/126720.
21. Hofling DB, Chavantes MC, Acencio MM, Cerry GG, Marui S, Yoshimura EM, et al. Effects of low-level laser therapy on the serum TGF- β concentrations in individuals with autoimmune thyroiditis. Photomed Laser Surg. 2014 Aug; 32 (8): 444–9. DOI: 10.1089/pho.2014.3716.
22. Morcos N, Omran M, Ghanem H, Elahdal M, Kamel N, Attia E. Phototherapeutic Effect of Low-Level Laser on Thyroid Gland of Gamma-Irradiated Rats. Photochem Photobiol. 2015 Jul–Aug; 91 (4): 942–51. DOI: 10.1111/php.12465.
23. Weber JBB, Mayer L, Cenci RA, et al. Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant placement in an experimental rabbit model. Laser Surg. 2014; 32 (11): 612–7.
24. Aristarkhov VG. Rekomendatsii po primeneniyu infrakrasnogo lazernogo izlucheniya u bol'nykh s patologiyey shchitovidnoy zhelezy. In: Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii GBOU VPO RyazGMU Minzdrava Rossii; 2014; Ryazan, Russia. Ryazan: RIO RyazGMU; 2014. Russian.
25. Yushkov BG, Chereshnev VA, Klimin VG, Artashyan OS. Tuchnye kletki. Fiziologiya i patofiziologiya. Moscow: Izd-vo «Meditsina»; 2011. 240 p.
26. Artashyan OS, Khramtsova YuS, Yushkov BG. [Participation of mast cells in process of reparative regeneration of the thyroid]. Journal of Ural Medical Academic Science. 2013; 44 (2): 36–8. Russian.
27. Kozel AI, Soloveva LI, Popov GK. K mekhanizmu deystviya nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya na kletku. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 1999; 128 (10): 397–9. Russian.
28. Golovneva ES, Kozel AI, Popov GK. [Pathophysiological mechanism of tissue revascularization by using an impact of a high-intensity laser irradiation]. Annals of the Russian academy of medical sciences. 2003; (6): 23–6. Russian.
29. Isman CA, Yegen BC, Alican I. Methimazole-induced hypothyroidism in rats ameliorates oxidative injury in experimental colitis. J Endocrinol. 2003; 177 (3): 471–6.
30. Pinheiro AL, Browne RM, Frame JW, Matthews JB. Mast cells in laser and surgical wounds. Braz Dent J. 1995; 6 (1): 11–5.
31. Chaves ME, Araujo AR, Piancastelli AC, Pinotty M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. An Bras Dermatol. 2014 Jul–Aug; 89 (4): 616–23.
32. Zalesskiy VN. K 50-letiyu lazernoy meditsiny: molekulyarnye mekhanizmy lazernoy biostimulyatsii. Ukrainskiy meditsinskiy zhurnal. 2010; 5 (79): 52–8. Russian.

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА У ПАЦИЕНТОВ С ОККЛЮЗИЕЙ ВЕН СЕТЧАТКИ

Т. В. Шелковникова^{1,2✉}, Х. П. Тахчиди³, А. Н. Волков^{4,5}, Н. Ю. Шишлянникова⁵

¹ Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей, Новокузнецк

² Кемеровская областная клиническая офтальмологическая больница, Кемерово

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

⁴ Кемеровская областная клиническая больница, Кемерово

⁵ Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово

Растет число пациентов с венозными ретинальными окклюзиями, особенно среди молодых людей. Зачастую у них выявляется генетическая предрасположенность к тромбозу. Факторами риска возникновения тромбоза являются наследственная резистентность к активированному протеину С (РАПС), генетически обусловленный дефект фактора V (FV Leiden) и присутствие в организме волчаночного антикоагулянта (ВА). В исследовании была изучена зависимость различных параметров гемостаза у пациентов с окклюзией вен сетчатки (ОВС) при наличии у них мутации FV Leiden и ВА. Обследовали 150 пациентов (150 глаз) с ОВС (средний возраст — 42 ± 10 года), затем разделили их на три группы. Группа 1: пациенты с ОВС, FV Leiden и ВА (n = 12); группа 2: пациенты с ОВС и FV Leiden (n = 11); группа 3: пациенты с ОВС без FV Leiden и ВА, отобранные из 107 человек для сопоставимой численности групп (n = 30). В контрольную группу включили 50 человек без ОВС, но с гипертонической болезнью. Показано, что индекс РАПС у пациентов с мутацией FV Leiden и ВА имеет наименьшее значение (0,6 ± 0,01) при сравнении с пациентами только с ОВС (1,50 ± 0,18) (p < 0,05). У них также повышена активность факторов V, VIII и Виллебранда и внутрисосудистая активность тромбоцитов. ВА усугубляет эндотелиоз в микроциркуляторном русле сетчатки, а в сочетании с мутацией FV Leiden усиливает тромбогенез, участвуя в патогенезе ишемического тромбоза центральной вены сетчатки и ее ветвей, что клинически проявляется ретинальным тромбогеморрагическим синдромом. Для уточнения диагноза и выбора адекватной терапии рекомендуется определение полиморфизмов генов, участвующих в регуляции гемостаза, и присутствия волчаночного антикоагулянта в организме пациента.

Ключевые слова: окклюзия вен сетчатки, активированный протеин С, резистентность, мутация FV Leiden, волчаночный антикоагулянт

✉ **Для корреспонденции:** Шелковникова Татьяна Васильевна
Пионерский бульвар, д.10а, кв.1, г. Кемерово, 650066; t.shelkovnikova@gmail.com

Статья получена: 28.11.2016 Статья принята к печати: 10.12.2016

CLINICAL AND LABORATORY FEATURES OF HEMOSTATIC DISORDERS IN PATIENTS WITH RETINAL VEIN OCCLUSION

Shelkovnikova TV^{1,2✉}, Takhchidi KhP³, Volkov AN^{4,5}, Shishlyannikova NYu⁵

¹ Novokuznetsk State Institute of Further Training of Physicians, Novokuznetsk, Russia

² Kemerovo Regional Clinical Ophthalmological Hospital, Kemerovo, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Kemerovo Regional Clinical Hospital, Kemerovo, Russia

⁵ Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

The number of patients with retinal venous occlusions is increasing, especially among young people. Often, they have revealed a genetic predisposition to thrombosis. Risk factors for thrombosis are genetic resistance to activated protein C (RAPC), genetic defect in factor V (FV Leiden) and the presence of lupus anticoagulant (LA). In this study we analyze the dependence of the various parameters of hemostasis in patients with retinal vein occlusion (RVO) on the background of FV Leiden mutation and LA. A total of 150 patients (150 eyes) with RVO (mean age — 42 ± 10 years) were examined and divided into three groups. Group 1: patients with RVO, FV Leiden and LA (n = 12); group 2: patients with RVO and FV Leiden (n = 11) without LA; group 3: patients with RVO without FV Leiden and LA, selected from remaining 107 people for a comparable number of groups (n = 30). The control group was 50 people without RVO, but with hypertension. It was shown that RAPC index in patients with FV Leiden mutation and the LA has the less value (0,6 ± 0,01) on comparison to patients with RVO (1,50 ± 0,18) (p < 0,05). They also have enhanced V, VIII and von Willebrand factors and intravascular platelet activity. LA exacerbates endotheliosis in the microvasculature of the retina and in combination with FV Leiden mutation increases the thrombogenesis, participating in the pathogenesis of ischemic thrombosis of central retinal vein and its branches, which clinically manifested as retinal thrombo-hemorrhagic syndrome. The hemostasis regulation genes polymorphisms detection (as well as lupus anticoagulant detection) is recommended to clarify the diagnosis and selection of adequate therapy.

Keywords: retinal vein occlusion, activated protein C, resistance, FV Leiden mutation, lupus anticoagulant

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana Shelkovnikova
Pionerskiy bulvar, d. 10a, kv. 1, Kemerovo, Russia, 650066; t.shelkovnikova@gmail.com

Received: 28.11.2016 Accepted: 10.12.2016

Окклюзия вен сетчатки (ОВС) — наиболее часто встречающееся сосудистое заболевание глаз: на нее приходится до 60 % случаев острой сосудистой патологии органа зрения, при этом по тяжести поражения сетчатки и неблагоприятному прогнозу ОВС занимает второе место после диабетической ретинопатии [1, 2]. Тромбоз ретинальных вен часто предшествует таким угрожающим жизни состояниям, как острый инфаркт миокарда и инсульт головного мозга. Возникновение и развитие ОВС принято объяснять с позиций теории коагулопатии, т. е. дисбалансом между тромбогенными и антитромбогенными факторами. В последние годы отмечается рост числа пациентов с окклюзиями ретинальных вен, особенно среди молодых и работоспособных людей, у которых выявляется генетическая предрасположенность к тромбозу [3].

Термин «тромбофилия» означает предрасположенность к тромбозу вследствие наличия у пациента генетически обусловленных или приобретенных дефектов как прокоагулянтов, так и антикоагулянтов системы гемостаза. Один из факторов риска возникновения венозного тромбоза — наследственная резистентность к активированному протеину С (activated protein C resistance — APC-резистентность, или индекс резистентности к активированному протеину С — индекс РАПС). Другой фактор — дефект фактора V (factor V Leiden, FV Leiden). Мутантный фактор V гораздо медленнее, чем в норме, расщепляется активированным протеином С, что и приводит к повышению скорости образования тромбина и при определенных условиях — к возникновению тромбоза в любом возрасте. РАПС может иметь как наследственный, связанный с FV Leiden, так и приобретенный характер: за счет появления в организме антифосфолипидных антител, а также на фоне приема контрацептивов [4–6].

Антифосфолипидные антитела (АФА) участвуют в изменении гомеостатической регуляции свертывания крови. Точный механизм развития тромбоза при участии АФА, в том числе волчаночного антикоагулянта (ВА), еще не определен. Существует гипотеза, что протромботический механизм действия АФА заключается в нарушении эндогенных антикоагулянтных механизмов: снижении антитромботического потенциала сосудистой стенки и активности естественных антикоагулянтов, что и приводит к развитию гиперкоагуляции [7–11].

Нарушения в системе гемостаза и их клинические проявления у пациентов с ОВС с мутацией FV Leiden и присутствием в организме ВА мало изучены. Целью работы являлось изучение особенностей клинико-лабораторной диагностики таких нарушений у пациентов с ОВС как при наличии только мутации FV Leiden, так и при сочетании двух патогенетических факторов — мутации FV Leiden и присутствия в организме ВА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 150 пациентов (150 глаз) с окклюзией вен сетчатки, из них 63 мужчины и 87 женщин. Средний возраст пациентов составил 42 ± 10 года. Тромбоз ветвей центральной вены сетчатки (ЦВС) был выявлен у 78 человек (52 %), тромбоз ЦВС — у 72 человек (48 %). У 56 пациентов была выявлена гипертоническая болезнь, у 30 — ишемическая болезнь сердца, у 15 — варикозное расширение вен нижних конечностей. Сроки наблюдения пациентов составили от 2 недель до 2 лет.

По результатам обследования пациентов распределили на три группы. Группа 1 : 12 человек с FV Leiden и ВА;

группа 2 : 11 человек только с FV Leiden; группа 3: 107 человек с ОВС без резистентности к активированному протеину С. Из группы 3 для статистической обработки взяли данные только 30 человек, чтобы численность всех групп пациентов была сопоставимой. В контрольную группу включили 50 человек без ОВС, но с гипертонической болезнью, без признаков системных и аутоиммунных поражений соединительной ткани, ишемической болезни сердца, онкологии, тяжелых хронических инфекций. Соотношение полов М : Ж в контрольной группе: 20 : 30.

Для установления диагноза использовали стандартные методы офтальмологического исследования: визометрию, тонометрию, периметрию, прямую офтальмоскопию, — а также некоторые специальные методы: осмотр глазного дна с линзой Гольдмана, флюоресцентную ангиографию глазного дна, оптическую когерентную томографию сетчатки, компьютерную периметрию.

Исследования системы гемостаза проводили скрининговыми и специальными методами автоматизированной коагулометрии. Определяли активность фактора Виллебранда (ФВ), антитромбина III, активированного протеина С, коагуляционного фактора VIII; содержание фактора V в плазме крови; резистентность фактора V к активированному протеину С (индекс РАПС); содержание растворимых фибриномономерных комплексов (РФМК) и фибриногена (по Клаусу).

Выявление волчаночного антигена проводили с использованием ядовитых тестов, а также подтверждающих тестов с плазмой донора и корригирующими фосфолипидами с помощью наборов реактивов фирм «Технология-стандарт» (Россия) и Instrumentation Laboratory (Италия). Через 6 недель проводили повторное исследование.

Определение мутации FV Leiden и полиморфизмов других генов предрасположенности к тромбофилии проводили методом полимеразной цепной реакции «в реальном времени».

В работе использовали коагулометр CL-4 (Behnk Elektronik, Германия) и агрегометр производства компании НПФ «Биола» (Россия). Все исследования были выполнены на базе лаборатории гемостаза и лаборатории генетики Кемеровской областной клинической больницы.

Статистическая обработка результатов была выполнена на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для описания групп использовали выборочные параметры: среднее значение и стандартную ошибку среднего значения. Сравнение групп осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из 150 пациентов с ОВС волчаночный коагулянт выявили у 32 человек (21 %), при этом у 20 из них отсутствовала мутация FV Leiden, а у 12 — присутствовала. Пациентов с ОВС и только мутацией FV Leiden было 11 (7,3 %). Анализ параметров системы гемостаза (таблица) показал, что у пациентов группы 2 (только мутация) и группы 1 (мутация и ВА) содержание РФМК и фибриногена достоверно выше на 20 и 15 % и 37,5 и 20 % соответственно по сравнению с пациентами группы 3 (только ОВС). У пациентов группы 1 внутрисосудистая активация тромбоцитов выше, чем у пациентов группы 2: сумма активных форм тромбоцитов больше на 16,2 %, число тромбоцитов, вовлеченных в агрегаты, — на 26,3 %. У пациентов группы 3

Показатели системы гемостаза у пациентов с окклюзией вен сетчатки (ОВС) в зависимости от наличия у них мутации FV Leiden и присутствия в крови волчаночного антикоагулянта (ВА)

Показатель	Контрольная группа (n = 50)	Группа 1: пациенты с ОВС, мутацией FV Leiden и ВА (n = 12)	Группа 2: пациенты с ОВС, мутацией FV Leiden без ВА (n = 11)	Группа 3: пациенты с ОВС без мутации FV Leiden и ВА (n = 30)
Фактор V, %	100,0 ± 8,7	125,0 ± 4,3 ^{a,c}	128,0 ± 4,3 ^{a,c}	132,0 ± 3,9 ^{a,c}
Фактор VIII, %	102,0 ± 9,6	235,0 ± 2,2 ^{a,b,c}	265,0 ± 4,3 ^{a,b,c}	185,0 ± 6,6 ^{a,b,c}
Фактор Виллебранда, %	100,0 ± 7,5	155,0 ± 5,8 ^{a,b,c}	170,0 ± 9,0 ^{a,b,c}	130,0 ± 12,3 ^{a,c}
Индекс РАПС	1,8 ± 0,02	0,65 ± 0,01 ^{a,b,c}	0,74 ± 0,01 ^{a,b,c}	1,40 ± 0,02 ^{a,c}
Протеин С, %	104,0 ± 7,8	118,0 ± 4,7 ^{a,b,c}	142,0 ± 5,1 ^{a,b,c}	145,0 ± 6,7 ^{a,c}
Антитромбин III, %	116,0 ± 11,7	155,0 ± 5,8 ^{a,b,c}	118,0 ± 3,8 ^{a,b,c}	122,0 ± 10,4 ^{a,c}
Фибриноген, %	3,2 ± 0,2	5,0 ± 0,3 ^{a,c}	4,6 ± 0,2 ^{a,c}	4,0 ± 0,2 ^{a,c}
РФМК, мг%	4,6 ± 0,2	11,0 ± 0,5 ^{a,c}	10,0 ± 0,5 ^{a,c}	8,0 ± 0,5 ^{a,c}
Сумма активных форм тромбоцитов, %	12,8 ± 0,5	37,3 ± 1,7 ^{a,b,c}	31,0 ± 1,1 ^{a,b,c}	28,0 ± 2,1 ^{a,c}
Число тромбоцитов, вовлеченных в агрегаты, %	6,8 ± 0,4	9,9 ± 0,3 ^{a,b,c}	7,1 ± 0,6 ^{a,b,c}	6,1 ± 0,5 ^{a,c}

a — p < 0,05 при сравнении групп 1, 2 и 3 с контрольной группой,
 b — p < 0,05 при сравнении групп 1 и 2 между собой,
 c — p < 0,05 при сравнении групп 1 и 2 с группой 3.

в тромбоцитарном звене гемостаза также отмечено значимое усиление внутрисосудистой активации тромбоцитов, но менее выраженное, чем у пациентов с мутацией FV Leiden без ВА: 10,7 % против 16,4 % соответственно. В группах 1 и 2 повышена активность фактора V на 25 % по сравнению с контрольной группой. Отмечено достоверное повышение активности коагуляционного фактора VIII в группах 1 и 2 в 2,3 и 2,6 раза соответственно по сравнению с контрольной группой и на 27 и 30 % соответственно — по сравнению с группой 3 (только ОВС). Активность фактора Виллебранда также была выше во всех трех группах пациентов с ОВС в сравнении с контрольной группой: на 55, 70 и 30 % для групп 1, 2 и 3 соответственно. Это доказывает, что при окклюзии вен сетчатки повреждение эндотелия венозных сосудов играет ведущую роль в патогенезе заболевания. Однако повышение активности фВ у пациентов групп 1 и 2 было более заметным в сравнении с группой 3: на 16 и 23,5 % соответственно.

У пациентов с острой ОВС в группах 2 и 3 была несколько повышена активность протеина С при сопоставлении с результатами пациентов контрольной группы: на 36,5 и 39,4 % соответственно. РАПС была снижена в группах 1 и 2 на 64,0 и 58,9 % в сравнении с группой здоровых людей. У пациентов группы 3 РАПС была выше, чем в группах 1 и 2, на 53,6 и 46,4 % соответственно. Снижение индекса РАПС при наличии мутации FV Leiden более заметно в присутствии волчаночного антикоагулянта.

У пациентов с ОВС во всех группах было повышено содержание белка воспаления фибриногена в сравнении со здоровыми людьми: на 56,3, 43,3 и 25,0 % для групп 1, 2 и 3 соответственно. Значение этого показателя в группах 1 и 2 было выше, чем в группе 3, в 1,5 и 1,2 раза соответственно.

Клинически у пациентов групп 1 и 2 выявили нарушения микроциркуляции с микровазоокклюзивными процессами в сосудах сетчатки. Флуоресцентная ангиография глазного дна доказала у них наличие ликедж синдрома, отсутствие капиллярной перфузии и возникновение локальной ишемии в сетчатке, как в центральных ее отделах, так и на периферии (рис. 1, 2). Также у всех этих пациен-

тов наблюдался ишемический тромбоз ЦВС и ее ветвей с высоким кистозным макулярным отеком (средняя толщина сетчатки в макуле по OCT — 790 ± 20 мкм). Персистирующий кистозный макулярный отек был отмечен у 8 % пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение активности фактора V можно объяснить присутствием в крови пациентов групп 1 и 2 FV Leiden. Он медленнее расщепляется активированным протеином С, поэтому дефектный фактор V накапливается в крови. Фактор V участвует в активации протромбиназы (XIa, VIIIa, фВ), в результате происходит превращение протромбина в тромбин. Дефектный фактор V медленно инактивируется протеином С, поэтому долго сохраняется активность фактора VIII, чем и объясняется его повышенное содержание.

Антифосфолипидные антитела волчаночноподобного типа взаимодействуют с компонентами сосудистой стенки и эндотелием; происходит увеличение синтеза фВ и VIII ф. ВА активирует тромбоциты через мембранные рецепторы, способствует высвобождению из тромбоцитов гистамина, серотонина и тромбоцитарных факторов 3 и 4, подавляет синтез простаглицина (мощного дезагреганта и дилататора сосудов), активность тромбомодулина и протеинов С и S и тем самым провоцирует состояние гиперкоагуляции. ВА ломает нормальную регуляцию системы гемостаза и увеличивает потребление прокоагулянтов и физиологических антикоагулянтов. Он также поддерживает асептическое воспаление в венозной сосудистой стенке и способствует активации тромбогенеза в микроциркуляторном русле сосудов сетчатки.

ВЫВОДЫ

Проведенное лабораторное и клиническое исследование нарушений в системе гемостаза у пациентов с окклюзией вен сетчатки показало, что в присутствии мутации FV Leiden значительно повышена активность факторов V, VIII

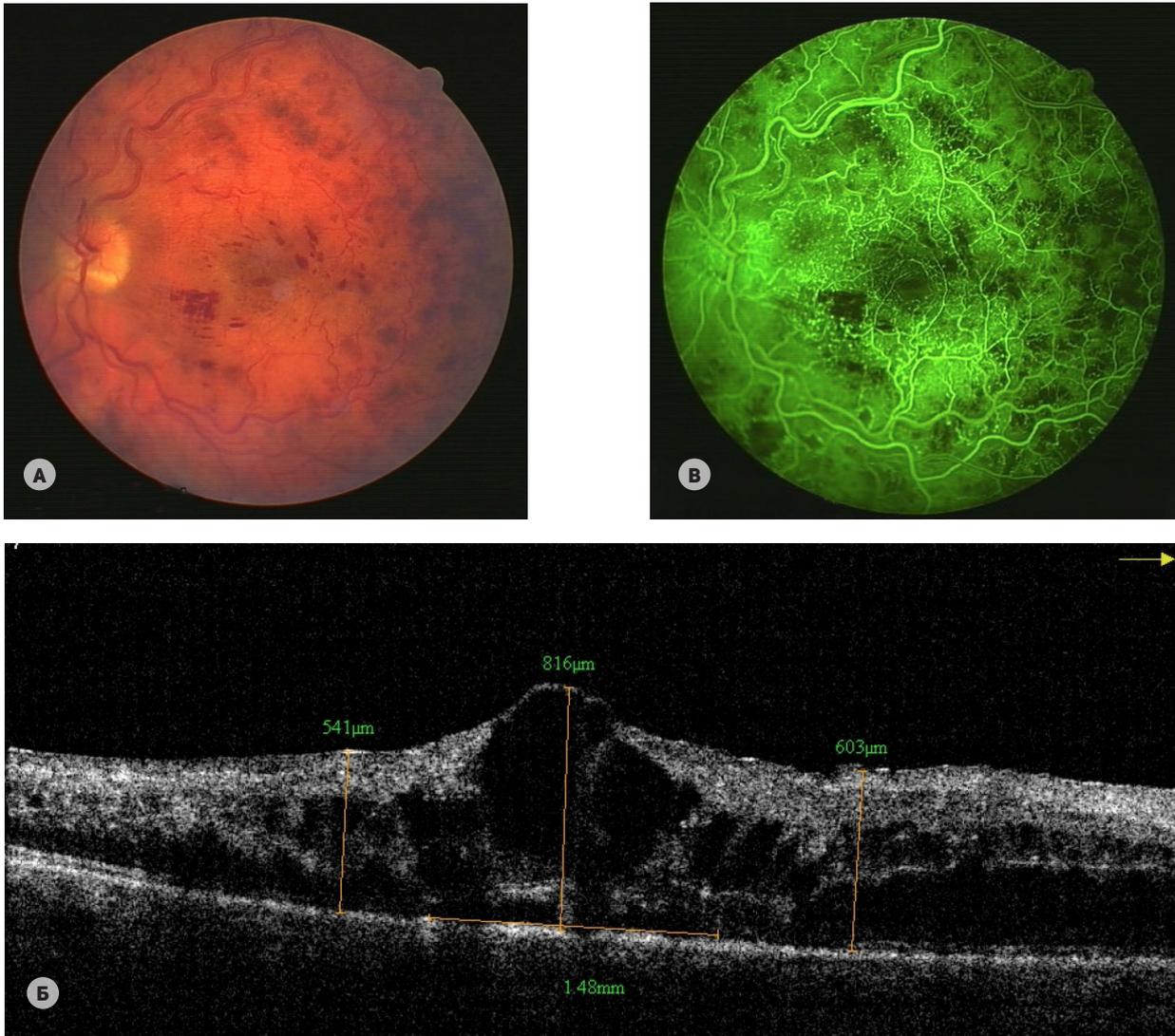


Рис. 1. Пациент С., 38 лет. Диагноз — тромбоз центральной вены сетчатки с волчаночным антикоагулянтом и мутацией FV Leiden. **(А)** Выраженный ретиальный геморрагический синдром. **(Б)** Результаты оптической когерентной томографии. Отмечается диффузный высокий кистозный макулярный отек; толщина сетчатки в фовеа — 816 мкм, в пери-парафовеа — 541–603 мкм; деструкция пигментного эпителия и фоторецепторного слоя, $d = 148$ мм. **(В)** Результаты флуоресцентной ангиографии глазного дна. Ликедж из сосудов сетчатки, кистозный макулярный отек, зоны ишемии сетчатки

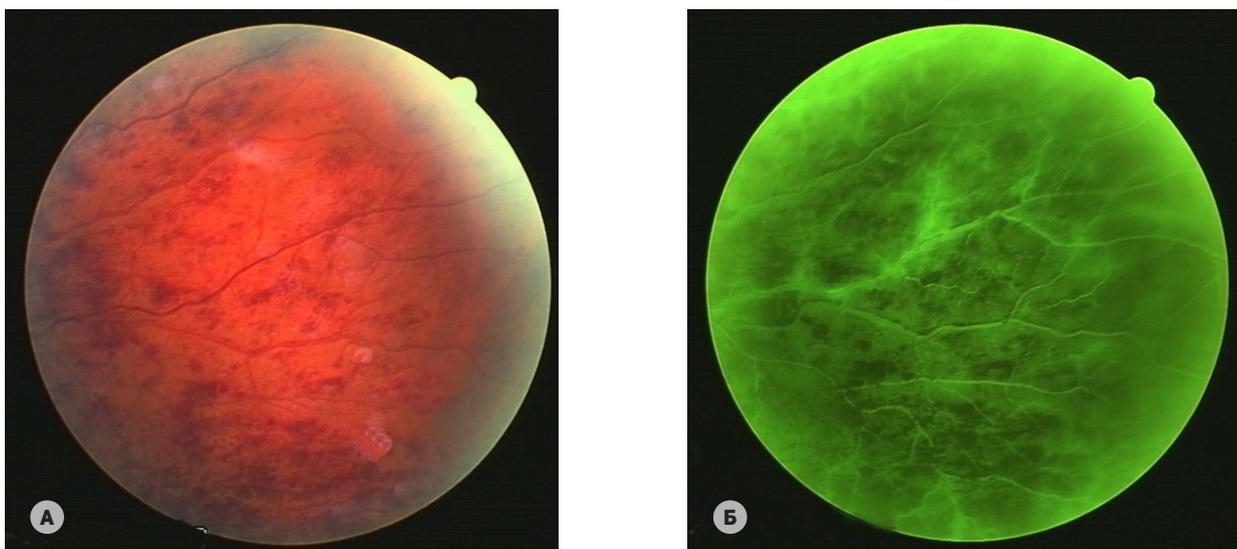


Рис. 2. Пациент С., 38 лет. Диагноз — тромбоз центральной вены сетчатки с волчаночным антикоагулянтом и мутацией FV Leiden. **(А)** Средняя периферия, выраженный ретиальный геморрагический синдром. **(Б)** Результаты флуоресцентной ангиографии глазного дна. Ликедж из сосудов сетчатки, кистозный макулярный отек, зоны ишемии сетчатки

и Виллебранда и снижена резистентность к активированному протеину С, а в сочетании с присутствием в организме волчаночного коагулянта происходит значительное усугубление эндотелиоза, тромбинемии и тромбогенеза в микроциркуляторном русле сетчатки, что клинически проявляется тромбгеморрагическим синдромом. Степень снижения индекса РАПС в присутствии мутации FV Leiden более выражена при одновременном присутствии в организме ВА.

АРС-резистентность, как наследственная (мутация FV Leiden), так и приобретенная (ВА), является фактором на-

рушения регуляции системы гемостаза у пациентов с ОВС, поэтому имеет значение для понимания патогенеза ишемического тромбоза ЦВС.

Полученные нами результаты доказывают необходимость определения полиморфизмов генов, участвующих в регуляции гемостаза, и ВА у пациентов с ОВС для уточнения генеза тромбоза вен сетчатки, а также постоянного лабораторно-клинического контроля гемостаза пациентов с ОВС для обеспечения своевременной диагностики и назначения адекватной комплексной антикоагулянтной, дезагрегантной, антиоксидантной и афферентной терапии.

Литература

1. Крылова А. А., Запужалов И. В., Кривошеина О. И. Этиология и патогенез тромбоза ретинальных вен: современное состояние проблемы. Бюл. сибирск. мед. 2015; 14 (2): 82–90.
2. Астахов Ю. С., Петрищев Н. Н., Варганова Т. С., Тульцева С. Н. Тромбофилии в патогенезе тромбоза ретинальных вен. Вестн. офтальмол. 2008; 124 (3): 56–9.
3. Тульцева С. Н., Астахов Ю. С. Окклюзии вен сетчатки (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение). СПб.: Изд-во «Н-Л»; 2010. 112 с.
4. Кобылянская В. А. Резистентность к активированному протеину С — причина наследственной и приобретенной тромбофилии. Уч. зап. СПбГМУ. 2004; 11 (3 Прилож.): 20–5.
5. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: routine testing for Factor V Leiden (R506Q) and prothrombin (20210G>A) mutations in adults with a history of idiopathic venous thromboembolism and their adult family members. Genet Med. 2011 Jan; 13 (1): 67–76.
6. Dhôte R, Bachmeyer C, Horellou MH, Toulon P, Christoforov B. Central retinal vein thrombosis associated with resistance to activated protein C. Am J Ophthalmol. 1995 Sep; 120 (3): 388–9.
7. Папаян Л. П., Кобылянская В. В., Шитикова А. С. Общие принципы диагностики антифосфолипидного синдрома. Уч. зап. СПбГМУ. 2004; 11 (3 Прилож.): 59–62.
8. Папаян К. А., Савенкова Н. Д. Антифосфолипидный синдром в практике педиатора-нефролога. Тромбоз, гемостаз и реология. 2014; 58 (2): 9–15.
9. Смирнова Т. В. Офтальмологические проявления антифосфолипидного синдрома. Вестн. офтальмол. 2007; 123 (2): 49–53.
10. Шелковникова Т. В., Тахчиди Х. П., Кацадзе Ю. Л., Вавин Г. В., Шишлянникова Н. Ю. Особенности клинико-лабораторной диагностики нарушений в системе гемостаза у пациентов с окклюзией вен сетчатки. Мед. алфавит. 2015; 3 (21): 44–7.
11. Шелковникова Т. В., Тахчиди Х. П., Коршунов Г. В., Кацадзе Ю. Л., Шишлянникова Н. Ю. Ретинальный тромбгеморрагический синдром у пациентов с нарушениями в системе гемостаза на фоне сахарного диабета II типа. Мед. алфавит. 2015; 2 (8): 39–42.

References

1. Krylova AA, Zapuskalov IV, Krivosheina OI. [Etiology and pathogenesis of retinal vein occlusion: the actual state of a problem]. Byulleten' sibirskoi meditsiny. 2015; 14 (2): 82–90. Russian.
2. Astakhov IuS, Petrishchev NN, Varganova TS, Tul'tseva SN. [Thrombophilia in the pathogenesis of retinal vein thrombosis]. Vestn Oftalmol. 2008 May–Jun; 124 (3): 56–9. Russian.
3. Tul'tseva SN, Astakhov YuS. Okklyuzii ven setchatki (etiologiya, patogenez, klinika, diagnostika, lechenie). St. Petersburg: Izdatel'stvo "N-L"; 2010. 112 p. Russian.
4. Kobilyanskaya VA. Rezistentnost' k aktivirovannomu proteinu S — prichina nasledstvennoi i priobretennoi trombofilii. Uchenye zapiski SPbGMU imeni akademika IP Pavlova. 2004; 11 (3 Suppl): 20–5. Russian.
5. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: routine testing for Factor V Leiden (R506Q) and prothrombin (20210G>A) mutations in adults with a history of idiopathic venous thromboembolism and their adult family members. Genet Med. 2011 Jan; 13 (1): 67–76.
6. Dhôte R, Bachmeyer C, Horellou MH, Toulon P, Christoforov B. Central retinal vein thrombosis associated with resistance to activated protein C. Am J Ophthalmol. 1995 Sep; 120 (3): 388–9.
7. Papayan LP, Kobilyanskaya VV, Shitikova AS. Obshchie printsipy diagnostiki antifosfolipidnogo sindroma. Uchenye zapiski SPbGMU imeni akademika IP Pavlova. 2004; 11 (3 Suppl): 59–62. Russian.
8. Papayan KA, Savenkova ND. [Antiphospholipid syndrome in practice of pediatric nephrologist]. Tromboz, gemostaz i reologia. 2014; 58 (2): 9–15. Russian.
9. Smirnova TV. [Ophthalmological manifestations of the antiphospholipid syndrome]. Vestn Oftalmol. 2007 Mar–Apr; 123 (2): 49–53. Russian.
10. Shelkovnikova TV, Takhchidi KhP, Katsadze YL, Vavin GV, Shishlyannikova NY. [Clinical and laboratory diagnostics of disorders in hemostatic system in patients with retinal vein occlusion]. Meditsinskii alfavit. 2015; 3 (21): 44–7. Russian.
11. Shelkovnikova TV, Takhchidi KhP, Korshunov GV, Katsadze YuL, Shishlyannikova NYu. Retinal'nyi trombogemorragicheskii sindrom u patsientov s narusheniyami v sisteme gemostaza na fone sakharnogo diabeta II tipa. Meditsinskii alfavit. 2015; 2 (8): 39–42. Russian.

КРАДЕНАЯ НАУКА: ПОЧЕМУ ПЛАГИАТ И САМОПЛАГИАТ НЕПРИЕМЛЕМЫ

Е. Ю. Куликова ✉

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Плагиат, то есть заимствование чужих идей, текстов, рисунков и других материалов без указания того, кто является их автором, — это грубое нарушение публикационной этики, которое при обнаружении факта заимствований в публикации влечет за собой отказ (retraction) журнала от нее. Для авторов это непоправимый удар по профессиональной репутации, так как публикация не изымается из многочисленных электронных архивов, а присутствует там с пометкой retracted publication. Плагиат принимает различные формы, многие из которых не могут быть выявлены с помощью специализированного программного обеспечения, и по-прежнему важную роль в оценке оригинальности работ играют рецензенты и читатели. Плагиат может быть непредумышленным. Чаще всего неправильное цитирование и оформление ссылок свойственно работам молодых исследователей. Во избежание неприятных ситуаций следует отказаться от копирования фрагментов в пользу их перефразирования, дословные цитаты брать в кавычки, расставлять ссылки непосредственно после заимствованных фрагментов, избегая «кустовых» ссылок (5–10 ссылок на один тезис), тщательно проверять выходные данные всех ссылок. Первому автору или автору-корреспонденту следует также проверять качество работы соавторов. Полное или частичное копирование авторами собственных ранее опубликованных работ считается самоплагиатом и недопустимо по правилам большинства научных журналов.

Ключевые слова: этика публикаций, плагиат, самоплагиат, отказ от публикации

✉ **Для корреспонденции:** Куликова Елена Юрьевна
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; elena.yu.kulikova@gmail.com

Статья получена: 28.12.2016 **Статья принята в печать:** 29.12.2016

STOLEN SCIENCE: WHY PLAGIARISM AND SELF-PLAGIARISM ARE UNACCEPTABLE

Kulikova EYu ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Plagiarism is appropriation of someone else's ideas, texts, images and other materials without acknowledging their author. It is a serious violation of publication ethics that once detected results in the retraction of the submitted article. It has a disastrous impact on the author's reputation, because the publication is not removed from online databases, but stored there with a retracted publication tag. Plagiarism comes in different forms many of which still cannot be detected even by a special software; Plagiarism comes in different forms; the originality of an article is still assessed by peer reviewers and readers in the first place. Plagiarism can be unintentional. Most often, poor citation and reference style is typical of young researchers. To avoid unpleasant situations, authors are advised to use paraphrasing instead of merely copying and pasting fragments of texts. A verbatim use of a source requires quotation marks, references are expected to come right after the fragment borrowed from the original source; with multiple references (from 5 to 10) pointing to a single idea are bad style. Authors are advised to always double check basic information about the publication they specify in a reference. The first author and a corresponding author are expected to monitor the quality of their co-authors' work. Full or partial copying of a previously published article by the same author is considered self-plagiarism and does not comply with the guidelines of the majority of academic journals.

Keywords: publication ethics, plagiarism, self-plagiarism, retraction of publication

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Kulikova
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; elena.yu.kulikova@gmail.com

Received: 28.12.2016 **Accepted:** 29.12.2016

Your work is both good and original. Unfortunately, the parts that are good are not original, and the parts that are original are not good.

Samuel Johnson

«Публикуйся или умри» (publish or perish) — три слова, определяющие трагизм положения современного исследователя. Чтобы заниматься наукой с удовольствием, приходится бороться за ресурсы — работу и финансирование, то есть — делать карьеру. Количество и качество научных публикаций положены в основу системы оценки эффективности и поощрения ученых во многих странах. В результате каждый день публикуются сотни работ,

и этим обстоятельством пользуются недобросовестные исследователи, крадущие идеи и тексты или публикующие собственные результаты по много раз во имя карьерного роста — уличить их в этом нелегко. Мы бы хотели предостеречь молодых исследователей от ошибок, а опытным — напомнить об ответственности за их работу, и подготовили статью, разъясняющую суть плагиата и самоплагиата и дающую рекомендации, как избежать

неправомерных действий, способных разрушить профессиональную репутацию.

Неэтичное поведение в науке — серьезная социально-экономическая проблема, особенно в медицине. По некоторым данным, результаты 90 % биомедицинских исследований невозможно воспроизвести, то есть ими нельзя пользоваться в дальнейших изысканиях, и причина кроется в искажении публикуемых данных и некорректном статистическом анализе [1]. Фальсификация и фабрикация данных идут рука об руку с плагиатом и самоплагиатом, помогая скрыть факт заимствования. Именно поэтому правилами International Committee of Medical Journal Editors отказ от публикации (retraction) — сообщение редакции журнала о недоверии результатам исследования — предусмотрен для статей, в отношении которых установлен факт фальсификации, фабрикации или кражи данных [2].

В абсолютном и относительном выражении число публикаций, от которых отказались журналы, невелико: так, согласно результатам исследования Amos [3], в 2008–2012 гг. в базе PubMed содержалось 835 статей с пометкой retracted publication, что составило всего 0,02 % от общего числа статей, помещенных в базу в эти годы. Однако Wager и Williams [4] отмечают тенденцию к росту числа статей, от которых отказались. По разным данным, плагиат является причиной отказа в 9,8–17,0 % случаев [3]. В Сети действует блог, в котором отслеживают retracted publications — Retraction Watch [5].

Плагиат: ctrl + c, error 404 и салями

Что же такое плагиат в науке? Если коротко, то — заимствование идей и текстов других людей без указания их авторства. Некоторые исследователи [6], ссылаясь на определение плагиата World Association of Medical Editors (нам не удалось найти его на сайте WAME), указывают на то, что плагиатом следует считать 6 или более последовательно расположенных слов (не менее 30 букв), заимствованных без указания источника. На определении доли заимствований построена работа и различных приложений для поиска совпадений: русскоязычного «Антиплагиата» и англоязычных iThenticate, CrossCheck и др. Однако справедливо замечено, что такой «количественный» подход неэффективен, поскольку плагиат принимает различные формы [7, 8].

Самой грубой разновидностью плагиата является выдача чужой публикации, практически не измененной, за собственную. Чаще всего к этому приему прибегают исследователи, пишущие на языках, недоступных англоязычному сообществу, или крадущие у авторов, пишущих на таких языках. Например, статья Ольги Байдик, опубликованная на русском языке в неиндексируемом журнале, оказалась перепечатана с незначительными изменениями на английском языке в Пакистане [7]. В исследовании Amos [3] чаще всего в плагиате уличали исследователей из Китая, Индии, Италии, Турции, Туниса.

Самой распространенной разновидностью плагиата является плагиат по типу «копировать–вставить» без указания источника заимствования. На него похож плагиат по типу «найти–заменить»: в заимствованном фрагменте замещают отдельные слова собственными, маскируя недобросовестное поведение. «Гибридный» плагиат заключается в смешивании заимствованных фрагментов и указании авторов только для части из них. Такая форма кражи текста создает видимость соблюдения правил.

Несколько особняком стоят такие типы заимствований, как «ошибка 404» и «агрегатор» [8]. В первом случае недобросовестные авторы используют чужой текст и оформляют ссылку на несуществующую работу или некорректно оформляют ссылку на существующую работу, во втором — корректно оформляют ссылку на существующую работу, но в действительности эта работа не содержит заимствованных сведений. Обычно рецензенты и редакторы проверяют соответствие содержания статей, на которые ссылаются авторы, приводимым сведениям, и такое мошенничество легко обнаружить.

Самая спорная разновидность плагиата — так называемый самоплагиат (self-plagiarism). Многие исследователи недоумевают: разве можно украсть что-либо у самого себя? С одной стороны, нет (если только права на публикацию не были переданы издателю; тогда при копировании собственного текста его все же крадут у издателя), но с другой, в самом строгом этическом смысле, — самоплагиат является формой недобросовестного поведения автора. Во-первых, назначение всякой научной публикации — сообщение нового знания, и переработка прежнего текста (text recycling) или неоднократная публикация ранее представленных результатов исследования (redundant publication) — это обман ожиданий коллег. Во-вторых, количество и качество научных публикаций определяют возможность исследователя занимать различные должности и получать финансирование, и умножение числа работ на пустом месте — это обман работодателей и финансирующих исследования организаций. В-третьих, после публикации результаты исследования становятся в некоторой мере достоянием общественности: другие исследователи ссылаются на эту работу, и появление той же публикации в других журналах, то есть приобретение статьей других выходящих данных, размывает ее цитируемость — это обман самого себя.

Часто авторы публикуют одни и те же работы на разных языках, например родном и английском, однако правилами International Committee of Medical Journal Editors строго оговаривается, что дублирующая публикация (duplicate publication) возможна лишь тогда, когда содержащиеся в ней сведения крайне важны для общественного здоровья и должны быть донесены до максимального числа людей. При этом такая публикация должна содержать недвусмысленную отсылку к оригинальной работе, а журнал, публикующий статью повторно, должен получить разрешение на это у журнала, опубликовавшего оригинал.

Еще одна хитрость недобросовестных исследователей — «нарезка салями» (salami slicing), то есть представление результатов исследования не одной работой, а несколькими, в каждой из которых обсуждается один или несколько аспектов одного и того же исследования. Такое поведение бывает оправданным, если объем данных, полученных в исследовании, действительно велик, но чаще всего оно продиктовано желанием увеличить число публикаций. Такой подход к представлению результатов лишает читателей возможности дать им глубокую, комплексную оценку.

Допустимая практика — подготовка публикаций по результатам доклада на конференции или представление части данных диссертационной работы. Но и здесь есть свои нюансы. Например, требования к оформлению тезисов отличаются от конференции к конференции, и иногда данные необходимо представить настолько подробно, что тезисы становятся практически неотличимы от полноценной публикации. В «Вестнике РГМУ» мы приняли решение отклонять рукописи, написанные «по следам»

таких тезисов — как правило, они не обладают научной новизной. Мы также неоднократно сталкивались с желанием исследователей опубликовать статьи с результатами диссертационного исследования после защиты диссертации. Действительно, бывает так, что в преддверии защиты промежуточные результаты не публиковали (набрали формально необходимое число публикаций за счет содержания других работ), но считают нужным представить итог работы более широкой публике. Мы приняли решение, что это допустимо, лишь если диссертация была защищена менее одного года назад. Ведь ее автореферат, как правило, публикуется, доступ к диссертации возможен через различные библиотечные ресурсы, то есть работа попадает в поисковую выдачу в интернете, на нее можно ссылаться, и в этом контексте статья в журнале не будет обладать научной новизной.

Преступление и наказание

Плагиат и самоплагиат могут быть результатом как преднамеренных действий исследователей, так и отсутствия опыта в деле написания научных статей. Мотивацией для недобросовестного поведения могут быть и конкуренция в профессиональной среде, и обязательства перед финансирующей организацией, и личные амбиции, особенно если исследователь недостаточно образован. Некоторые исследователи прибегают к плагиату, если пишут статью на неродном для них английском языке и хотят повысить его качество [9]. Правда, никогда нельзя быть уверенным, что в работе, из которой заимствованы фрагменты, с английским языком все в порядке. К тому же какими бы ни были характер и причины плагиата, любой приличный журнал откажет в публикации рукописи с некорректными заимствованиями. Если имеет место неправильное оформление цитат и ссылок, автор может получить шанс исправить рукопись [10], но решения, как правило, индивидуальны. Чем выше уровень журнала, а значит, и конкурс статей на попадание в него, тем меньше времени у редактора на анализ отдельных ситуаций: рукопись может быть отклонена по формальному признаку.

Если плагиат был обнаружен после публикации статьи, журнал должен отказаться от нее: опубликовать сообщение, в котором указываются выходные данные статьи, инициатор и причины отказа от нее, а также во все электронные версии статьи добавить указание на то, что от нее отказались [2]. Статья не изымается ни из бумажных, ни из электронных архивов — она остается в них навсегда в статусе retracted publication. Ничем не запятнанная репутация авторов не является причиной для смягчения наказания. Более того, редактор имеет право уведомить организации авторов о неэтичном поведении их сотрудников с предложением инициировать экспертизу более ранних работ. Кстати, если виновником плагиата стал один из соавторов, ответственность за нарушение разделяют все, кто поставил подпись на авторском соглашении, направленном в журнал. Это является следствием определения авторства по международным правилам [2].

Каким образом обнаруживают плагиат? При поступлении рукописи в редакцию ее обязательно проверяют с помощью специализированного программного обеспечения. Оно работает несовершенно: во-первых, невозможно сопоставление текстов, написанных на разных языках; во-вторых, многие журналы и книги размещены в закрытом доступе, а некоторые — не размещены совсем, и сопоставление с ними также невозможно; в-тре-

тых, если заимствованы данные или украдены идеи, но текст переписан, то установить факт плагиата не удастся; в-четвертых, программные средства не умеют отличать грубые нарушения от непредумышленных ошибок. Именно последнее обстоятельство может оказаться губительным для авторов, подавших рукопись на рассмотрение в журнал, в котором принято отклонение по формальному признаку — с опорой исключительно на результаты программного анализа. Второй фильтр для отсеивания работ с заимствованиями — рецензенты. Если приглашенные для оценки качества рукописи эксперты достаточно квалифицированы и следят за появлением новых работ по теме рукописи, они могут легко заметить, что где-то это уже читали. Третий фильтр — это читатели журнала, которые могут сообщить о заимствованиях редактору.

Как избежать плагиата

Хорошая публикация — результат качественной исследовательской работы. Если вы искренне увлечены темой, придерживаетесь международных руководств по планированию и проведению исследования в зависимости от его типа, не боитесь быть разочарованным результатами и имеете смелость сообщить о своих ошибках коллегам, с большой долей вероятности у вас не возникнет необходимости в фальсификации, фабрикации или плагиате данных. Непредумышленные нарушения публикационной этики, безусловно, всегда возможны, но чтобы снизить риск возникновения неприятных ситуаций попробуйте следовать советам, приведенным ниже.

Совет 1. Всегда изучайте этические требования или регламенты журналов, в которые вы подаете рукописи. Там приводятся определения плагиата и самоплагиата, а также указываются последствия для авторов в случае неэтичного поведения.

Совет 2. Избегайте копирования фрагментов других научных работ. Внимательно читайте статьи коллег и своими словами формулируйте идеи или закономерности, которые им удалось открыть. Даже в технических текстах одно и то же можно сказать разными словами. Перефразирование также помогает лучше понять исходный материал.

Совет 3. В черновике рукописи для каждого пересказанного заимствованного фрагмента указывайте в скобках его источник: (Фамилия и соавт., 2016). Впоследствии вы оформите ссылки по требованиям журнала, для которого готовите рукопись [9]. Если вы цитируете другую работу дословно, обязательно используйте кавычки, даже если речь идет всего о нескольких словах.

Совет 4. Приводите ссылки на источники рядом с заимствованными фрагментами, по типу «тезис–ссылка», и избегайте больших, «кустовых», ссылок сразу на 5–10 работ для одного обобщенного тезиса. Во-первых, привычка ссылаться на «всё сразу» может указывать на то, что в действительности вы не анализировали работы, на которые ссылаетесь. Во-вторых, читатель не будет знать, где ему искать информацию, которая его заинтересовала. В-третьих, так вы затрудняете работу редактора, который должен проверить соответствие ссылок озвученному в статье факту, и потеря времени редактором не располагает его к ответственной и терпеливой работе с вашей рукописью.

Совет 5. Тщательно проверяйте выходные данные каждой публикации, на которую ссылаетесь.

Совет 6. Если вы хотите использовать чужой рисунок или другой графический материал, выясните, кто является его правообладателем и какой режим использования установлен им для материала. Если пользоваться данными без разрешения правообладателя нельзя, обязательно свяжитесь с ним и запросите такое разрешение.

Совет 7. Если вы первый автор или автор-корреспондент, проконтролируйте работу ваших соавторов. Сразу уведомите коллег о необходимости придерживаться публикационной этики, а после того, как черновик будет готов, проверьте его на предмет фрагментов текста, резко выбивающихся из контекста по стилю изложения и не содержащих ссылок: обычно это свидетельствует о переводе заимствования [9].

Совет 8. Избегайте копирования фрагментов собственных работ — при необходимости пересказывайте их. Помните, что если вы честны как исследователь, то не мелете воду в ступе и каждое ваше исследование по теме все же нуждается в обновленном контексте — введении. Если есть потребность использовать в работе ранее опубликованные вами данные, то недвусмысленно указывайте на это в тексте рукописи, а при отправке ее в журнал предупреждайте об этом редактора.

Совет 9. Если вы допустили непреднамеренные ошибки в части соблюдения авторских прав и редакция журнала обнаружила их, будьте максимально открыты в общении с редактором, который обязательно должен попросить у вас объяснить произошедшее. Ваша честность — обязательное условие возможности внести в рукопись исправления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плагиат — грубое нарушение публикационной этики, которое ведет к дискредитации науки и ученых. В цифровую эпоху представлять и распространять результаты исследований стало легко, а защищать их от недобросовестных коллег — трудно. Существующие программные алгоритмы для выявления фактов заимствований несовершенны, и по-прежнему важная роль в контроле оригинальности публикаций принадлежит рецензентам и читателям журналов.

Плагиат может быть непредумышленным: например, он свойствен работам молодых авторов, не знающих всех тонкостей цитирования. Это указывает на необходимость внимательного отношения более опытных исследователей к своим ученикам и коллегам и сообщать им не только научные знания, но и высокие этические стандарты. В российских школах и университетах уделяют незаслуженно мало внимания проблеме авторского права, и многие недобросовестные авторы приобретают первый опыт плагиата при подготовке курсовых и дипломных работ.

Во избежание неприятных ситуаций следует отказаться от копирования фрагментов чужих работ в пользу перефразирования даже на этапе подготовки черновика, оформлять цитаты с использованием кавычек, корректно приводить ссылки и не допускать ошибок в их выходных данных, а также помнить, что ответственность за рукопись лежит в равной степени на каждом соавторе и подводить коллег нельзя.

Литература

1. Vaux DL. Scientific misconduct: falsification, fabrication, and misappropriation of credit. В кн.: Bretag T, редактор. Handbook of Academic Integrity. Singapore: Springer; 2016. с. 895–911.
2. International Committee of Medical Journal Editors. Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals. 2014 Dec [дата обращения: 27.12.2016]. Доступно по ссылке: <http://www.icmje.org>.
3. Amos KA. The ethics of scholarly publishing: exploring differences of plagiarism and duplicate publications across nations. J Med Lib Assoc. 2014; 102 (2): 87–91. DOI: 10.3163/1536-5050.102.2.005.
4. Wager E, Williams P. Why and how do journals retract articles? an analysis of Medline retractions 1988–2008. J Med Ethics. 2011 Sep; 37 (9): 567–70. DOI: 10.1136/jme.2010.040964.
5. Retractionwatch.com [Интернет]. [дата обращения: 27.12.2016].
6. Masic I. Plagiarism in scientific publishing. Acta Inform Med. 2012 Dec; 20 (4): 208–13. DOI: 10.5455/aim.2012.20.208-213.
7. Baydik OD, Gasparyan AY. How to Act When Research Misconduct Is Not Detected by Software but Revealed by the Author of the Plagiarized Article? J Korean Med Sci. 2016; 31: 1508–10. DOI: 10.3346/jkms.2016.31.10.1508.
8. Masic I. Plagiarism in Scientific Research and Publications and How to Prevent It. Mater Sociomed. 2014 Apr; 26 (2): 141–6.
9. Shashok K. Authors, editors, and the signs, symptoms and causes of plagiarism. Saudi J Anaesth. 2011 Jul–Sep; 5 (3): 303–7. DOI: 10.4103/1658-354X.84107.
10. Committee on Publication Ethics. Flowcharts [Интернет]. c2016 [дата обновления: 11.2015; дата обращения: 28.12.2016]. Доступно по ссылке: <http://publicationethics.org/resources/flowcharts>.

References

1. Vaux DL. Scientific misconduct: falsification, fabrication, and misappropriation of credit. In: Bretag T, editor. Handbook of Academic Integrity. Singapore: Springer; 2016. p. 895–911.
2. International Committee of Medical Journal Editors. Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals. 2014 Dec [cited 27.12.2016]. Available from: <http://www.icmje.org>.
3. Amos KA. The ethics of scholarly publishing: exploring differences of plagiarism and duplicate publications across nations. J Med Lib Assoc. 2014; 102 (2): 87–91. DOI: 10.3163/1536-5050.102.2.005.
4. Wager E, Williams P. Why and how do journals retract articles? an analysis of Medline retractions 1988–2008. J Med Ethics. 2011 Sep; 37 (9): 567–70. DOI: 10.1136/jme.2010.040964.
5. Retractionwatch.com [Internet]. [cited: 27.12.2016].
6. Masic I. Plagiarism in scientific publishing. Acta Inform Med. 2012 Dec; 20 (4): 208–13. DOI: 10.5455/aim.2012.20.208-213.
7. Baydik OD, Gasparyan AY. How to Act When Research Misconduct Is Not Detected by Software but Revealed by the Author of the Plagiarized Article? J Korean Med Sci. 2016; 31: 1508–10. DOI: 10.3346/jkms.2016.31.10.1508.
8. Masic I. Plagiarism in Scientific Research and Publications and How to Prevent It. Mater Sociomed. 2014 Apr; 26 (2): 141–6.
9. Shashok K. Authors, editors, and the signs, symptoms and causes of plagiarism. Saudi J Anaesth. 2011 Jul–Sep; 5 (3): 303–7. DOI: 10.4103/1658-354X.84107.
10. Committee on Publication Ethics. Flowcharts [Internet]. c2016 [updated 11.2015; cited 28.12.2016]. Available from: <http://publicationethics.org/resources/flowcharts>.