

ВЕСТНИК РГМУ

01 / 2019 ЯНВАРЬ-ФЕВРАЛЬ
VESTNIKRGMU.RU

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА **ОБЗОР**

СТАТЬЯ Цитокины периферической крови 22
Риск развития сердечно-сосудистых осложнений

СТАТЬЯ ПЦР или культуральный метод 44
Исследование микробиоты эякулята

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н., профессор

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н., профессор

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрект, Лилия Егорова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Нина Тюрина

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марина Доронина

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Аверин, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
Н. Н. Алипов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Р. Богомилский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Г. Е. Гендлин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
Л. Р. Горбачева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. Г. Гордеев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Т. В. Зарубина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Е. Каган, профессор (Питтсбург, США)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Б. А. Кобринский, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Козлов, MD PhD (Вена, Австрия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. Ю. Милушкина, д. м. н., доцент (Москва, Россия)
З. Б. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Разумовский, член-корр., профессор (Москва, Россия)
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
А. К. Рылова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <http://vestnikrgmu.ru/login>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включен в Scopus. CiteScoreTracker: 0,15

Журнал включен в WoS с 2018 г.

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 3

Scopus[®]

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

Журнал включен в РИНЦ. IF 2017: 0,326

Журнал включен в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Здесь находится открытый архив журнала

**НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU**



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2019-01

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

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

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



Подписано в печать 15.03.2019

Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL
RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc, professor

EDITORS Valentina Geidebrekht, Liliya Egorova

TECHNICAL EDITOR Nina Tyurina

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)

Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gordeev IG, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Kobrinskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)

Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)

Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Pivovarov YuP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

Razumovskii AYU, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)

Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)

Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Skoblina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Smirnov VM, DSc, professor (Moscow, Russia)

Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)

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

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

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Takhchidi KhP, corr. member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)

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

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

SUBMISSION <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

Indexed in Scopus. CiteScoreTracker: 0.15

Scopus

Indexed in WoS since 2018

WEB OF SCIENCE

Five-year h-index is 3

Google
scholar

Indexed in RSCI. IF 2017: 0.326

**НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU**

Listed in HAC 27.01.2016 (no. 1760)



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2019-01

The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 15.03.2019

Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
Лабораторная диагностика как основа медицины 5П С. Н. Щербо, Д. С. Щербо Laboratory diagnostics as a basis for 5P medicine Shcherbo SN, Shcherbo DS	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	15
Оценка диастолической функции миокарда у пациентов с болевым синдромом в грудной клетке и ангиографически неизменными коронарными артериями методом синхронизированной с ЭКГ однофотонной эмиссионной компьютерной томографии Э. А. Хачирова, Л. Е. Самойленко, О. П. Шевченко Assessment of diastolic function in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries using ECG-gated SPECT Khachirova EA, Samoylenko LE, Shevchenko OP	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	22
Анализ корреляции содержания цитокинов периферической крови с риском развития сердечно-сосудистых осложнений у больных эссенциальной артериальной гипертензией II стадии О. А. Радаева, А. С. Симбирцев Investigating a correlation between the levels of peripheral blood cytokines and the risk for cardiovascular complications in patients with stage II essential hypertension Radaeva OA, Simbirtsev AS	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	29
Использование комбинации рибосомного и фагового дисплея для быстрого отбора высокоаффинных VHH-фрагментов антител альпак Ю. Е. Кравченко, С. В. Иванов, Д. С. Кравченко, Е. И. Фролова, С. П. Чумаков Combination of ribosome and phage display for fast selection of high affinity VHH antibody fragments Kravchenko YE, Ivanov SV, Kravchenko DS, Frolova EI, Chumakov SP	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	36
Выявление мутации Ser450Leu в гене <i>rhoB Mycobacterium tuberculosis</i> методом аллель-специфичной изотермической петлевой амплификации ДНК М. Л. Филипенко, И. П. Оскорбин, Е. А. Храпов, Д. В. Шамовская, А. Г. Чередниченко, Я. Ш. Шварц Detection of ser450leu mutation in <i>rhoB</i> gene of <i>mycobacterium tuberculosis</i> by allele-specific loop-mediated isothermal dna amplification method Filipenko ML, Oskorbin IP, Khrapov EA, Shamovskaya DV, Cherednichenko AG, Shvartz YaSh	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	44
Сравнительное исследование микробиоты эякулята методом количественной ПЦР и культуральным методом Е. С. Ворошилина, Д. Л. Зорников, Е. А. Паначева Evaluation of the ejaculate microbiota by real-time pcr and culture-based technique Voroshilina ES, Zornikov DL, Panacheva EA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	50
Изменение ключевых параметров метаболизма липидов в тканях мозга крыс при перманентной ишемии А. И. Костюк, Д. А. Котова, А. Д. Демидович, А. С. Панова, И. В. Кельмансон, В. В. Белоусов, Д. С. Билан Lipid metabolic changes in rat brain during permanent cerebral ischemia Kostyuk AI, Kotova DA, Demidovich AD, Panova AS, Kelmanson IV, Belousov VV, Bilan DS	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	58
Основные клинические симптомы при ранениях сердца В. В. Масляков, Е. В. Крюков, В. Г. Барсуков, К. Г. Куркин, П. А. Доржиев, В. Р. Горбелик Heart injuries: main clinical symptoms Maslyakov VV, Krjukov EV, Barsukov VG, Kurkin KG, Dorzhiev PA, Gorbelik VR	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	63
Гуморальный ответ на вирус Эпштейна-Барр при аллергии Е. В. Сvirщевская, М. А. Симонова, Е. В. Матушевская, Г. В. Фаттахова, С. В. Хлгатын, Д. Ю. Рязанцев, Д. Б. Чудаков, С. К. Завриев Humoral response to Epstein-Barr viral infection in patients with allergies Svirshchevskaya EV, Simonova MA, Matushevskaya EV, Fattakhova GV, Khlgatian SV, Ryazantsev DYU, Chudakov DB, Zavriev SK	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	71
Связь суточных колебаний содержания цитокинов с изменением ритмов артериального давления при эссенциальной артериальной гипертензии второй стадии О. А. Радаева, А. С. Симбирцев, А. В. Ховряков A correlation between the fluctuations of cytokine concentrations measured in the morning and evening and the circadian blood pressure rhythm in patients with stage II essential hypertension Radaeva OA, Simbirtsev AS, Khovryakov AV	

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

78

Инъекционный коллаген в коррекции возрастных изменений кожи: экспериментально-клинические параллели

Н. Е. Мантурова, А. Г. Стенько, Я. А. Петинати, Е. А. Чайковская, А. А. Болгарина

Injectable collagen in correction of age-related skin changes: experimental and clinical parallels

Manturova NE, Stenko AG, Petinati YaA, Chaikovskaya EA, Bolgarina AA

МНЕНИЕ

86

Использование гликопротеина GP для создания универсальной вакцины против лихорадки Эбола

И. В. Должилова, А. И. Тухватулин, А. С. Громова, Д. М. Гроусова, Н. М. Тухватулина, Е. А. Токарская, Д. Ю. Логунов, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

Glycoprotein GP as a basis for the universal vaccine against Ebola virus disease

Dolzhikova IV, Tukhvatulin AI, Gromova AS, Grousova DM, Tukhvatulina NM, Tokarskaya EA, Logunov DY, Naroditskiy BS, Gintsburg AL

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

94

Генетически кодируемый биосенсор roKate для регистрации редокс-состояния пула глутатиона

А. Г. Шохина, В. В. Белоусов, Д. С. Билан

A genetically encoded biosensor roKate for monitoring the redox state of the glutathione pool

Shokhina AG, Belousov VV, Bilan DS

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

102

Артериит Такаюсу: результаты ретроспективного анализа пациентов уральской популяции

И. Э. Бородина, А. А. Попов, Г. Г. Салаватова, Л. А. Шардина

Takayasu's arteritis: the retrospective analysis of patients from the Ural population

Borodina IE, Popov AA, Salavatova GG, Shardina LA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

112

Частота нарушений углеводного обмена у пациентов дневного стационара с пограничными значениями гликемии натощак**и хотя бы одним фактором риска развития сахарного диабета**

В. В. Боева, Т. А. Боева, А. Н. Завьялов

Frequency of carbohydrate metabolism disorders in day-care patients with borderline fasting blood sugar levels**and at least one risk factor for diabetes mellitus**

Boeva VV, Boeva TA, Zavyalov AN

ИСПРАВЛЕНИЕ

119

Исправление к статье

Надлежащая организация системы биобезопасности как средство снижения уязвимости общества,**экономики и государства перед биогенными угрозами**

В. А. Гушин, В. А. Мануйлов, В. В. Макаров, А. П. Ткачук

Опубликована в журнале Вестник РГМУ (июль–август 2018, с. 5–21).

Erratum to

The proper structure of a biosafety system as a way of reducing the vulnerability of a society, economy or state in the face of a biogenic threat

Gushchin VA, Manuilov VA, Makarov VV, Tkachuk AP

Published in Bulletin of RSMU (july–august 2018, 5–21).

ИСПРАВЛЕНИЕ

120

Исправление к статье

Высокопроизводительный аэрозольный пробоотборник с рециркуляцией жидкой фазы и предварительным концентрированием

А. Э. Акмалов, Г. Е. Котковский, С. В. Столяров, Б. И. Вердиев, Р. С. Овчинников, А. А. Почтовый, А. П. Ткачук, А. А. Чистяков

Опубликована в журнале Вестник РГМУ (июль–август 2018, с. 29–36).

Erratum to

High-performance aerosol sampler with liquid phase recirculation and pre-concentration of particles

Akmalov AE, Kotkovskii GE, Stolyarov SV, Verdiev BI, Ovchinnikov RS, Pochtovyy AA, Tkachuk AP, Chistyakov AA

Published in Bulletin of RSMU (july–august 2018, 29–36).

ИСПРАВЛЕНИЕ

121

Исправление к статье

Опыт использования аналитического стенда для проведения аэрозольных испытаний в контролируемых условиях

Д. А. Клейменов, Б. И. Вердиев, А. А. Ененко, В. А. Гушин, А. П. Ткачук

Опубликована в журнале Вестник РГМУ (июль–август 2018, с. 37–44).

Erratum to

Performance of the original workstation for aerosol tests under controlled conditions

Kleymenov DA, Verdiev BI, Enenko AA, Gushchin VA, Tkachuk AP

Published in Bulletin of RSMU (july–august 2018, 37–44).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КАК ОСНОВА МЕДИЦИНЫ 5П

С. Н. Щербо , Д. С. Щербо

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

В рамках модернизации системы здравоохранения в настоящее время происходят изменение старых и становление новых направлений современной медицины: персонализированной, предиктивной, превентивной, партисипативной, прецизионной, мобильной и цифровой. Вместе с тем, в научной литературе и медицинском сообществе имеются различные мнения о целях, области применения и задачах указанных направлений здравоохранения и роли в них лабораторной диагностики. Прежде всего это относится к прецизионной медицине, которая воспринимается только как более современное название персонализированной медицины. В обзоре проанализирована и обобщена имеющаяся на сегодняшний день информация и представлены примеры применения подходов медицины 5П в клинической практике.

Ключевые слова: медицина 5П, клиническая лабораторная диагностика, прецизионная медицина, онкология, сахарный диабет

 **Для корреспонденции:** Сергей Николаевич Щербо
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; shcherbos@mail.ru

Статья получена: 30.01.2019 **Статья принята к печати:** 13.02.2019 **Опубликована онлайн:** 14.02.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.095

LABORATORY DIAGNOSTICS AS A BASIS FOR 5P MEDICINE

Shcherbo SN , Shcherbo DS

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

As public health systems are being modernized across the world, conventional medicine is undergoing a serious transformation and new medical models are emerging based on personalized, predictive, preventive, participatory, precision, mobile, and digital approaches. So far, there is no consensus in the literature and the medical community about the goals, objectives and applications of these models, particularly precision medicine, which is sometimes perceived as merely a fancier term for personalized medicine. The role of laboratory diagnostics in precision medicine is also a matter of intense debate. This review analyzes the currently available information about precision medicine and gives examples of how 5P approaches can be used in clinical practice.

Keywords: medicine 5P, clinical laboratory diagnostics, precision medicine, cancer, diabetes mellitus

 **Correspondence should be addressed:** Sergey N. Shcherbo
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; shcherbos@mail.ru

Received: 30.01.2019 **Accepted:** 13.02.2019 **Published online:** 14.02.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2018.095

На пороге начала нового научно-технологического уклада, вступающего в фазу зрелости в 2040-е годы и базирующегося на мощных технологиях, ускоренно происходит эволюция природы и человека, а каждый новый период занимает более короткий промежуток времени, поэтому необходимо понять тенденции и перспективы развития различных видов человеческой деятельности, в частности здравоохранения, и оценить, как будут взаимодействовать существующая и вновь создаваемая «медицина будущего». На основании анализа развития медицины и биологии в последние десятилетия в 2015 г. нами была выдвинута концепция медицины 5П (5ПМ) [1, 2]. Она возникла после появления проекта прецизионной медицины (ПМ), охватывающего различные аспекты здравоохранения нового научно-технологического уклада, достижения геномной и коммуникативной революций, клеточной медицины, омиксных представлений (создание диагностических панелей биомаркеров на разных уровнях биологической организации), а также организационные и социальные сдвиги, происходящие в обществе (философские, этические, экономические). В частности, на смену эры патерналистской медицины приходит медицина взаимодействия пациента и врача (партисипативная медицина). Введение термина «медицина 5П» логично вытекает из развития медико-биологической науки, уроков кризисов и неоправданных надежд, связанных с проведением полногеномного скрининга ассоциаций (GWAS) (проблема исчезающей наследственности). В настоящее время можно наблюдать некоторую путаницу в определениях, тенденциях развития, а главное взаимоотношениях составляющих 5ПМ. С точки зрения организационных и образовательных аспектов необходимо ответить на вопрос: медицина будущего —

это медицина 4П (предиктивная, превентивная, партисипативная, персонализированная) или медицина 5П, объединяющая 4П и прецизионную медицину? Недопонимание сущности и задач прецизионной («точной») медицины приводит к восприятию ее всего лишь как термина, заменяющего персонализированную медицину (ПМ) [3]. По нашему мнению, все составляющие 5ПМ, являясь самостоятельными, взаимно проникают и дополняют друг друга, что, например, объясняет термин «предиктивно-превентивная медицина». Введение понятия 5ПМ дает возможность более четко определить цели и задачи медицины пяти указанных направлений, что важно в частности при обучении и специализации врачей. Ранее нами было показано, что развитие лабораторной медицины тесно связано с новыми направлениями здравоохранения и в зависимости от поставленных задач она может оперировать различными типами и наборами (панелями) биомаркеров на разных уровнях биологической организации [4–6].

Предиктивная (предупредительная) медицина

Медицина ранней диагностики, прогноза и расчета вероятности возникновения заболеваний — одно из наиболее перспективных направлений современной молекулярной медицины (опирающееся на методы лабораторной диагностики), дающее возможность прогнозировать (предвидеть) заболевания у человека на основе исследования индивидуальных особенностей и омиксных данных Лауреат Нобелевской премии Ж. Доссе (1980), предложивший термин «предиктивная», отмечал, что главная цель медицины — предотвратить заболевания. На такую мысль ученого натолкнуло обнаружение ассоциаций

определенных вариантов (аллелей) генетического локуса HLA с некоторыми мультифакторными заболеваниями (сахарный диабет (СД), бронхиальная астма и др.). Предиктивная медицина фиксирует изменения в состоянии здоровья пациента до того, как появляются клинические проявления: доказано наличие генов предрасположенности не только к соматическим, но и к инфекционным заболеваниям (туберкулезу, вирусным гепатитам, ВИЧ и др.), и является медициной диагностической, т. е. основанной на лабораторной и функциональной диагностике, анализе изображений, биоинформационных технологиях. К указанному направлению относится та часть генетического тестирования, которая связана с определением предрасположенности к соматическим и инфекционным заболеваниям (часто пользуются понятием «превентивное тестирование»). Важно выявить «ключевые точки» патогенеза, что реализовано в эксперименте, позволившем Майку Снайдеру определить начало развития диабета после регистрации неожиданного скачка в уровнях некоторых, ранее никак не связанных с диабетом биомаркеров при постоянном их измерении [7]. В рамках весьма дорогостоящего эксперимента, проведенного с помощью омиксных технологий, Снайдер получил точное описание своего «интегративного многокомпонентного персонального профиля» (integrative personal omics profile, iPOP), включающего информацию о последовательности генома и результаты многократного (20 раз) количественного измерения стандартных биохимических параметров, уровней мРНК, а также белков и многих других биологических молекул на протяжении 14 месяцев, что привело к созданию 3 млрд записей. Полномасштабное iPOP-профилирование пока недоступно подавляющему большинству пациентов, но предоставляет важную информацию даже в тех случаях, когда многократно измеряют не сотни тысяч, а всего лишь десятки наиболее информативных биомаркеров. Нереалистично предполагать, что здоровые люди будут регулярно наблюдаться в стационаре и каждый час ходить в лабораторию для сдачи крови. Поэтому развитие 5ПМ предусматривает усовершенствование методов исследования биологических образцов, а также снижение их стоимости, например путем перехода от дорогих и протеомных исследований к анализу профилей метаболитов (первые требуют 30–200 мин на измерение, тогда как вторые можно определить за 30 с). Оценка максимальной способности полногеномного секвенирования предсказать риск для 24 относительно распространенных заболеваний показала, что большинство пациентов могут быть предупреждены о предрасположенности по крайней мере к одной болезни [8]. Современная медицина движется в сторону ранней диагностики (высококчувствительной и специфичной), так как чем раньше диагностирована болезнь, тем легче и дешевле с ней справиться, и именно для этого предназначены осмотры и обследования чек-ап (check up).

Превентивная медицина

Превентивной (от франц. *préventif* — «упрежденный») называют медицину корректирующих действий, направленных либо на отсрочку дебюта заболевания и протекание его в менее агрессивной форме, либо на его исключение путем коррекции первых проявлений нездоровья (значительное увеличение веса, уменьшение физической активности и др.). Национальные институты здоровья в США включили превентивную медицину в

число пяти приоритетных областей развития медицины для персонализированного управления состоянием здоровья, с целью продления полноценной здоровой жизни человека до естественных биологических пределов.

Партисипативная (пациент-ориентированная) медицина

В основе этого направления лежит взаимодействие пациента и врача. Партисипативная медицина тесно связана с предиктивно-превентивной и опирается на ряд наук (философию, деонтологию, психологию). Издавна проблему отношения врача к больному рассматривали в плане их сотрудничества и взаимопонимания. Так, врач и писатель Абу-ль-Фарадж (XIII в.) сформулировал следующее обращение к заболевшему: «Нас трое — ты, болезнь и я; если ты будешь с болезнью, вас будет двое, я останусь один — вы меня одолеете; если ты будешь со мной, нас будет двое, болезнь останется одна — мы ее одолеем». Только в XVI и XVII вв. появляются медики (Джон Грегори, Томас Персиваль), признающие, что у пациента может и должно быть право голоса при лечении. Первое упоминание об информированном согласии появилось только в 1957 г., хотя в современной медицине и сегодня вынужденно используют неполную форму информированного согласия (в случаях, когда его невозможно получить у пациентов, находящихся без сознания). Врач должен уважать пациента и общаться с ним на равных, причем пациент вправе задавать прямые вопросы и делать свой выбор. Источником патернализма во многом являются инструкции и стандарты лечения, которые формируются профессиональными организациями и часто сопровождаются оговоркой, что это не догма и необходимо учитывать особенности каждого пациента. В недавнем прошлом пациент не мог ни увидеть, ни повлиять на записи, сделанные при коротком (менее 10 мин) визите к врачу; взаимодействие врача и пациента описывалось словом «молчаливое» [9]. В соответствии с принципами партисипативной медицины сам человек лучше кого-либо знает свой организм, условия жизни и больше всех заинтересован в сохранении собственного здоровья, поэтому может принимать участие в генерировании полного набора медицинской информации, включая данные в истории болезни, анализы, снимки, показания датчиков, результаты омиксных исследований. Всеобъемлющая мединформация станет со временем доступной и передаваемой, а пациенты будут иметь доступ к онлайн-хранению данных (облачному хранилищу), суперкомпьютеру и телемедицине, сведениям о результатах своего лечения в медицинских учреждениях любой страны. Современная информационная среда позволяет пациенту самостоятельно получать сведения о своем заболевании: на форумах, в дискуссиях, в сетях профессионального и тематического общения, с помощью мобильных приложений, в том числе электронных дневников самонаблюдения, устройств для оценки показателей жизнедеятельности, а также напоминаний о приеме лекарственных препаратов. Таким образом, будет проходить кумулятивный обмен информацией, направленный как от врача к пациенту, так и от пациента к врачу.

Персонализированная медицина

Термин «персонализированная медицина» (ПМ) впервые был использован в 1998 г. [10], однако часть литературы, относящаяся к ПМ, зачастую еще определяет ее как

фармакогеномику (ориентированная терапия; геномная медицина или терапия, основанная на генотипе; «медицина под заказчика»; информационно обоснованная медицина; комплексное здравоохранение; рациональный подбор препарата и др. [2]). Коалиция ПМ (Вашингтон, США) определяет ПМ как «...менеджмент заболеваний человека или предрасположенности к ним, с использованием молекулярного анализа для достижения оптимального медицинского результата для индивидуума, что приведет к улучшению уровня жизни и здравоохранения, и в перспективе будет способствовать снижению стоимости медицинской помощи» [11]. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) рассматривает ПМ как услуги по оказанию медицинской помощи с учетом индивидуальных генетических, анатомо-физиологических особенностей пациента [12], что означает «предоставление правильному пациенту правильного препарата в правильной дозе в нужное время». ПМ представляет собой также новую систему организации здравоохранения, модель оказания медицинской помощи, основанную на выборе диагностических, профилактических и лечебных средств, которые были бы оптимальными, экономически и этически обоснованными для конкретного пациента. Задачи ПМ: понять молекулярный механизм заболевания, найти наиболее важные биомаркеры, указать пути создания персонализированных лекарственных средств (ЛС), которые эффективно действуют на целевые (таргетные) мишени, связанные с патологией [13]. Более глубокое понимание различных подпопуляций патогенетических механизмов возникновения и особенностей развития заболеваний и разделение их на типы и подтипы (особенно успешно это направление развивается в онкологии), нахождение наиболее эффективных мишеней воздействия ЛС и стратификация пациентов являются важнейшими задачами ПМ. Важно учитывать, что ПМ — это направление здравоохранения, связанное с учетом клинически проявившихся симптомов и начавшихся заболеваний [6]. Согласно определению Международного комитета по биоэтике ЮНЕСКО «Персонализированная медицина — это оказание медицинской помощи, учитывающей особенности каждого пациента, которое осуществляется через фармакогеномику и лечение, основанное на ДНК». Большинство экспертов согласились с тем, что ПМ должна быть основана на улучшении стратификации и лечения пациентов с точки зрения эффективности и переносимости. В одной из работ было проанализировано 683 медицинские статьи из базы данных PubMed, содержащие определения термина «персонализированная медицина». Всего на момент публикации исследования термин упоминался в 2457 работах, 60,4% статей, опубликованных до 2009 г. и посвященных персонализации (индивидуализации) лечения, включали в себя определение термина. Итоговое определение по результатам анализа сводится к тому, что ПМ ищет пути улучшения стратификации пациентов и оптимизации времени и сроков их лечения благодаря использованию биологической информации на уровне молекулярных путей возникновения и развития заболевания (в частности, биомаркеров) [14].

Важен вопрос о соотношении стандартизации и персонализации. В условиях техногенного общества принцип стандартизации стал одним из важнейших, цементирующих всю систему индустриализации, а не подпадающие под стандартные установки различия

устранялись. Указанные принципы были перенесены и на здравоохранение, в котором стандартизировались ЛС, технологии терапевтического и хирургического вмешательства и т. д. В настоящее время устанавливаются новые принципы постиндустриального развития общества, которые противоречат идее всеобщей обязательной стандартизации, например, происходит демассифицированность средств массовой информации, и часть из них ориентируется на своего потребителя, что связано в частности с интернетом и др. Таким образом, вместо принципа стандартизации утверждается принцип дифференциации, вместо концентрации — рассредоточение, вместо максимизации — принцип адекватных масштабов и др.

Первое массовое применение подходов ПМ было связано с открытием групп крови [15]. В настоящее время разработаны системы поддержки принятия решений о назначении ЛС, которые предупреждают врачей о возможных нежелательных реакциях на ЛС у пациентов с определенными особенностями генотипа, указывая на необходимость или, по крайней мере, желательность проведения фармакогеномного теста, а после получения результатов способствуют их адекватной клинической интерпретации. В мире уже проводятся масштабные проекты и по «упреждающей» фармакогеномике. Так, в Чикагском университете показано, что внедрение таких тестов вовремя напоминает врачу о необходимости учитывать генные варианты при применении ЛС, тем самым повышая эффективность и безопасность лечения [16].

Прецизионная медицина

Появление прецизионной медицины (ПрМ) связано с развитием медико-биологических и информационных технологий и преодолением последствий кризиса в научном сообществе 2010 г. [2], который произошел из-за провала надежд на возможности, связанные с расшифровкой генома человека и исследованиями полногеномного скрининга ассоциаций (GWAS). С 2012 г. появились призывы отказаться от термина ПМ, которое не отражало сути процессов, происходящих в медицине. В книге К. Кристенсена и Дж. Гроссмана «Инновационное предсказание» (2009) впервые появляется сам термин «прецизионная медицина», затем он употребляется в докладе «На пути к точной медицине» Института медицины национальной академии наук США (2011), а в 2015 г. предлагается план «Национальной программы по точной медицине» [17]. Главная составляющая программы — это сбор различных данных и создание информационной базы для когорты из миллиона американцев [18]. Такие исследования ресурсозатратны [19], но помогают создать правильные алгоритмы лечения. У ПрМ и ПМ много общего. Как отмечал Национальный исследовательский совет (США), «персонализированная медицина» — давно используемый термин со значением, аналогичным термину «прецизионная медицина», и предпочтительным является ПрМ. Среди краткосрочных целей ПрМ — применение в онкологии, а среди долгосрочных — во всех областях здравоохранения. Биологические образцы, генетические данные, информацию об образе жизни, окружающей среде и о состоянии здоровья, полученные от участников когорты (добровольцев), можно будет использовать для изучения широкого спектра заболеваний [15, 20].

Рассмотрим потенциальные преимущества инициативы ПрМ (в скобках отмечены задачи, входящие в перечень

задач 5ПМ): будут применены новые подходы к защите участников исследования, в частности, соблюдению неприкосновенности частной жизни пациентов и конфиденциальности их данных (юридическая задача партисипативной медицины); продолжится разработка новых инструментов для построения, анализа и совместного использования больших наборов медицинских данных; улучшится контроль за проведением испытаний ЛС и других технологий; появятся новые возможности совместной работы ученых широкого круга специальностей, а также представителей сообществ пациентов, университетов, фармацевтических компаний и др. (партисипативная медицина); у миллионов людей появится возможность внести свой вклад в развитие научных исследований (партисипативная медицина). Планируемые долгосрочные цели проекта развития ПрМ: расширение возможности врачей в использовании генетической и другой информации на уровне молекулярной биологии о пациентах в рамках обычной медицинской помощи; улучшение предсказательной способности эффективности лечения для конкретных пациентов (предиктивная медицина); более глубокое понимание основных механизмов развития заболевания (медико-биологическая задача); совершенствование подходов к профилактике, диагностике и лечению широкого спектра заболеваний (превентивная и предиктивная медицина); более глубокая интеграция электронной формы записей при оказании медицинской помощи, что позволит облегчить доступ врачам к медицинским данным пациента.

Нами проведен сравнительный анализ задач ПМ и ПрМ: общими можно назвать применение омиксных технологий, таргетных ЛС и учет влияния факторов окружающей среды. К новым для ПрМ задачам относятся применение в здравоохранении электронных форм учета записей (медицинские карты, анкеты), цифровых (искусственный интеллект, базы данных), а также мобильных приложений (мониторинг состояния здоровья 24 ч 7 дней в неделю, развитие телемедицинских технологий). Развитие ПрМ приводит к лучшему типированию и классификации заболеваний, идентификации популяций, а следовательно, к улучшению клинических результатов. При обсуждении определения и задач ПМ и ПрМ нередко используют понятие «персономика» [21]. Геномика, протеомика, метаболомика, эпигеномика, фармакогеномика и другие «омики» служат инструментами как ПМ, так и ПрМ [2], а персономика может быть добавлена в арсенал ПрМ и использована для описания подходов 5ПМ. Согласно принципам персономики, люди отличаются не только своей биологической изменчивостью, но и личностными характеристиками, отношением к здравоохранению, к активности в социальных сетях, финансовыми ресурсами, а также другими уникальными характеристиками, которые имеют существенное влияние на то, как и когда определенное состояние здоровья будет проявляться и в реакции на лечение [21]. Медицину 5П можно считать важным этапом, необходимым для развития ПМ и ПрМ с персономикой как недостающим звеном. Переход от ПМ к ПрМ — это эволюция от «медицинской помощи» к «заботе о здоровье»: «что нужно знать о вас, как человеке, чтобы назначить лучшее из возможных лечение?» [22].

Развитие 5ПМ направлено на создание диагностических и лечебных моделей, в которых центральное внимание уделяется изменчивости проявлений болезни в зависимости от индивидуальных особенностей пациента [23]. В качестве инструмента 5ПМ может выступать

тераностика («терапия» и «диагностика»), которая служит диагностической методикой для индивидуально разработанного терапевтического вмешательства, изменяющей практику здравоохранения в пользу конкретного пациента, для которого стандартная терапия не подходит, за счет оптимизации плана лечения [24]. Быстрое развитие ПрМ требует появления лидеров с фундаментальными знаниями в геномной медицине, в том числе молекулярно-диагностических методов, таких как секвенирование следующего поколения и интерпретация всего генома/экзома, которые интегрируют подходы ПрМ в здравоохранение [24]. Внедрение электронной формы записи данных и геномные исследования должны ускорить работы по продвижению 5ПМ: сеть eMERGE, запущенная в 2007 г., является консорциумом, посвященным геномным открытиям и исследованиям за счет использования биобанкинга, связанного с электронной формой медицинских записей [25]. Для развития 5ПМ требуется создание инфраструктуры информационных технологий, позволяющей хранить, технически обслуживать и передавать большие объемы геномных данных с целью управления ими при лечении отдельных пациентов и использования в других исследованиях [26].

Применение ПрМ и 5ПМ в диагностике и лечении заболеваний

На сегодняшний день применение ПрМ в здравоохранении относительно ограничено: она широко используется в основном пока только в онкологии (лечение меланомы с метастазами, злокачественных опухолей молочной железы, мозга и легкого, лейкемии). Самый большой ПрМ-проект был начат в 2013 г. в Германии — это Национальная коорта, или GNC, — общенациональное долгосрочное исследование продолжительностью 25–30 лет. Обнаружено, что в онкологии выбор лечения на основе использования опухолевых молекулярных панелей или личного геномного профилирования дает ограниченные клинические преимущества для пациентов с точки зрения прогноза или качества жизни. Так, в рандомизированном контролируемом исследовании SHIVA [27] отбирали пробы из нескольких солидных опухолей и сравнивали эффективность целевых ЛС, выбранных на основе молекулярного профилирования опухоли (с использованием алгоритмического подхода) и назначенных врачом. Результаты SHIVA показали, что медиана выживаемости без прогрессирования, первичная конечная точка, была почти одинаково малой в обоих случаях (2,3 и 2,0 месяца соответственно). Тем не менее применением и развитием ПрМ, особенно в онкологии, не следует пренебрегать только из-за некоторых негативных результатов, которые могут быть обусловлены разнородностью и постоянной биологической эволюцией опухоли [28]. Опухолевые клетки, обнаруженные в периферической циркулирующей крови для различных типов рака, являются особенно перспективным инструментом для раннего обнаружения, выбора целевого агента, анализа лекарственной устойчивости, а также мониторинга рецидива опухоли прямой кишки, рака легких и др. (жидкостная биопсия). Обнаружение опухолевых клеток, а также экзосом и свободно циркулирующих ДНК клеток опухоли лежит в основе минимально инвазивных методов диагностики и оценки состояния пациента [2, 29].

Сложной дилеммой для врачей остаются профилактика, скрининг, диагностика и лечение рака предстательной железы (РПЖ), наиболее распространенного онкологического

заболевания у мужчин [30]. РПЖ представляет собой гетерогенную группу заболеваний с уникальными генетическими и протеомными профилями, а молекулярные методы фенотипирования позволили идентифицировать по меньшей мере семь молекулярных подтипов РПЖ, которые различаются по риску метастазирования [31]. По некоторым оценкам, наследуемость РПЖ составляет 42% (95%-й доверительный интервал), а GWAS выявили более 70 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), которые могут предсказать риск РПЖ [32]. Генетические данные, например генотип BRCA, позволяют определиться с выбором целенаправленного скрининга, приостановить избыточное лечение мужчин с низким риском заболевания и идентифицировать людей, хорошо реагирующих на ЛС, например ингибиторы 5-альфа-редуктазы, нестероидные противовоспалительные средства, селективные модуляторы рецептора эстрогена и статины [33]. Подходы ПpM могут быть применены для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы [34], которую, как и РПЖ, можно определить как гетерогенную группу заболеваний с уникальными молекулярными профилями, с изменяющимися темпами роста и степенью агрессивности [35]. Кроме того, исследования GWAS показали ассоциации риска и тяжести заболевания между конкретными ОНП и доброкачественной гиперплазией предстательной железы, которые могли бы быть использованы для стратификации пациентов в группах риска и терапии с учетом фармакогеномики [36]. Прогресс в понимании регулирования работы простатической гладкой мускулатуры с помощью α_1 -адренорецепторов и андрогенсигнальных путей также увеличивает возможности для лечения (примерно у 30% мужчин ингибирование метилирования гена 5AR2 связано с устойчивостью к медикаментозной терапии финастеридом).

Прецизионный сахарный диабет (СД) — это заболевание, при котором нарушается соотношение между потребностями организма в инсулине, количеством фактической выработки и резистентностью при сохраненной секреции, обусловленной многими факторами, в том числе лишним весом или ожирением; лечение СД несомненно со временем будет прецизионным. Существующая классификация СД 1-го и 2-го типов основана на выявлении антител против β -клеточных антигенов поджелудочной железы, при этом больше 80% случаев определяют как СД2, который уже в настоящее время разделяют на различные типы и подтипы: к 2018 г. выявили такие формы, как латентный аутоиммунный диабет у лиц старше 18 лет (LADA), СД у пациентов младше 18 лет (MODY) и др. В 2017 г. шведские ученые показали, что ежегодно случаи диабета типа 3c (вторичного СД, характеризующегося нарушением экзокринной секреции поджелудочной железы) диагностируют как СД2. По последним результатам изучения антител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GADA) и оценке генетических полиморфизмов, СД очень гетерогенен, а ранняя диагностика и терапия важны для минимизации последствий, предупреждения хронических осложнений и снижения числа летальных исходов. Благодаря применению омиксных технологий открыто большое количество перспективных биомаркеров СД: подтверждена роль микроРНК в секреции инсулина, развитии и дифференциации β -клеток поджелудочной железы, возникновении ожирения, контроле метаболизма глюкозы и липидов и формировании вторичных осложнений, связанных с СД. К микроРНК, влияющим на продукцию

и секрецию инсулина в β -клетках поджелудочной железы, относят микроРНК-375, -9, -96 и -124a. МикроРНК-375 в β -клетках поджелудочной железы регулирует секрецию инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой, причем ее чрезмерная экспрессия подавляет секрецию инсулина [2, 37].

Ученые из Лундского университета (Швеция) предложили новую классификацию СД у взрослых пациентов, в которой избегают обычного обозначения СД1 и СД2 в пользу пяти подгрупп, отличающихся уникальными прогрессированием заболевания и рисками возникновения соответствующих осложнений. Подгруппы были выделены на основании анализа данных (всего более 14 000 пациентов) из пяти источников: Шведской программы ANDIS с учетом больше 8000 пациентов за 8 лет (до 2016 г. включительно), реестра Scania, ANDIU, Baaca (DIREVA) и информации из Malmö Diet and Cancer Cardiovascular Arm. Учитывали лабораторные анализы, GADA, возраст при первичном выявлении заболевания и манифестации, индекс массы тела (ИМТ), уровни гликированного гемоглобина HbA_{1c}, индекс HOMA, резистентность к инсулину с учетом С-пептида. Уточненная классификация может стать мощным инструментом для индивидуализации схем лечения и выявления лиц с повышенным риском осложнений при постановке диагноза. Оказалось, что больных можно разделить на пять групп [38]: тяжелый аутоиммунный диабет (6–15%), для которого характерно раннее начало заболевания, что соответствует СД1 и LADA; тяжелый инсулинодефицитный диабет (9–20%) с повышенным гликированным гемоглобином HbA_{1c}, быстрым развитием ретинопатии, но отрицательным GADA; тяжелый инсулинорезистентный диабет (11–17%) у пациентов с лишним весом (ИМТ больше 25), наибольшей частотой нефропатии и ретинопатии; умеренный диабет, связанный с ожирением (18–27%), для которого характерны ИМТ свыше 30–34 и молодой возраст; умеренный возрастной диабет (33–47%) с умеренными метаболическими изменениями. Это заболевание развивается гораздо позже остальных форм диабета, а сама болезнь протекает легче. Причем пациенты, страдающие одной из трех тяжелых форм заболевания, должны получать более агрессивную терапию. Пациентам, отнесенным ко 2-й группе, ставят диагноз СД2, поскольку у них нет аутоиммунного процесса, однако предполагается, что их заболевание вызывает дефект в самих островковых клетках, а вовсе не ожирение. Терапия в этом случае должна быть приближена к тем схемам, которые назначают при СД1, причем пациенты с большей вероятностью слепнут, в то время как у больных из третьей группы чаще развивается болезнь почек, что необходимо учитывать при назначении соответствующих скрининговых обследований. Возможно, в мире существуют сотни подтипов заболевания СД, различающихся в зависимости от наследственных, этнических факторов и особенностей воздействия окружающей среды, так как риск развития СД у представителей разных национальностей неодинаков: у выходцев из Южной Азии он выше, диабет находят у каждого шестого индейца или аляскинского эскимоса в США.

СД1 не относится к наследственным моногенным заболеваниям, однако риск его развития значительно возрастает у детей, рожденных в семьях, в которых больны один или несколько близких родственников и выявлена совокупность генов высокого риска (предрасполагающих HLA-гаплогенов, HLA-DR3 и HLA-DR4) [39]. СД2 характеризуется нарушением углеводного

обмена, вызванным преимущественно инсулиновой резистентностью и недостаточностью, причем прослеживается четкая генетическая детерминированность наследования (риск развития СД2 составляет до 40%, если болен один из родителей, до 70%, если больны оба [40]). СД2 оказался в фокусе внимания 5ПМ из-за очевидной вариативности течения заболевания, ответа на лечение и формирования осложнений. Предполагается, что СД2 является следствием полигенных нарушений (около 20 генов): дефектов генов, ответственных за кодирование структуры молекулы инсулина, характера инсулиновых рецепторов, глюкокиназы, гликогенсинтазы, компонентов митохондрий. Гены кодируют основные патогенетические звенья развития СД2: инсулинорезистентность (*PPARG*, *THADA*, *ADAMTS9* и др.), дисфункцию β -клеток (*KCNJ11*, *HNF1B*, *HNF4A*, *JAZF1* и др.), склонность к ожирению (*FTO*), дефект секреции гормонов инкретинового ряда (*TCF7L2*). Именно гетерогенностью инсулинорезистентности объясняется частая неэффективность лечения больных СД2 традиционными препаратами (метформин, тиазолидиндионами). В настоящее время в арсенале диабетологов имеется восемь классов сахароснижающих препаратов, воздействующих на разные патогенетические звенья развития СД2, и пять новых классов находятся на этапе доклинической разработки. Пока нет возможности точно разделять подгруппы на основе молекулярной этиологии, возможно их определение на основе дифференциальной реакции на лечение ЛС. Первоначальный анализ для идентификации подгрупп следует проводить с использованием простых клинических данных (например, половой принадлежности, ИМТ и времени постановки диагноза) или легко доступных биомаркеров. Примером успешной реализации этого подхода служит использование данных о половой принадлежности и ИМТ для идентификации пациентов с преимущественным ответом на тиазолидиндионы (ожирение женщин) или препараты сульфонилмочевины [41].

Признание MODY происходило медленно. Технология генетической диагностики будет вскоре доступна в большинстве стран (в Великобритании в 2016 г. было проведено 5000 исследований) и сформулированы четкие рекомендации по лечению [42]. Диагностирование MODY не требует сложной многомерной оценки вероятности и осуществляется с помощью статистического калькулятора, использующего легко доступную клиническую информацию. «Калькулятор вероятности MODY» доступен бесплатно по адресу www.diabetesgenes.org и приложении «Диабет» для мобильных платформ IOS и Android [43] и работает лучше для пациентов, которые не получали инсулин. Разработка калькулятора вероятностной MODY оказалась первым очень перспективным шагом на пути прецизионной диабетологии и широко используется (> 6000 загрузок). Это хороший пример того, как моделирование сложной диагностической задачи можно сделать простым инструментом, который использует легко доступную клиническую информацию. Секвенирование следующего поколения упростило выполнение генетического тестирования, но не устранило необходимость клинического отбора пациентов с возможным моногенным диабетом для генетического теста. Можно быстро и эффективно протестировать все гены, участвующие в развитии моногенного диабета в одном тесте с помощью генетической панели [44], и определить приблизительно 25% дополнительно моногенных пациентов с менее распространенными причинами.

Неврологические заболевания подходят в качестве модели для ПрМ из-за быстро растущей базы генетических знаний, фенотипической классификации, разработки биомаркеров и потенциальных методов лечения [45], в частности в лечении болезни Паркинсона [46]. Прецизионная психиатрия (термин впервые введен Виете и др. [47]) — это одна из наиболее развитых областей ПрМ [48]. В настоящее время в области психиатрии ощущается недостаток знаний о патофизиологии этих расстройств: симптомы значительно перекрываются между различными диагнозами и в значительной степени различны среди пациентов с определенным диагнозом [49]. Иницирован исследовательский подход к генерации нейробиологической классификации психических заболеваний [50]. Наличие большого объема информации, получение масштабных биологических данных и включение данных из электронных устройств, таких как смартфоны, беспрецедентны и в настоящее время способствуют проведению анализа и расчету различных характеристик пациента [51]. Учитывая, что ни один из биомаркеров, вероятно, не в состоянии определить психическое расстройство [52], необходимы параллельные теоретические и практические подходы получения данных, чтобы охватить многомерные и комбинаторные профили биомаркеров, учитывающие разнородности психических заболеваний в их клиническом проявлении. Кроме того, необходимо исследовать *panomics* и использовать вычисления системной биологии, которые могли бы раскрыть основные биологические пути, участвующие в развитии психиатрических расстройств. Нейробиологическая информация может быть объединена в многочисленные поведенческие данные, доступные в том числе благодаря мобильным технологиям [53]. Более вероятно, что в течение следующих лет парадигма точной психиатрии приведет к открытию биомаркеров, позволяющих выбирать лечение и прогнозировать ответ на применение наиболее часто используемых препаратов, таких как антидепрессанты и антипсихотические препараты. Это уже происходит: С-реактивный белок применяется как предсказатель дифференциального ответа на эсциталопрам или нортриптилин [54].

Иммунотерапия представляет собой оптимальную модель ПрМ, так как позволяет описать симптомы, функцию, этиологические агенты на молекулярном уровне, и вмешаться в лечение [55]. Аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) остается одним из лучших кандидатов на применение подходов ПМ, так как в настоящее время: понятны основные иммунологические и молекулярные события, лежащие в основе аллергических симптомов [56]; имеются более конкретные и чувствительные стандартные диагностические тесты по выявлению IgE-опосредованных реакций; известны молекулы, участвующие в аллергических реакциях; производятся очищенные и стандартизированные документированные продукты для эффективной и безопасной терапии. 5ПМ по-прежнему является решающим аспектом в самых сложных, дорогостоящих при лечении и распространенных хронических заболеваниях, таких как ХОБЛ [57] или астма [58].

С помощью информационных технологий необходимо производить вычислительные модели с целью предсказания будущих рисков для здоровья людей, прогрессирования заболевания и выбора эффективного лечения при сведении к минимуму побочных эффектов [59]. Инициатива ITFoM позволяет интегрировать

молекулярные, физиологические и анатомические данные каждого человека в модели «виртуального пациента». В качестве одной из шести технологий будущего, финансируемых Европейской комиссией, ITFoM с участием более чем 150 научных и промышленных партнеров из 34 стран будет способствовать развитию области функциональной геномики и компьютерных технологий с целью создания моделей «виртуального пациента», чтобы сделать их доступными для клинического применения. Профиль генома будет интегрирован с информацией по протеому и метаболиту, полученной с помощью новых мощных технологий хроматографии, масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса. Индивидуализированная модель позволит дать анализ не только текущей ситуации, но и прогнозировать ответ пациента на различные варианты терапии или непереносимость некоторых лекарств. Для обеспечения точного применения клинических лабораторных испытаний необходимо определение «здорового» населения для оценки нормального диапазона изменения биомаркеров. В ряде стран исследователи и лаборатории могут начать широкий обмен референсных интервалов и приступить к созданию крупномасштабных биобанков, что будет иметь решающее значение для вычисления точных эталонных диапазонов для улучшения лечения.

ВЫВОДЫ

Медицина 5П является развивающейся областью здравоохранения. Многие из технологий, которые будут

необходимы для достижения ее целей, находятся на ранних стадиях развития или еще не разработаны. Например, исследователи должны найти способы, чтобы стандартизировать сбор клинических данных, проектировать базы данных для эффективного хранения больших объемов информации и развивать биобанкинг. 5ПМ поднимает также этические, социальные и юридические вопросы: найти способы защиты частной жизни и конфиденциальности информации о состоянии здоровья пациентов. Пациенты должны понимать риски и выгоду от участия в научных исследованиях и применения современных технологий 5ПМ, а это означает необходимость разработки обязательного процесса получения информированного согласия. Стоимость исследований также является проблемой развития подходов 5ПМ: такие технологии, как секвенирование ДНК, являются дорогостоящими для выполнения (хотя стоимость секвенирования быстро снижается и появились секвенаторы размером с флешку). Таргетные ЛС, вероятно, будут несколько дороже широко используемых, и возмещение плательщикам (государственные структуры, страховые компании) для целевых ЛС также может создавать проблемы. Подходы 5ПМ должны стать частью рутинной медицинской помощи врачей и других медицинских работников, которые будут более информированы о данном направлении медицины и перспективах, так как все чаще возникает необходимость интерпретировать результаты генетических и других омиксных тестов применительно к лечению или профилактике.

Литература

- Щербо С. Н., Щербо Д. С. Медицина 5П: Прецизионная медицина. Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2015; (4): 5–10.
- Щербо С. Н., Щербо Д. С. Персонализированная медицина: монография в 7 томах. т. 1. Биологические основы. Москва. РУДН. 2016, 224 с.; т. 2. Лабораторные технологии. Москва. РУДН. 2017, 437 с.
- Раскина К. В., Мартынова Е. Ю., Перфильев А. В. и др. От персонализированной к точной медицине. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2017; 13 (1): 69–79.
- Щербо С. Н., Щербо Д. С. Медицина 5П: мобильное здравоохранение. Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2017; 4 (28): 5–11.
- Годков М. А. Лабораторная диагностика в эпоху научно-технической революции. Закат или рассвет? Лабораторная служба. 2017; 6 (3): 5–8.
- Щербо С. Н., Тогузов Р. Т. Тенденции развития современной лабораторной медицины (лекция). Клиническая лабораторная диагностика. 2009; (3): 25–32.
- Snyder M. iPOP and its role in participatory medicine. *Genome Med.* 2014; (6): 6.
- Roberts NJ, Vogelstein JT, Parmigiani G, et al. The predictive capacity of personal genome sequencing. *Sci Transl Med.* 2012; 4 (133): 133ra58.
- Katz J. *The silent wold of doctor and patient.* Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1983.
- Jain KK. *Personalized Medicine.* Waltham: Decision Resources Inc., MA, USA; 1998.
- Personalized Medicine Coalition (PMC). *The Case for Personalized Medicine.* 2010.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA) Department of Health and Human Services, *Paving the Way for Personalized Medicine: FDA Role in a New Era of Medical Product Development.* [(accessed on 10 January 2014)]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/PersonalizedMedicine/UCM372421.pdf>.
- Ginsburg GS, Willard HF. *Genomic and Personalized Medicine.* Elsevier Science. 2012; 1350 p.
- Schleiden S, Klingler C, Bertram T, et al. What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review. *BMC Med Ethics.* 2013; (14): 55.
- Nabipour I, Assadi M. Precision medicine, an approach for development of the future medicine technologies. *ISMJ.* 2016; (19): 167–84.
- O'Donnell PH, Danahey K, Jacobs M. Adoption of a clinical pharmacogenomics implementation program during outpatient care — initial results of the University of Chicago «1,200 Patients Project». *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2014; (166C): 68–75.
- Juengst E, McGowan ML, Fishman JR, et al. From «Personalized» to «Precision» Medicine: The Ethical and Social Implications of Rhetorical Reform in Genomic Medicine. *Hastings Cent Per.* 2016; 46 (5): 21–33.
- Interlandi J. The Paradox of Precision Medicine. *Sci Am.* 2016; 314 (4): 24–25.
- Joyner MJ, Paneth N. Seven Questions for Personalized Medicine. *JAMA.* 2015; (55905): 2015–16.
- Collins FS, Varmus H. A New Initiative on Precision Medicine. *N Engl J Med.* 2015; (372): 793–95.
- Ziegelstein RC. Personomics. *JAMA Intern. Med.* 2015; (175): 888–89.
- Chochinov HM. Health care, health caring, and the culture of medicine. *Curr Oncol.* 2014; (21): e668–e669.
- Gupte AA, Hamilton DJ. *Molecular Imaging and Precision*

- Medicine. *Cardiology*. 2016; (133): 178–80.
24. Mason-Suares H, Sweetser D, Lindeman N, et al. Training the Future Leaders in Personalized Medicine. *J Pers Med*. 2016; 6 (1): 1.
 25. Smoller J, Karlson E, Green R, et al. An eMERGE Clinical Center at Partners Personalized Medicine. *J Pers Med*. 2016; 6 (1): 5.
 26. Hricak H. Oncologic imaging: a guiding hand of personalized cancer care. *Radiology*. 2011; (259): 633–40.
 27. Le Tourneau C, Delord JP, Gonçalves A, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015; (16): 1324–34.
 28. Garraway LA, Verweij J, Ballman KV. Precision oncology: an overview. *J Clin Oncol*. 2013; 31 (15): 1803–05.
 29. Bettegowda C, Sausen M, Leary R.J, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014; (6): 224ra24.
 30. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, et al. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Annals of Oncology*. 2014; (25): 1650–56.
 31. Attard G, Beltran H. Prioritizing precision medicine for prostate cancer. *Annals of Oncology*. 2015; (26): 1041–42.
 32. Amin AI, Olama A, Benlloch S, et al. Risk analysis of prostate cancer in PRACTICAL, a multinational consortium, using 25 known prostate cancer susceptibility loci. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2015; (24): 1121–29.
 33. Bancroft EK, Page EC, Castro E, et al. Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the initial screening round of the IMPACT study. *European Urology*. 2014; (66): 489–99.
 34. Bechis SK, Otsetov AG, Ge R, et al. Age and obesity promote methylation and suppression of 5-alpha reductase 2—Implications for personalized therapy in benign prostatic hyperplasia. *Journal of Urology*. 2015; (194): 1031–37.
 35. Prakash K, Pirozzi G, Elashoff M, et al. Symptomatic and asymptomatic benign prostatic hyperplasia: Molecular differentiation by using microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; (99): 7598–603.
 36. Helfand BT, Hu Q, Loeb S, et al. Genetic sequence variants are associated with severity of lower urinary tract symptoms and prostate cancer susceptibility. *Journal of Urology*. 2013; (189): 845–48.
 37. Тофило М. А., Егорова Е. Н. МикроРНК, регулирующие адипогенез при сахарном диабете 2-го типа. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2017; 19 (3): 108–11.
 38. Ahlqvist E, Storm P, Karajamaki A, et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *The Lancet Diabetes Endocrinology*. 2018; 6 (5): 361–69.
 39. Дедов И. И., Титович Е. В., Кураева Т. Л. и др. Взаимосвязь генетических и иммунологических маркеров у родственников больных СД 1 типа. *Сахарный диабет*. 2008; (4): 46–50.
 40. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring study. *Diabetes*. 2000; (49): 2201–17.
 41. Shields BM, Longergan M, Dennis J, et al. Patient characteristics are associated with treatment response to second line glucose lowering therapy: a MASTERMIND study abstracts of 51st EASD annual meeting. *Diabetologia*. 2015; 58 (Suppl 1): S405.
 42. Chakera AJ, Steele AM, Gloyn AL, et al. Recognition and management of individuals with hyperglycemia because of a heterozygous glucokinase mutation. *Diabetes Care*. 2015; (38): 1383–92.
 43. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, et al. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia*. 2012; (55): 1265–72.
 44. Pearson ER, Pruhova S, Tack CJ, et al. Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4alpha mutations in a large European collection. *Diabetologia*. 2005; (48): 878–85.
 45. Tan Lin, Jiang T, Tan Lan, et al. Toward precision medicine in neurological diseases. *Ann Transl Med*. 2016; 4 (6): 104.
 46. Bu L-L, Yang K, Xiong W.-X, et al. Toward precision medicine in Parkinson s disease. *Ann Transl Med*. 2016; 4 (2): 26.
 47. Vieta E. Personalised medicine applied to mental health: Precision psychiatry. *Rev Psiquiatr Salud Ment*. 2015; 8 (3): 117–18.
 48. Fernandes BS, Williams LM, Steiner J, et al. The new field of “precision psychiatry”. *BMC Med*. 2017; (15): 80.
 49. Stephan KE, Bach DR, Fletcher PC, et al. Charting the landscape of priority problems in psychiatry, part 1: classification and diagnosis. *Lancet Psychiatry*. 2016; 3 (1): 77–83.
 50. Insel TR. The NIMH Research Domain Criteria (RDoC) Project: precision medicine for psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2014; 171 (4): 395–7.
 51. Andersson G, Titov N. Advantages and limitations of Internet-based interventions for common mental disorders. *World Psychiatry*. 2014; 13 (1): 4–11.
 52. Carvalho AF, Kohler CA, Brunoni AR, et al. Bias in peripheral depression biomarkers. *Psychother Psychosom*. 2016; 85 (2): 81–90.
 53. Marzano L, Bardill A, Fields B, et al. The application of mHealth to mental health: opportunities and challenges. *Lancet Psychiatry*. 2015; 2 (10): 9442–48.
 54. Uher R, Tansey KE, Dew T, et al. An inflammatory biomarker as a differential predictor of outcome of depression treatment with escitalopram and nortriptyline. *Am J Psychiatry*. 2014; 171 (12): 1278–86.
 55. Passalacqua G, Canonica GW. AIT (allergen immunotherapy): a model for the “precision medicine”. *Clin Mol Allergy*. 2015; (1): 24.
 56. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*. 2015; 8 (1): 17.
 57. Agusti A. The path to personalised medicine in COPD. *Thorax*. 2014; (69): 857–64.
 58. Fajt ML, Wenzel SE. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; (135): 299–310.
 59. Zazzu V, Regierer B, Kuhn A, et al. IT Future of Medicine: from molecular analysis to clinical diagnosis and improved treatment. *N Biotechnol*. 2013; 30 (4): 362–65.

References

1. Shcherbo SN, Shcherbo DS. *Medicina 5P: Precizionnaja medicina. Medicinskij alfavit. Sovremennaja laboratorija*. 2015; (4): 5–10.
2. Shcherbo SN, Shcherbo DS. *Personalizirovannaja medicina: monografija v 7 tomah. t. 1. Biologicheskie osnovy. Moskva. RUDN. 2016, 224 s.; t. 2. Laboratornye tehnologii. Moskva. RUDN. 2017, 437 s.*
3. Raskina KV, Martynova EJu, Perfil'ev AV, i dr. *Ot personalizirovannoj k tochnoj medicine. Racional'naja farmakoterapija v kardiologii*. 2017; 13 (1): 69–79.
4. Shcherbo SN, Shcherbo DS. *Medicina 5P: mobil'noe zdravoohranenie. Medicinskij alfavit. Sovremennaja laboratorija*. 2017; 4 (28): 5–11.
5. Godkov MA. *Laboratornaja diagnostika v jepohu nauchno-tehnicheskoy revoljucii. Zakat ili rassvet? Laboratornaja sluzhba*. 2017; 6 (3): 5–8.
6. Shcherbo SN, Toguzov RT. *Tendencii razvitija sovremennoj laboratornoj mediciny (lekcija). Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2009; (3): 25–32.
7. Snyder M. *iPOP and its role in participatory medicine. Genome Med*. 2014; (6): 6.

8. Roberts NJ, Vogelstein JT, Parmigiani G, et al. The predictive capacity of personal genome sequencing. *Sci Transl Med.* 2012; 4 (133): 133ra58.
9. Katz J. *The silent wold of doctor and patient.* Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1983.
10. Jain KK. *Personalized Medicine.* Waltham: Decision Resoures Inc., MA, USA; 1998.
11. Personalized Medicine Coalition (PMC). *The Case for Personalized Medicine.* 2010.
12. U.S. Food and Drug Administration (FDA) Department of Health and Human Services, *Paving the Way for Personalized Medicine: FDA Role in a New Era of Medical Product Development.* [(accessed on 10 January 2014)]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/PersonalizedMedicine/UCM372421.pdf>.
13. Ginsburg GS, Willard HF. *Genomic and Personalized Medicine.* Elsevier Science. 2012; 1350 p.
14. Schleidgen S, Klingler C, Bertram T, et al. What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review. *BMC Med Ethics.* 2013; (14): 55.
15. Nabipour I, Assadi M. Precision medicine, an approach for development of the future medicine technologies. *ISMJ.* 2016; (19): 167–84.
16. O'Donnell PH, Danahey K, Jacobs M. Adoption of a clinical pharmacogenomics implementation program during outpatient care — initial results of the University of Chicago «1,200 Patients Project». *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2014; (166C): 68–75.
17. Juengst E, McGowan ML, Fishman JR, et al. From «Personalized» to «Precision» Medicine: The Ethical and Social Implications of Rhetorical Reform in Genomic Medicine. *Hastings Cent Per.* 2016; 46 (5): 21–33.
18. Interlandi J. The Paradox of Precision Medicine. *Sci Am.* 2016; 314 (4): 24–25.
19. Joyner MJ, Paneth N. Seven Questions for Personalized Medicine. *JAMA.* 2015; (55905): 2015–16.
20. Collins FS, Varmus H. A New Initiative on Precision Medicine. *N Engl J Med.* 2015; (372): 793–95.
21. Ziegelstein RC. Personomics. *JAMA Intern. Med.* 2015; (175): 888–89.
22. Chochinov HM. Health care, health caring, and the culture of medicine. *Curr Oncol.* 2014; (21): e668–e669.
23. Gupte AA, Hamilton DJ. Molecular Imaging and Precision Medicine. *Cardiology.* 2016; (133): 178–80.
24. Mason-Suares H, Sweetser D, Lindeman N, et al. Training the Future Leaders in Personalized Medicine. *J Pers Med.* 2016; 6 (1): 1.
25. Smoller J, Karlson E, Green R, et al. An eMERGE Clinical Center at Partners Personalized Medicine. *J Pers Med.* 2016; 6 (1): 5.
26. Hricak H. Oncologic imaging: a guiding hand of personalized cancer care. *Radiology.* 2011; (259): 633–40.
27. Le Tourneau C, Delord JP, Gonçalves A, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015; (16): 1324–34.
28. Garraway LA, Verweij J, Ballman KV. Precision oncology: an overview. *J Clin Oncol.* 2013; 31 (15): 1803–05.
29. Bettegowda C, Sausen M, Leary R.J, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014; (6): 224ra24.
30. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, et al. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Annals of Oncology.* 2014; (25): 1650–56.
31. Attard G, Beltran H. Prioritizing precision medicine for prostate cancer. *Annals of Oncology.* 2015; (26): 1041–42.
32. Amin AI, Olama A, Benlloch S, et al. Risk analysis of prostate cancer in PRACTICAL, a multinational consortium, using 25 known prostate cancer susceptibility loci. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2015; (24): 1121–29.
33. Bancroft EK, Page EC, Castro E, et al. Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the initial screening round of the IMPACT study. *European Urology.* 2014; (66): 489–99.
34. Bechis SK, Otsetov AG, Ge R, et al. Age and obesity promote methylation and suppression of 5-alpha reductase 2—Implications for personalized therapy in benign prostatic hyperplasia. *Journal of Urology.* 2015; (194): 1031–37.
35. Prakash K, Pirozzi G, Elashoff M, et al. Symptomatic and asymptomatic benign prostatic hyperplasia: Molecular differentiation by using microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002; (99): 7598–603.
36. Helfand BT, Hu Q, Loeb S, et al. Genetic sequence variants are associated with severity of lower urinary tract symptoms and prostate cancer susceptibility. *Journal of Urology.* 2013; (189): 845–48.
37. Tofilo MA, Egorova EN. MikroRNK, regulirujushhie adipogenez pri sahomom diabete 2-go tipa. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke.* 2017; 19 (3): 108–11.
38. Ahlqvist E, Storm P, Karajamaki A, et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *The Lancet Diabetes Endocrinology.* 2018; 6 (5): 361–69.
39. Dedov II, Titovich EV, Kuraeva TL, i dr. Vzaimosvjaz' geneticheskikh i immunologicheskikh markerov u rodstvennikov bol'nyh SD 1 tipa. *Saharnyj diabet.* 2008; (4): 46–50.
40. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring study. *Diabetes.* 2000; (49): 2201–17.
41. Shields BM, Longergan M, Dennis J, et al. Patient characteristics are associated with treatment response to second line glucose lowering therapy: a MASTERMIND study abstracts of 51st EASD annual meeting. *Diabetologia.* 2015; 58 (Suppl 1): S405.
42. Chakera AJ, Steele AM, Gloyd AL, et al. Recognition and management of individuals with hyperglycemia because of a heterozygous glucokinase mutation. *Diabetes Care.* 2015; (38): 1383–92.
43. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, et al. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia.* 2012; (55): 1265–72.
44. Pearson ER, Pruhova S, Tack CJ, et al. Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4alpha mutations in a large European collection. *Diabetologia.* 2005; (48): 878–85.
45. Tan Lin, Jiang T, Tan Lan, et al. Toward precision medicine in neurological diseases. *Ann Transl Med.* 2016; 4. (6): 104.
46. Bu L-L, Yang K, Xiong W-X, et al. Toward precision medicine in Parkinson s disease. *Ann Transl Med.* 2016; 4 (2): 26.
47. Vieta E. Personalised medicine applied to mental health: Precision psychiatry. *Rev Psiquiatr Salud Ment.* 2015; 8 (3): 117–18.
48. Fernandes BS, Williams LM, Steiner J, et al. The new field of “precision psychiatry”. *BMC Med.* 2017; (15): 80.
49. Stephan KE, Bach DR, Fletcher PC, et al. Charting the landscape of priority problems in psychiatry, part 1: classification and diagnosis. *Lancet Psychiatry.* 2016; 3 (1): 77–83.
50. Insel TR. The NIMH Research Domain Criteria (RDoC) Project: precision medicine for psychiatry. *Am J Psychiatry.* 2014; 171 (4): 395–7.
51. Andersson G, Titov N. Advantages and limitations of Internet-based interventions for common mental disorders. *World Psychiatry.* 2014; 13 (1): 4–11.
52. Carvalho AF, Kohler CA, Brunoni AR, et al. Bias in peripheral depression biomarkers. *Psychother Psychosom.* 2016; 85 (2): 81–90.
53. Marzano L, Bardill A, Fields B, et al. The application of mHealth to mental health: opportunities and challenges. *Lancet Psychiatry.* 2015; 2 (10): 9442–48.
54. Uher R, Tansey KE, Dew T, et al. An inflammatory biomarker as a differential predictor of outcome of depression treatment with escitalopram and nortriptyline. *Am J Psychiatry.* 2014; 171 (12): 1278–86.
55. Passalacqua G, Canonica GW. AIT (allergen immunotherapy): a model for the “precision medicine”. *Clin Mol Allergy.* 2015; (1): 24.
56. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy*

- Organ J. 2015; 8 (1): 17.
57. Agusti A. The path to personalised medicine in COPD. *Thorax*. 2014; (69): 857–64.
58. Fajt ML, Wenzel SE. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; (135): 299–310.
59. Zazzu V, Regierer B, Kuhn A, et al. IT Future of Medicine: from molecular analysis to clinical diagnosis and improved treatment. *N Biotechnol*. 2013; 30 (4): 362–65.

ОЦЕНКА ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕВЫМ СИНДРОМОМ В ГРУДНОЙ КЛЕТКЕ И АНГИОГРАФИЧЕСКИ НЕИЗМЕННЫМИ КОРОНАРНЫМИ АРТЕРИЯМИ МЕТОДОМ СИНХРОНИЗИРОВАННОЙ С ЭКГ ОДНОФОТОННОЙ ЭМИССИОННОЙ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ

Э. А. Хачирова¹✉, Л. Е. Самойленко², О. П. Шевченко¹

¹ Российский национальный исследовательский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Российская медицинская академия постдипломного образования, Москва, Россия

На протяжении многих лет остается актуальной тема диагностики и тактики ведения пациентов с ангиографически неизменными или малоизменными коронарными артериями (КА). Целью исследования было оценить диастолическую функцию у пациентов с болевым синдромом в грудной клетке и неизменными/малоизменными КА (Н/МКА) по данным синхронизированной с ЭКГ однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (С-ОЭКТ/КТ). В исследование вошли 49 пациентов с болевым синдромом в области грудной клетки, положительными результатами нагрузочного теста и Н/МКА по данным коронароангиографии (КАГ). Всем пациентам выполнили С-ОЭКТ/КТ миокарда по двухдневному протоколу. После исследования пациенты были разделены на три группы: 17 пациентов с микрососудистой стенокардией составили группу 1; 22 пациента с пограничной артериальной гипертензией (АГ), или гипертонической болезнью (ГБ) I стадии, ассоциирующейся с вторичной микрососудистой дисфункцией — группу 2. Группу контроля, или группу 3, составили 10 практически здоровых лиц, у которых при КАГ были исключены заболевания со стороны сердечно-сосудистой системы, сопровождающиеся изменениями коронарных артерий и нарушениями перфузии миокарда при проведении ОЭКТ. У большинства пациентов в группах 1 и 2 были выявлены нарушения диастолической функции, при этом в группе 2 они глубже и усугубляются при нагрузке. Наиболее чувствительный параметр диастолической функции — средняя скорость наполнения ЛЖ в первую треть диастолы (MFR/3) — изменен практически у всех пациентов групп 1 и 2. У пациентов группы контроля изменения не выявлены. Таким образом, у пациентов с болью в груди, положительным стресс-тестом и Н/МКА выявлены признаки диастолической дисфункции ЛЖ (ДДФ) и дальнейшее ее ухудшение при нагрузке. Эти пациенты могут представлять собой группу риска развития сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса.

Ключевые слова: однофотонная эмиссионная компьютерная томография, ангиографически неизменные/малоизмененные эпикардальные коронарные сосуды, диастолическая функция, перфузионная сцинтиграфия, микрососудистая стенокардия

Благодарности: авторы благодарят Виктора Константиновича Сычева за возможность воспользоваться радиоизотопной лабораторией и оборудованием в процессе сбора материала.

Информация о вкладе авторов: Э. А. Хачирова подбирала пациентов, оформляла документацию для проведения исследования, участвовала в проведении велоэргометрии и сцинтиграфического исследования, обрабатывала полученные данные; Л. Е. Самойленко контролировала протокол исследования, проверяла полученные результаты; О. П. Шевченко контролировал соблюдение критериев включения в исследование и критериев исключения при отборе пациентов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 150 от 15 декабря 2015 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Эльвира Азреталиевна Хачирова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; elchik09@mail.ru

Статья получена: 17.09.2018 **Статья принята к печати:** 11.11.2018 **Опубликована онлайн:** 23.02.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.001

ASSESSMENT OF DIASTOLIC FUNCTION IN PATIENTS WITH CHEST PAIN AND ANGIOGRAPHICALLY NORMAL CORONARY ARTERIES USING ECG-GATED SPECT

Khachirova EA¹✉, Samoylenko LE², Shevchenko OP¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

The diagnosis and treatment of patients with angiographically normal or near normal coronary arteries remains a clinically relevant problem. The aim of this study was to assess diastolic function in patients with chest pain and normal/near normal coronary arteries (NECA) using ECG-gated SPECT/CT. The study recruited 49 patients presenting with chest pain, a positive cardiac stress test and normal coronary arteries, as demonstrated by coronary angiography. All patients were ordered a myocardial SPECT/CT scan, which was performed according to a two-day protocol. After the scan, the patients were divided into 3 groups. Group 1 consisted of 17 patients with microvascular angina. Group 2 was composed of 22 patients with borderline-high blood pressure or stage I hypertensive heart disease associated with secondary microvascular dysfunction. Ten seemingly healthy individuals constituted the control group. According to coronary angiography, the controls had no cardiovascular pathologies accompanied by coronary artery disorders or impaired myocardial perfusion (SPECT). The majority of patients from groups 1 and 2 were found to have impaired diastolic function. The impairments were more pronounced in group 2 tended to exacerbate with stress. The most sensitive parameter of diastolic function, MFR/3, was outside the reference range in almost all patients in groups 1 and 2. MFR/3 characterizes the mean filling rate of the left ventricle in the first third of diastole. The control group showed no symptoms of diastolic dysfunction. Thus, the patients with chest pain, a positive stress test and NECA had signs of left ventricular diastolic dysfunction exacerbated with stress. Such patients are at risk for heart failure with preserved ejection fraction.

Keywords: single-photon emission computed tomography, microvascular angina, diastolic function, angiographically normal or near normal epicardial coronary arteries, myocardial perfusion

Acknowledgements: the authors wish to thank Viktor K. Sychev for kindly allowing them to use the equipment of the Laboratory for Radioisotopes.

Author contribution: Khachirova EA recruited patients for the study, prepared the necessary documentation, participated in conducting the cardiac stress test and SPECT/CT, and processed the obtained data; Samoylenko LE controlled the course of the study and double-checked the obtained results; Shevchenko OP made sure inclusion and exclusion criteria were met.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian Medical Research Medical University (Protocol 150 dated December 15, 2015). All patients gave informed consent to participate.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elvira A. Khachirova
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; elchik09@mail.ru

Received: 17.09.2018 **Accepted:** 11.11.2018 **Published online:** 23.02.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.001

С внедрением в повседневную клиническую практику эхокардиографии (ЭХОКГ) выяснилось, что сердечная недостаточность (СН) с сохраненной систолической функцией (с фракцией выброса (ФВ) миокарда левого желудочка (ЛЖ) > 45%) достаточно широко распространена во всем мире. Согласно данным ряда исследований (Фремингемское, 1948–2012 гг., Рочестерское эпидемиологическое, 1960–1984 гг. и др.), пациенты с сохраненной ФВЛЖ составляют от одной трети до половины больных с СН, и их общая численность неуклонно растет [1, 2]. Полагают, что одной из причин СН у таких пациентов является диастолическая дисфункция (ДДФ) [3–5]. При этом изолированная ДДФ встречается чаще у пациентов с Н/МКА [6].

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в изучении ДДФ у больных с Н/МКА, к настоящему времени вопросы этиологии и патогенеза нарушений процессов диастолы у этой категории пациентов окончательно не раскрыты [7, 8]. В литературе обсуждаются различные причины ДДФ и ассоциированной с ней СН, в том числе гипертрофия миокарда ЛЖ, метаболические сдвиги, фиброз миокарда и коронарная микрососудистая дисфункция (МСД), которую многие авторы рассматривают не только в качестве основы ДДФ и СН, но еще и в качестве фактора риска неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [9, 10].

Клинические данные, подтверждающие роль МСД в развитии ДДФ у больных с неизменными коронарными артериями, базируются на ограниченном числе работ. Так, в одном из довольно обширных исследований ретроспективно оценили 376 историй болезни пациентов с ФВЛЖ $\geq 50\%$ и без признаков обструктивного поражения коронарных сосудов [11]. У всех пациентов с СН с сохраненной ФВЛЖ и признаками ДДФ было выявлено снижение коронарного резерва по данным ПЭТ. По мнению авторов работы, это может указывать на связь между микрососудистыми нарушениями, ДДФ и СН. Еще одной известной причиной развития ДДФ у пациентов с Н/МКА считают гипертрофию миокарда (ГМ). Так, при оценке диастолической функции с помощью трансэзофагеальной доплерографии у 30 пациентов с ГМЛЖ 16 пациентов имели признаки ишемии и неизмененные КА, 14 — бессимптомную ГМЛЖ. Признаки ДДФ были обнаружены у пациентов обеих групп, но более выраженными оказались у пациентов группы 1 [12].

К возможным факторам риска ДДФ относят эктопическое отложение жира в миокарде, называемое стеатозом миокарда. В одном из исследований оценили содержание триглицеридов в миокарде и диастолическую функцию у 13 женщин с интактными КА с помощью протонной магнитно-резонансной спектроскопии и магнитно-резонансной маркировки тканей [6]. У 5 из них были выявлены признаки МСД и скрытой ДДФ, коррелирующие с более высоким содержанием триглицеридов в миокарде у этих пациенток. Авторы пришли к мнению, что стеатоз миокарда имеет четкую связь с развитием диастолической дисфункции у этой категории пациентов.

В то же время в мировой литературе имеются работы, указывающие на отсутствие ДДФ у данного контингента больных. Так, при оценке сердечной гемодинамики с помощью эхокардиографии у 99 пациентов с синдромом Х, который был подтвержден нагрузочными пробами, не было обнаружено достоверных нарушений диастолической функции [13].

В связи с неоднозначными данными, представленными в литературе, важным и актуальным является продолжение исследований в этом направлении, определение критериев ДДФ у пациентов с Н/МКА с целью предотвращения развития диастолической сердечной недостаточности. В настоящее время наиболее доступным и распространенным методом оценки систолической и диастолической функций сердца остается ЭхоКГ. При всех достоинствах этот метод обладает недостаточной воспроизводимостью и значительно зависит от выполняющего оператора. Поэтому в клинической практике не меньшей популярностью пользуются радионуклидные методы, обладающие высокой точностью, воспроизводимостью, их результаты практически не зависят от выполняющего оператора.

Учитывая сказанное выше, целью данного исследования было оценить диастолическую функцию миокарда ЛЖ с помощью радионуклидного метода С-ОЭКТ/КТ миокарда у больных с болевым синдромом в области грудной клетки и Н/МКА.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 49 пациентов (24/25 мужчин/женщин). Критерии включения: возраст 43–77 лет (в среднем $62,6 \pm 8,9$); наличие болевого синдрома (БС) в области грудной клетки, положительного результата нагрузочного теста, проведенного в амбулаторных условиях. Все пациенты проходили стационарное обследование и лечение на базе кафедры кардиологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова.

Критерии исключения: в исследование не включали пациентов с АГ (систолическое артериальное давление ≥ 180 и диастолическое артериальное давление ≥ 110 мм рт. ст.), с поражением органов-мишеней и ГМЛЖ, гипертрофической и дилатационной кардиомиопатиями, перенесших острый инфаркт миокарда в течение ближайших шести месяцев, предшествующих исследованию, с ФВЛЖ < 45%, постоянной формой трепетания и фибрилляции предсердий, нарушениями сердечного ритма и проводимости, заболеваниями клапанного аппарата, эндокринной, нервной системы, почечной и печеночной недостаточностью, иными заболеваниями, способствующими снижению резерва миокардиальной перфузии либо влияющими на систолическую и диастолическую функции миокарда.

Клиническое обследование включало сбор анамнеза, осмотр, регистрацию ЭКГ в 12 стандартных отведениях, холтеровское мониторирование ЭКГ, клинический и биохимический анализы крови, велоэргометрическую пробу (ВЭМ-проба), КАГ, а также С-ОЭКТ, совмещенную с рентгеновской КТ в покое и в сочетании с ВЭМ-пробой. По данным КАГ, у 37 обследованных КА были интактными, у 12 выявлены изменения только в одной КА со степенью стенозирования < 40% и нормальная систолическая функция миокарда по данным ЭхоКГ. У 22 пациентов была обнаружена пограничная АГ или ГБ I стадии (индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) 132 ± 21) с достигнутыми целевыми значениями показателей АД (в среднем, $125/80$ мм рт. ст.) на фоне медикаментозной терапии. У 17 пациентов иных сопутствующих заболеваний не выявлено (ИММЛЖ 128 ± 27). У 21 пациента была выявлена гиперхолестеринемия: в целом по группе показатели общего холестерина (ХС) составили $5,4 \pm 1,68$ ммоль/л, ХС липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) — $3,3 \pm 1,0$ ммоль/л. У 10 обследованных заболевания сердечно-сосудистой системы были исключены,

они составили контрольную группу. Клиническая характеристика больных представлена в табл. 1.

Всем больным с целью верификации ишемии миокарда и оценки систолической и диастолической функции сердца выполняли С-ОЭКТ/КТ миокарда в отделении радиоизотопной диагностики. Антиангинальную терапию отменяли перед проведением исследования на время, составляющее > 5 периодов полувыведения лекарственного средства.

С-ОЭКТ/КТ миокарда выполняли по двухдневному протоколу: в первый день проводили исследование в покое; во второй день — в сочетании с ВЭМ-пробой. ВЭМ-пробу выполняли под контролем ЭКГ и АД на велоэргометре фирмы *Ergoline* по стандартному протоколу, согласно которому начальная нагрузка составляла 25 Вт с последующим увеличением на 25 Вт каждые 3 мин. При достижении критериев прекращения нагрузочной пробы внутривенно вводили радиофармпрепарат (РФП), после чего больной продолжал выполнять нагрузку в течение 1 мин.

В качестве РФП применяли отечественный Технеция (^{99m}Tc) сестамиби. РФП вводили внутривенно болюсом активностью 444–555 МБк. Регистрацию изображения на гамма-камере начинали через 60–90 мин при введении Технеция (^{99m}Tc) сестамиби в покое и через 45–60 мин — при введении РФП во время проведения нагрузочной пробы.

ОЭКТ/КТ проводили в томографическом режиме, синхронизированном с зубцом R ЭКГ, на двухдетекторной гамма-камере «Symbia T-16» (*Siemens*; Германия), совмещенной с низкодозовым компьютерным томографом, оснащенный специальным коллиматором «SMARTZOOM» для проведения кардиологических исследований. Исследование выполняли в положении больного «лежа на спине» с вращением детекторов, расположенных под углом 90° по отношению друг к другу, вокруг тела пациента на 180° . Регистрировали 32 проекции, по 16 проекций каждым детектором.

С помощью программы QPS/QGS, AutoSPECT (Quark Inc., версия 8.5) оценивали количественные показатели перфузии и диастолической функции (ДФ) миокарда по 17-сегментарной модели ЛЖ. Оценивали следующие показатели систолической и диастолической функций:

1. Показатели систолической функции:

– ФВ $\geq 50\%$ в состоянии покоя и после нагрузочной пробы;

– PER (ПСИ, КСО/с, в норме 2–3) — пиковая объемная скорость изгнания ЛЖ в покое и после нагрузочной пробы.

2. Показатели диастолической функции:

– PFR (ПЧН, КДО/с, в норме 2–3) — пиковая объемная скорость наполнения ЛЖ, характеризует диастолическую функцию в целом;

– MFR/3 (СЧН за 1/3, КДО/с, в норме 1,5–2) — средняя скорость наполнения ЛЖ в первую треть диастолы;

– PFR2 (ПЧН2, в норме отсутствует) — при наличии в диастоле двух и более пиков наполнения ЛЖ вычисляли пиковую объемную скорость наполнения желудочка во время 2-го пика;

– TTPF (в норме 100–150 мс) — время от начала диастолы до пикового уровня наполнения ЛЖ.

Отклонение хотя бы одного из показателей ДФ от нормальных значений расценивали как ДДФ [10].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистических программ *Statistica 6.0* (*StatSoft*; версия 6.0) Данные представлены в виде $M \pm SD$ (средняя величина \pm стандартное отклонение). Для сравнения качественных переменных использовали

хи-квадрат Пирсона. При количестве наблюдений в одной из сравниваемых групп менее 11 применяли хи-квадрат Пирсона с поправкой Йетса. А при количестве наблюдений менее 5 — двусторонний точный критерий Фишера.

Для сравнения количественных независимых переменных применяли методы непараметрической статистики: для двух переменных — критерий Манна–Уитни, трех и более — Краскела–Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам обследования было сформировано три группы. Группу 1 составили 17 пациентов с микрососудистой стенокардией (МСС): наличие болевого синдрома в грудной клетке, отсутствие сопутствующих заболеваний, способствующих снижению резерва миокардиальной перфузии, интактные коронарные артерии по данным коронароангиографии и верифицированная преходящая ишемия миокарда по данным С-ОЭКТ/КТ. В группу 2 вошли 22 пациента с пограничной АГ, или ГБ I стадии, подтвержденной результатами суточного мониторинга АД, без ГМЛЖ (ИММЛЖ 132 ± 21), без поражения органов-мишеней, с достигнутыми целевыми значениями АД и верифицированной преходящей ишемией миокарда, по данным С-ОЭКТ/КТ, ассоциирующейся с вторичной МСД. Группу 3 составили 10 практически здоровых лиц, у которых были исключены заболевания сердечно-сосудистой системы, изменения коронарных артерий при КАГ и нарушения перфузии миокарда при проведении ОЭКТ (группа сравнения). Пациенты во всех группах были сопоставимы по возрасту, индексу массы тела (ИМТ), частоте сердечных сокращений (ЧСС), АД, измеренных в состоянии покоя. В целом по группам не было достоверных различий по таким гемодинамическим параметрам, как ЧСС, АД, КСР, КДР (по данным эхокардиографии), измеренным в состоянии покоя (см. табл. 1).

Следует отметить, что у обследованных лиц контрольной группы показатели систолической и диастолической функций миокарда ЛЖ были в пределах нормальных значений и в покое, и после пробы с физической нагрузкой.

У обследованных больных с Н/МКА не было выявлено достоверных различий между показателями, характеризующими систолическую функцию миокарда ЛЖ. ФВ и пиковая объемная скорость изгнания крови из желудочков в покое и после пробы с физической нагрузкой на велоэргометре достоверно не различались у больных групп 1 и 2: ФВ в покое составила $58,5 \pm 6,6$ и $59,5 \pm 6,8$ ($p > 0,05$) соответственно, после нагрузки — $65,6 \pm 7,8$ и $66,4 \pm 8,8$ ($p > 0,05$) соответственно. PER у пациентов группы 1 составила в покое $2,5 \pm 0,2$, после нагрузки — $2,7 \pm 0,3$; у пациентов группы 2 — $2,4 \pm 0,3$ и $2,7 \pm 0,4$ ($p > 0,05$) соответственно.

Локальных нарушений систолической функции миокарда ЛЖ у обследованных больных обеих групп не было выявлено.

Нарушения со стороны ДФ миокарда ЛЖ в покое и после ВЭМ-пробы были выявлены у большинства обследованных больных с Н/МКА. У всех пациентов группы 1 и 17 пациентов группы 2 выявляли изменения хотя бы одного параметра, свидетельствующие о ДДФ. Обращает на себя внимание изменение практически во всех случаях показателя MFR/3. Однако чаще выявляли сочетание изменений нескольких показателей. Так, в покое в группе 1 у 5 пациентов выявлено изменение только

одного параметра (MFR/3), у 6 пациентов — сочетание изменений двух параметров (при этом один из них MFR/3), у 5 пациентов были изменены три параметра и у одного пациента — все 4 параметра. При нагрузке отклонение от нормальных значений только одного параметра выявлялось у 3 пациентов, двух — у 4 пациентов, трех — у 7 и четырех — у 2 пациентов. Как видно из представленных данных, после нагрузочной пробы изменение трех и четырех показателей, характеризующих ДФ, отмечено у большего числа пациентов по сравнению с исследованием в покое.

В группе 2 в покое нарушение только одного показателя обнаружено у 2 пациентов, двух — у 7, трех — у 5 и четырех — у 3 пациентов. В то же время у 5 пациентов не выявлено изменений ни одного параметра. В ответ на нагрузку изменения только одного показателя

определялись лишь у 1 пациента, двух — у 7, трех — у 6 и четырех — у 4 пациентов.

Средние значения показателей, характеризующих ДФ у больных групп 1 и 2 с Н/МКА и в контрольной группе, представлены в табл. 2.

Между пациентами групп 1 и 2 выявлена достоверная разница при сравнении PFRrest, MFR/3stress, TTPFrest, PFR2stress. Количество выявленных двух пиков наполнения ЛЖ в покое отмечалось у 3 (17%) пациентов в группе 1 и 5 (23%) — в группе 2; после нагрузки — у 4 (23%) и 7 (32%) соответственно. Достоверной разницы MFR/3 в покое и после нагрузки между пациентами групп 1 и 2 не получено. Возможно, это связано с тем, что нарушения этого параметра уже есть в обеих группах и в покое, и в нагрузке.

При сравнении с группой контроля выявлена достоверная разница в группе 1 во всех случаях, кроме

Таблица 1. Клинические показатели исследуемых групп пациентов

Показатели	Группа 1 (МСС), n = 17	Группа 2 (МСД), n = 22	Группа 3 сравнения, n = 10
Возраст	62,7 ± 7,8 (50–77)	60,6 ± 8,1 (44–75)	63,2 (43–74)
Пол, м/ж	6/11	12/10	6/4
ИМТ (единицы измерения)	25,8 ± 3,6	26,7 ± 3,2	25,7 ± 3,47
Длительность заболевания, годы	3,4 ± 2	3,8 ± 1,9	3,2 ± 1,7
Систолическое АД (мм рт. ст.)	122 ± 9,2	130 ± 6,8	126 ± 6,4
Диастолическое АД (мм рт. ст.)	73 ± 5,8	74 ± 4,0	72 ± 6,0
ИММЛЖ	128 ± 27	132 ± 21	127 ± 18
ЧСС в покое	67 ± 8	72 ± 6	66 ± 8
Характеристика боли			
Неангинозная (локальная, от нескольких часов и более, нитроглицерином не купируется)	5	7	10
Типичная ангинозная	12	15	0
Данные ХМ-ЭКГ:			
Норма	6	11	10
Депрессия ST > 2,0 мм	4	5	0
Депрессия ST < 2,0	7	6	0
Данные эхокардиографии			
ФВ ЛЖ (по методу Симпсона), %	64,5 ± 9,5	60,7 ± 4,0	67,4 ± 10,2
КСР, см	3,5 ± 0,3	3,6 ± 0,3	2,77 ± 0,5
КДР, см	4,8 ± 0,3	4,9 ± 0,4	4,65 ± 0,2
ТЗС, см	1,0 ± 0,06	1,04 ± 0,08	0,98 ± 0,15

Примечание: МСС — микрососудистая стенокардия; КСР — конечный систолический размер; КДР — конечный диастолический размер; ТЗС — толщина задней стенки; ЧСС — частота сердечных сокращений.

Таблица 2. Количественные показатели диастолической функции в исследуемых группах пациентов

Показатели	Показатели ДФ				p — различие между группами			
	Группы 1 и 2 n = 39	Группа 1 n = 17	Группа 2 n = 22	Группа 3 (контроль) n = 10	1 и 4 столбцы	2 и 3 столбцы	2 и 4 столбцы	3 и 4 столбцы
	1	2	3	4				
PFRstress, КДО/с	1,89 ± 0,21	1,93 ± 0,17	1,86 ± 0,24	2,75 ± 0,31	0,000001	0,5	0,00002	0,000009
PFRrest, КДО/с	1,97 ± 0,27	2,12 ± 0,28	1,86 ± 0,20	2,32 ± 0,32	0,002	0,003	0,14	0,0001
MFR/3 stress, КДО/с	1,12 ± 0,22	1,01 ± 0,23	1,20 ± 0,17	1,77 ± 0,14	0,000001	0,009	0,00002	0,000009
MFR/3rest, КДО/с	1,26 ± 0,24	1,26 ± 0,24	1,26 ± 0,25	1,60 ± 0,15	0,0003	0,9	0,0008	0,001
TTPFrest, мс	164,1 ± 18,1	156,0 ± 13,1	170,4 ± 19,2	138,4 ± 9,5	0,000047	0,015	0,001	0,00005
TTPFstress, мс	172,3 ± 24,9	166,3 ± 13,5	176,9 ± 30,5	153,0 ± 6,8	0,01	0,3	0,009	0,04
PFR2stress, число пациентов, абс. число, %	14 (35,9%)	3 (17,6%)	11 (50,0%)	0	–	0,049	–	–
PFR2rest, число пациентов, абс. число, %	8 (20,5%)	1 (5,9%)	7 (31,8%)	0	–	0,1	–	–

Примечание: значимые различия выделены жирным шрифтом; stress — показатель после нагрузки; rest — показатель в состоянии покоя.

PFRrest, в группе 2 — во всех случаях сравнения. Следует отметить, что по данным ЭхоКГ признаки ДДФ выявляли у 11 (65%) пациентов группы 1 и 14 (82%) пациентов группы 2. К эхокардиографическим критериям ДДФ ЛЖ относят: снижение скорости раннего диастолического пика (e') (e' средний < 9 см/с), увеличение соотношения между пиками трансмитрального кровотока (> 15), а также комбинацию некоторых показателей [12]. У всех пациентов, у которых по данным ЭхоКГ регистрировали ДДФ, определяли нарушения ДФ по данным С-ОЭКТ.

В качестве клинического примера приводим выписку из истории болезни пациентки Ш., 69 лет, с болевым синдромом в области грудной клетки при неизменных коронарных артериях (стенокардия напряжения II ФК). Боли за грудиной и чувство нехватки воздуха длительностью до 25 мин возникали при эмоциональной нагрузке, нитроглицерином полностью не купировались. Анамнез: боли беспокоят около 2 лет, возникают практически ежедневно. Семейный анамнез не отягощен. Вредные привычки отрицает.

При поступлении состояние удовлетворительное. ИМТ 20. Показатели клинического, биохимического анализов крови, а также уровни гормонов щитовидной железы в пределах нормы. ЭКГ: ритм синусовый правильный, ЧСС 68 в мин. ЭхоКГ: КДР 4,6 см, КСР 3,2 см, ТЗС 1,0 см. ФВ $> 60\%$, нарушений локальной сократимости нет. При проведении ВЭМ-пробы в амбулаторных условиях накануне госпитализации выявлены эпизоды депрессии сегмента ST до 1,5 мм. По результатам КАГ коронарные сосуды интактны.

По данным С-ОЭКТ (рис. 1, 2), выполненной в покое (1) и после ВЭМ-пробы (2), показатели систолической функции миокарда ЛЖ не изменены: ФВЛЖ составила 67% в покое и 76% после пробы с физической нагрузкой; локальные нарушения движения стенок ЛЖ не регистрируются; PER ЛЖ составила 2,7 в покое и 2,94 при нагрузке.

PFR ЛЖ в пределах нормы: в покое — 2,71, после ВЭМ-пробы — 3,04; MFR/3 ЛЖ изменена и составляет в покое 0,77, после нагрузки — 0,91. TTPF ЛЖ

нарушено и составляет 286 в покое и 287 после нагрузки. Дополнительные пики наполнения ЛЖ не выявлены.

У пациентки обнаружены признаки ДДФ, о чем свидетельствуют измененные показатели MFR/3 и TTPF. По данным перфузионной ОЭКТ миокарда, зарегистрированы признаки преходящей ишемии миокарда в области верхушки и медиальных областях передней стенки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании ДДФ выявлена у большинства обследованных больных с Н/МКА. Какие факторы могут способствовать нарушению процессов диастолы у данной категории больных? В качестве одной из причин ДДФ в литературе рассматривают фиброзные изменения миокарда, сопровождающиеся нарушениями локальной сократимости [3, 6]. В настоящем исследовании у всех пациентов систолическая функция миокарда ЛЖ была не нарушена, ФВЛЖ и PER из желудочков в покое и после пробы с физической нагрузкой находились в пределах нормальных значений, локальные нарушения движения стенок ЛЖ не определялись. Следовательно, в данном исследовании выявленные нарушения ДФ у пациентов обеих групп, по всей вероятности, не ассоциируются с нарушениями локальной сократимости (с фиброзными изменениями миокарда).

В качестве еще одной из причин ДДФ обсуждается гипертрофия миокарда ЛЖ. В данное исследование пациентов с ГМЛЖ не включали, у всех пациентов ИММЛЖ оставался в пределах нормы и составил 128 ± 27 и 132 ± 21 в группах 1 и 2 соответственно, и 127 ± 18 в группе контроля.

Что касается метаболических сдвигов как фактора возникновения ДДФ, то в исследование не вошли пациенты с заболеваниями, которые могли бы с таковыми ассоциироваться, если не принимать во внимание метаболические сдвиги, сопровождающие развитие преходящей ишемии миокарда.

В качестве наиболее вероятной основы для возникновения ДДФ у обследованной категории пациентов

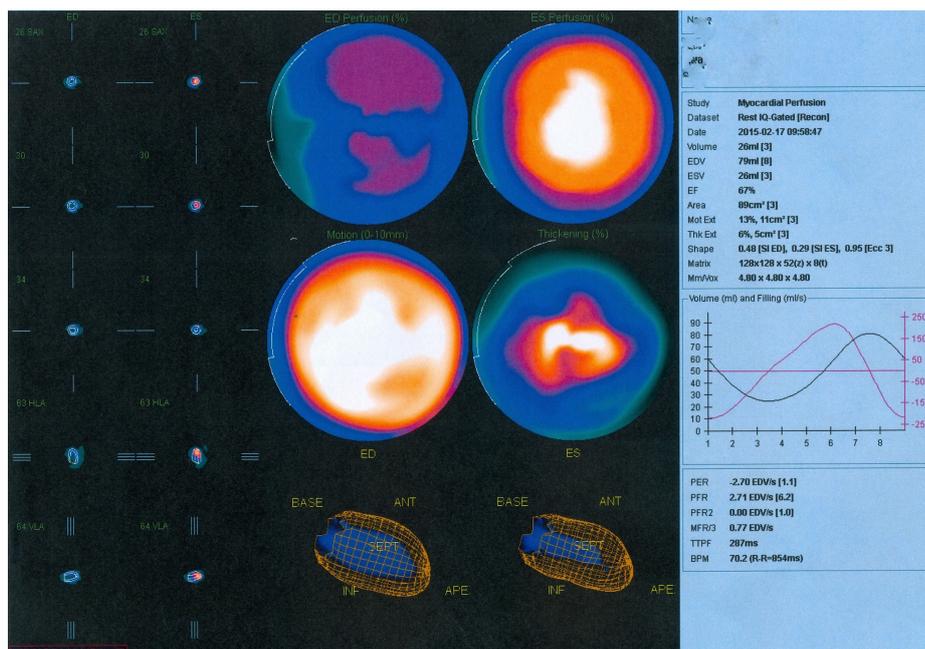


Рис. 1. С-ОЭКТ пациентки Ш., 69 лет, с болевым синдромом в области грудной клетки при неизменных коронарных артериях (стенокардия напряжения II ФК) в покое

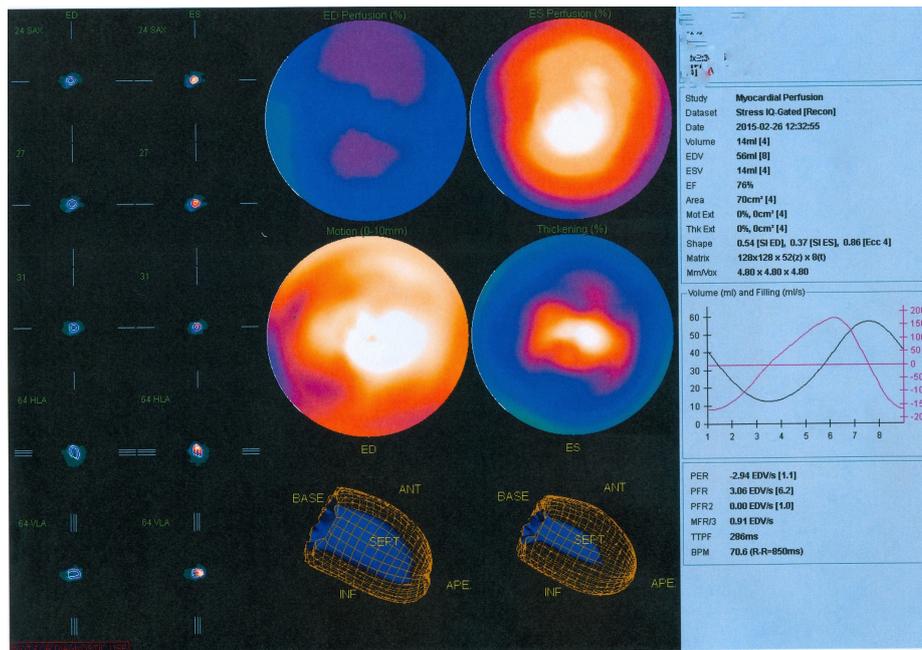


Рис. 2. С-ОЭКТ пациентки Ш., 69 лет, с болевым синдромом в области грудной клетки при неизмененных коронарных артериях (стенокардия напряжения II ФК) после нагрузки

можно обсудить микрососудистую дисфункцию. Коронарные артерии у больных в данном исследовании не изменены, но по данным ОЭКТ/КТ у пациентов и группы 1, и группы 2 верифицирована преходящая ишемия миокарда.

У больных группы 2 показатели PFR ЛЖ и TTPF ЛЖ были изменены в большей степени, чем у больных группы 1 без сопутствующей ГБ. MFR/3, наиболее чувствительный параметр диастолической функции, была изменена уже в покое, по сравнению с группой контроля, но достоверно не различалась между группами 1 и 2. В ответ на нагрузку при отсутствии локальных нарушений движения стенок ЛЖ изменения MFR/3 стали более значимыми. Вероятно, причиной этому явилось снижение резерва миокардиального кровотока и преходящая ишемия миокарда.

Помимо этого, у части пациентов обеих групп было обнаружено появление 2-го пика наполнения ЛЖ в покое и увеличение количества этих пиков в ответ на нагрузку.

Полученные в настоящем исследовании данные согласуются с результатами других исследований, посвященных диастолической дисфункции у пациентов с неизмененными КА. Так, нарушения диастолической функции у пациенток с МВС продемонстрированы с использованием метода доплер-эхокардиографии [14]. В другом исследовании оценивали ДФ параллельно методами С-ОЭКТ, ЭхоКГ и МРТ сердца [15]. Данные

С-ОЭКТ полностью согласуются с результатами настоящего исследования. Что касается оценки показателей диастолической функции с помощью ЭхоКГ и С-ОЭКТ в работе указанных авторов, то по данным ЭхоКГ ДДФ выявлена более чем у 60% пациентов с ДДФ, выявленной по данным С-ОЭКТ, что также совпадает с результатами настоящей работы (65 и 82% в группах 1 и 2 соответственно). Таким образом, по мнению Y.W. Wu с соавторами, С-ОЭКТ оказался более чувствительным в выявлении ДДФ в сравнении с доплер-эхокардиографией. В то же время авторы отмечают большую чувствительность 64-срезового КТ в оценке ДФ [15].

Следует отметить, что все перечисленные исследования, включая настоящее, проведены на относительно небольшом количестве пациентов, имеют значимые ограничения. В связи с этим данная тема нуждается в дальнейшем изучении.

Выводы

Настоящее исследование продемонстрировало наличие некоторых нарушений диастолической функции у пациентов с неизмененными КА и болевым синдромом в грудной клетке. В связи с тем, что по данному вопросу в литературе встречаются единичные и в некоторой степени противоречивые сведения, тема нуждается в дальнейшем изучении.

Литература

- Hogg K, Swedberg K, McMurray J. Heart Failure with preserved left ventricular systolic function. Epidemiology, Clinical Characteristics, and Prognosis. J Am Coll Cardiol. 2004; 43 (3): 317–27.
- Фомин И. В., Беленков Ю. Н., Мареев В. Ю. и др. Распространенность хронической сердечной недостаточности в Европейской части РФ (данные исследования «ЭПОХА — ХСН»). ЖСН, 2006; 3 (7): 112–15.
- Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. J Am Coll Cardiol. 2013; 62: 263–71.
- Taqueti VR, Ridker PM. Inflammation, coronary flow reserve, and microvascular dysfunction: moving beyond cardiac syndrome X. JACC Cardiovasc Imaging. 2013; (6): 668–71.
- Crea F, Merz CNB, Beltrame JF, et al. Coronary Vasomotion Disorders International Study Group. The parallel tales of microvascular angina and heart failure with preserved ejection

- fraction: a paradigm shift. *Eur Heart J*. 2017; (38): 473–77.
6. Wei J, Nelson MD, Szczepaniak EW, et al. Myocardial steatosis as a possible mechanistic link between diastolic dysfunction and coronary microvascular dysfunction in women *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 310 (1): H14–H1.
 7. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016; (37): 2129–200.
 8. Redfield MM. Heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2016; (375): 1868–77.
 9. Van Kraijl DJ, van Pol PE, Ruiters AW, et al. Diagnosing diastolic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2002; 4 (4): 419–30.
 10. Kato S, Saito N, Kirigaya H, et al. Impairment of coronary flow reserve evaluated by phase contrast cine-magnetic resonance imaging in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Heart Assoc*. 2016; (5): e002649.
 11. Srivaratharajah K, Coutinho T, Liu P, et al. Reduced myocardial flow in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 2016; 9 (7): e002562.
 12. Isaaq K, Bruntz JF, Paris D, et al. Abnormal coronary flow velocity pattern in patients with left ventricular hypertrophy, angina pectoris, and normal coronary arteries: A transesophageal Doppler echocardiographic study. *American Heart Journal*. 1994; 128 (3): 500–10.
 13. Kaski JC, Rosano GMC, Collins P, et al. Cardiac syndrome X: clinical characteristics and left ventricular function. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995; (25): 807–14.
 14. Nelson MD, Szczepaniak LS, Weiet J, al. Diastolic Dysfunction in Women With Signs and Symptoms of Ischemia in the Absence of Obstructive Coronary Artery Disease A Hypothesis-Generating Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014; (7): 510–6.
 15. Wu Y, Tadamura E, Yamamuro M, et al. Estimation of global and regional cardiac function using 64-slice computed tomography: a comparison study with echocardiography, gated-SPECT and cardiovascular magnetic resonance. *Int J Cardiol*. 2008; 128 (1): 69–76.

References

1. Hogg K, Swedberg K, McMurray J. Heart Failure with preserved left ventricular systolic function. Epidemiology, Clinical Characteristics, and Prognosis. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43 (3): 317–27.
2. Fomin IV, Belenkov JuN, Mareev Vju, et al. Rasprostranennost' hronicheskoy serdechnoj nedostatochnosti v Evropejskoj chasti RF (dannye issledovaniya «JePOHA – HSN»). *ZhSN*. 2006; 3 (7): 112–5.
3. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62: 263–71.
4. Taqueti VR, Ridker PM. Inflammation, coronary flow reserve, and microvascular dysfunction: moving beyond cardiac syndrome X. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013; (6): 668–71.
5. Crea F, Merz CNB, Beltrame JF, et al. Coronary Vasomotion Disorders International Study Group. The parallel tales of microvascular angina and heart failure with preserved ejection fraction: a paradigm shift. *Eur Heart J*. 2017; (38): 473–77.
6. Wei J, Nelson MD, Szczepaniak EW, et al. Myocardial steatosis as a possible mechanistic link between diastolic dysfunction and coronary microvascular dysfunction in women *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 310 (1): H14–H1.
7. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016; (37): 2129–200.
8. Redfield MM. Heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2016; (375): 1868–77.
9. Van Kraijl DJ, van Pol PE, Ruiters AW, et al. Diagnosing diastolic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2002; 4 (4): 419–30.
10. Kato S, Saito N, Kirigaya H, et al. Impairment of coronary flow reserve evaluated by phase contrast cine-magnetic resonance imaging in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Heart Assoc*. 2016; (5): e002649.
11. Srivaratharajah K, Coutinho T, Liu P, et al. Reduced myocardial flow in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 2016; 9 (7): e002562.
12. Isaaq K, Bruntz JF, Paris D, et al. Abnormal coronary flow velocity pattern in patients with left ventricular hypertrophy, angina pectoris, and normal coronary arteries: A transesophageal Doppler echocardiographic study. *American Heart Journal*. 1994; 128 (3): 500–10.
13. Kaski JC, Rosano GMC, Collins P, et al. Cardiac syndrome X: clinical characteristics and left ventricular function. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995; (25): 807–14.
14. Nelson MD, Szczepaniak LS, Weiet J, al. Diastolic Dysfunction in Women With Signs and Symptoms of Ischemia in the Absence of Obstructive Coronary Artery Disease A Hypothesis-Generating Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014; (7): 510–6.
15. Wu Y, Tadamura E, Yamamuro M, et al. Estimation of global and regional cardiac function using 64-slice computed tomography: a comparison study with echocardiography, gated-SPECT and cardiovascular magnetic resonance. *Int J Cardiol*. 2008; 128 (1): 69–76.

АНАЛИЗ КОРРЕЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ II СТАДИИ

О. А. Радаева¹✉, А. С. Симбирцев²

¹ Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева, Саранск, Россия

² Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) остается наиболее распространенным модифицируемым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний и смерти. Целью исследования было выявить корреляцию содержания цитокинов (интерлейкинов, молекул адгезии, факторов некроза опухоли, роста и др.) в сыворотке периферической крови и частоты осложнений (инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения) в последующие 5 лет у больных ЭАГ II стадии. У 200 пациентов с ЭАГ II стадии с длительностью заболевания 10–14 лет, получавших сопоставимую гипотензивную терапию и показавших целевые уровни АД, с помощью ИФА в сыворотке периферической крови определяли содержание 28 цитокинов (IL1 β , IL1 α , IL1ra, IL18, IL18BP, IL37, IL6, sIL6r, LIF, sLIFr, IGF-1, IGFBP-1, TNF α , sTNF-R1, sVCAM-1, IL17, IL2, IL4, IL10, TGF- β 1, IL8, CX3CL1, CXCL10, INF γ , M-CSF, IL34, VEGF-A, эритропоэтина) и вазоактивных пептидов (NO, iNOS, eNOS, ADMA, SDMA, Nt-proCNP, Nt-proBNP). В течение последующих 5 лет фиксировали случаи развития осложнений. Ретроспективный анализ показал, что для группы с развитием осложнений в последующие 5 лет характерно предварительное снижение уровней IL1ra ($p < 0,001$) и IL10 ($p < 0,001$) на фоне повышения содержания IL1 β ($p < 0,001$), TNF α ($p < 0,001$) и M-CSF ($p < 0,001$) в сыворотке крови при сравнении с группой без осложнений. Многофакторный анализ с включением в регрессионную модель Кокса ряда показателей: IL1 β > 18,8 пг/мл; IL1ra < 511 пг/мл; IL6 > 23,8 пг/мл; IL10 < 26,3 пг/мл; 389 пг/мл < M-CSF < 453 пг/мл; ADMA > 0,86 мкмоль/л; общий холестерин > 4,9 ммоль/л; ЛПНП > 3,0 ммоль/л; ЛПВП у мужчин < 1,0 ммоль/л; у женщин < 1,2 ммоль/л выявил независимый характер «влияния» на повышение частоты повреждения органов-мишеней при ЭАГ II стадии следующих показателей: содержания M-CSF в диапазоне 389–453 пг/мл ($p < 0,001$), а также уровня ЛПНП более 3,0 ммоль/л ($p < 0,01$). Изменение уровня цитокинов является патогенетически обоснованным предиктором повреждения миокарда и головного мозга у больных ЭАГ II стадии, а определение уровня M-CSF в крови может дополнить классические схемы расчета риска развития сердечно-сосудистых осложнений у данной категории больных.

Ключевые слова: цитокины, эссенциальная артериальная гипертензия, инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, колониестимулирующий фактор макрофагов M-CSF

Информация о вкладе авторов: О. А. Радаева — набор группы пациентов, забор материала для исследования, сбор данных, интерпретация результатов исследования, написание и компьютерная подготовка рукописи; А. С. Симбирцев — планирование и разработка методологии исследования, анализ данных, редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом МГУ им. Н. П. Огарева (протокол № 12 от 14 декабря 2008); все пациенты подписали добровольное информированное согласие; получение биологического материала для исследования (кровь) производили с учетом положений Хельсинкской декларации ВМА (2000) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999).

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Александровна Радаева
ул. Ульянова, д. 26а, г. Саранск, 430030; vtlbwbyf_79@mail.ru

Статья получена: 16.07.2018 **Статья принята к печати:** 27.02.2019 **Опубликована онлайн:** 06.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.006

INVESTIGATING A CORRELATION BETWEEN THE LEVELS OF PERIPHERAL BLOOD CYTOKINES AND THE RISK FOR CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH STAGE II ESSENTIAL HYPERTENSION

Radaeva OA¹✉, Simbirtsev AS²

¹ National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

² State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA, St. Petersburg, Russia

Essential hypertension (EH) is one of the most common modifiable risk factors for cardiovascular diseases and death. The aim of this study was to investigate a correlation between the levels of some cytokines (interleukins, adhesion molecules, tumor necrosis and growth factors, etc.) in the peripheral blood of patients with stage II EH and the rate of complications (myocardial infarction, acute cerebrovascular events, and transient ischemic attacks) occurring in a 5-year follow-up period. Twenty-eight cytokines were measured using ELISA, including IL1 β , IL1 α , IL1ra, IL18, IL18BP, IL37, IL6, sIL6r, LIF, sLIFr, IGF-1, IGFBP-1, TNF α , sTNF-R1, sVCAM-1, IL17, IL2, IL4, IL10, TGF- β 1, IL8, CX3CL1, CXCL10, INF γ , M-CSF, IL34, VEGF-A, and erythropoietin, and a few vasoactive peptides, including NO, iNOS, eNOS, ADMA, SDMA, Nt-proCNP, and Nt-proBNP, in the peripheral blood samples of 200 patients with stage II EH who had been suffering from this condition for 10 to 14 years and were receiving comparable therapies to bring their blood pressure down. The patients were followed up for 5 years to keep track of complications. The retrospective analysis revealed that the group of patients who developed complications during the 5-year follow-up period exhibited a decline in the levels of IL1ra ($p < 0.001$) and IL10 ($p < 0.001$) and a rise in IL1 β ($p < 0.001$), TNF α ($p < 0.001$) and M-CSF ($p < 0.001$) in comparison with the group of those who did not develop any complications. The multivariate Cox regression analysis was applied to the following parameters: IL1 β > 18.8 pg/ml; IL1ra < 511 pg/ml; IL6 > 23.8 pg/ml; IL10 < 26.3 pg/ml; 389 pg/ml < M-CSF < 453 pg/ml; ADMA > 0.86 μ mol/L; total cholesterol > 4.9 mmol/L; LDL > 3.0 mmol/L; HDL in men < 1.0 mmol/L; HDL in women < 1.2 mmol/L. The analysis revealed that M-CSF in the range from 389 to 453 pg/ml ($p < 0.001$) and LDL above 3.0 mmol/L ($p < 0.01$) correlated with an increase in the risk for end-organ damage in stage II EH. Changes in the cytokine levels can be regarded as a predictor of myocardial and cerebral damage in patients with stage II EH. Measurement of peripheral blood M-CSF can be included into the classic risk assessment schemes for the cardiovascular complications in the studied cohort of patients.

Keywords: cytokines, essential hypertension, myocardial infarction, stroke, M-CSF

Author contribution: Radaeva OA recruited patients, collected blood samples for the study took medical histories, interpreted the study results, and wrote the manuscript. Simbirtsev AS conceived and planned the study, analyzed the obtained data and revised the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ogariov Mordovian State University (Protocol 12 dated December 12, 2008). All patients gave their informed consent to participate. Blood samples were collected in full compliance with the Declaration of Helsinki (2000) and the Protocol of the Convention on Human Rights and Biomedicine of the Council of Europe (1999).

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Radaeva
Ulianova 26/a, Saransk, 430030; vtlbwbyf_79@mail.ru

Received: 16.07.2018 **Accepted:** 27.02.2019 **Published online:** 06.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.006

Эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) является наиболее распространенным модифицируемым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний и смерти. По некоторым оценкам, во всем мире более 1 млрд взрослых страдают ЭАГ, и к 2025 г. эта цифра возрастет до 1,5 млрд [1]. В течение многих лет считалось, что поражение органов-мишеней является результатом действия повышенного гидростатического давления на стенки сосудов. В настоящее время в ряде исследований [2–10] изучали цитокиновые звенья развития осложнений ЭАГ (инфаркта миокарда (ИМ), острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), транзиторного нарушения мозгового кровообращения (ТНМК)), значимых причинных факторов смертности и заболеваемости среди лиц трудоспособного возраста. Не вызывает сомнения, что повреждение органов-мишеней — конечная точка хронического воспалительного процесса на фоне повышенного АД и атеросклеротического поражения сосудов. Тем не менее остается неясным, имеют ли определенные цитокины (или группы цитокинов) независимое прогностическое значение в отношении долгосрочного риска развития сердечно-сосудистых событий у больных ЭАГ II стадии. Целью исследования было изучить корреляцию содержания в сыворотке периферической крови цитокинов у больных ЭАГ II стадии с частотой развития осложнений (ИМ, ОНМК, ТНМК) в последующие 5 лет наблюдения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Регионального сосудистого центра ГБУЗ РМ «Республиканская клиническая больница № 4», ГБУЗ РМ «Республиканская клиническая больница № 3» и кафедре иммунологии, микробиологии, вирусологии ФГБОУ ВО «НИ МГУ им. Н.П. Огарева» в период 2013–2018 гг. Обследовали 490 больных ЭАГ II стадии, из них 200 пациентов с сопоставимой гипотензивной терапией наблюдали в динамике в течение 5 лет (100 женщин и 100 мужчин, средний возраст пациентов на момент начала исследования — $57,5 \pm 1,2$ года).

Критерии включения пациентов в исследование: ЭАГ II стадии; длительность заболевания 10–14 лет; трудоспособный возраст (женщины до 60 лет, мужчины до 65 лет); сопоставимые схемы базовой терапии после начала исследования (монотерапия ИАПФ или в комбинации с диуретиками); подписание пациентом добровольного информированного согласия. Критерии исключения из исследования: ассоциированные клинические состояния; сахарный диабет I типа; метаболический синдром; аутоиммунные заболевания, аллергические заболевания; симптоматическая артериальная гипертензия; перенесенные за месяц до начала исследования инфекционные и психические заболевания; алкогольная/наркотическая зависимость; отказ пациента от долгосрочного участия в исследовании. С целью определения прогнозируемого потенциала цитокинов в отношении развития ИМ, ОНМК в последующие 5 лет у 200 пациентов с ЭАГ II стадии (100 мужчин и 100 женщин) в сыворотке периферической крови на момент начала исследования определяли содержание IL1 β , IL1 α , IL1ra, IL18, IL18BP, IL37, IL6, sIL6r, LIF, sLIFr, IGF-1, IGFBP-1, TNF α , sTNF-RI, sVCAM-1, IL17, IL2, IL4, IL10, TGF- β 1, IL8, CX3CL1, CXCL10, INF γ , M-CSF, IL34, VEGF-A, эритропоэтина, а также вазоактивных пептидов: NO, iNOS, eNOS, ADMA, SDMA, Nt-proCNP, Nt-proBNP. Выбор цитокинов обоснован лиганд-рецепторным принципом реализации их эффектов — вышеуказанные

цитокины синтезируются клетками сосудистого комплекса и/или органы-мишени обладают рецепторами к ним. Уровень цитокинов сыворотки периферической крови и вазоактивных веществ определяли иммуноферментным методом. В течение последующих 5 лет участников исследования опрашивали по телефону в соответствии с разработанным опросником, фиксировали случаи развития осложнений (ИМ, ОНМК, ТНМК) с последующим сопоставлением с данными амбулаторной карты.

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ *Statistica 8.0 (StatSoft; версия 8.0)*. Нормальность распределения показателей определяли с помощью одновыборочного критерия Колмогорова–Смирнова. Полученные данные представлены в виде среднего арифметического (M), стандартного отклонения (SD) и 75% доверительного интервала для среднего (95% ДИ) при нормальном распределении показателей. Для сравнения основных групп использовали *t*-критерий Стьюдента. Рассчитывали абсолютный и относительный риски развития повреждения органов-мишеней (ИМ, ОНМК, ТНМК) и 95% ДИ с определением чувствительности (Se) и специфичности (Sp). Проводили построение регрессионной модели Кокса с однофакторным и многофакторным анализом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено сопоставление уровней IL1 β , IL1 α , IL1ra, IL37, IL18, IL18BP, IL6, sIL6r, LIF, sLIFr, TNF α , sTNF-RI, sVCAM, IL2, IL8, IL4, IL10, INF γ , IGF-1, IGFBP-1, M-CSF, IL34, VEGF-A, CX3CL1, CXCL10, TGF β 1, IL17A, эритропоэтина в сыворотке периферической крови 200 пациентов с ЭАГ II стадии (на фоне гипотензивной терапии и длительности заболевания 10–14 лет) в зависимости от развития сердечно-сосудистых осложнений в последующие 5 лет наблюдения. Ретроспективный анализ показал предикторное снижение в сыворотке периферической крови содержания IL1ra ($p < 0,001$) и IL10 ($p < 0,001$), повышение концентраций IL1 β ($p < 0,001$), TNF α ($p < 0,001$), M-CSF ($p < 0,001$) в группе пациентов с развившимися в последующие 5 лет наблюдения сердечно-сосудистыми осложнениями (47 пациентов: из них у 20 больных — ИМ, 14 — ОНМК, 13 — ТНМК) при сравнении с группой без осложнений за анализируемый период (табл. 1). При этом значимых различий средних уровней остальных показателей в группах с осложнениями и без осложнений не было выявлено ($p > 0,05$).

Дальнейший интерквартильный анализ распределения числа больных с ЭАГ с развитием осложнений через 6–10 лет наблюдения с учетом уровней в сыворотке крови IL1ra, IL10, IL1 β , IL6, TNF α , M-CSF показал (табл. 2), что при содержании: IL1ra < 513 пг/мл частота развития осложнений в течение последующих 5 лет возросла в 2,24 раза ($p < 0,05$) и составила 45% (Sp — 83%, Se — 41,7%), критерий $\chi^2 = 5,25$ ($p < 0,05$), C = 0,33 (связь средней силы); IL10 $< 26,3$ пг/мл — рост риска в 1,94 раза ($p < 0,05$), 31% (Sp — 54,9%, Se — 66%), критерий $\chi^2 = 6,26$ ($p < 0,05$), C = 0,17 (связь слабая); IL1 β $> 18,7$ пг/мл — риск увеличился в 2,37 раза ($p < 0,05$) и был равен 38% (Sp — 59%, Se — 80%), критерий $\chi^2 = 7,59$ ($p < 0,05$), C = 0,22 (связь средней силы); IL6 $> 23,8$ — увеличение частоты в 1,76 раза ($p < 0,05$) и, соответственно, 30% (Sp — 54%, Se — 63,8%), критерий $\chi^2 = 6,45$ ($p < 0,05$), C = 0,17 (связь слабая). При концентрации M-CSF в сыворотке периферической крови в интервале (389–453) пг/мл на 5-м году исследования частота развития

осложнений (ОНМК, ТНМК, ИМ) в течение последующих 5 лет возросла в 3,87 раза ($p < 0,001$) по сравнению с уровнями < 389 пг/мл и > 453 пг/мл, что составило 62% (Sp — 81,6%, Se — 66%), критерий $\chi^2 = 32,5$ ($p < 0,001$), $C = 0,6$ (связь относительно сильная), уровень этого показателя был наиболее выраженным фактором риска по сравнению с другими цитокинами. Интерквартильное сопоставление распределения числа больных с осложнениями на 6–10-й год наблюдения при ЭАГ с учетом уровней в сыворотке крови TNF α на 5-м году исследования достоверных связей между анализируемыми переменными не выявило.

Проведенный однофакторный анализ (регрессионная модель Кокса) значимости зарегистрированных изменений содержания цитокинов в сыворотке крови больных ЭАГ II стадии (IL1 β $> 18,8$ пг/мл; IL1ra < 511 пг/мл; IL6 $> 23,8$ пг/мл; IL10 $< 26,3$ пг/мл; 389 пг/мл $< M-CSF < 453$ пг/мл) в отношении развития сердечно-сосудистых осложнений в последующие 5 лет подтвердил достоверную связь (табл. 3).

Анализ связей всех изучавшихся показателей с вазоактивными веществами (табл. 4, 5) показал, что цитокины с потенциальной предикторной информативностью в отношении риска развития осложнений у больных с ЭАГ II стадии в последующие 5 лет (IL1ra, IL10, IL1 β , TNF α , M-CSF), по данным нашего исследования, относятся к группе коррелирующих с содержанием в сыворотке периферической крови вазоактивного вещества —

асимметричного диметиларгинина (ADMA). Поэтому при построении регрессионной модели Кокса мы включили ADMA в перечень многофакторного регрессионного анализа для оценки независимости выявленных критериев риска. Это имеет патогенетическое значение и влияет на диагностическую и клиническую ценность зарегистрированных изменений. Концентрация M-CSF в сыворотке периферической крови больных ЭАГ II стадии имеет наибольшую корреляцию с уровнем ADMA. Также в систему многофакторного корреляционного анализа были введены классические факторы риска в соответствии с международными и российскими рекомендациями для определения степени риска развития осложнений при гипертензии. По результатам многофакторного анализа, повышение частоты повреждения органов-мишеней при ЭАГ II стадии в последующий пятилетний период в исследуемой группе было связано с уровнем M-CSF в интервале (389–453) пг/мл ($p < 0,001$) вне зависимости от гендерной принадлежности, а также с классическим фактором риска — уровнем ЛПНП $> 3,0$ ммоль/л ($p < 0,01$) (табл. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным международных исследований, определяются значимые связи между развитием таких осложнений ЭАГ, как

Таблица 1. Уровни цитокинов при ЭАГ II стадии в зависимости от развития осложнений на фоне гипотензивной терапии за последующие 5 лет наблюдения — M (σ)

Уровни цитокинов (пг/мл)	Больные без осложнений $n = 153$	Больные с ЭАГ и осложнениями $n = 47$
IL1 β	14,2 (4,42)	21,3 (3,32)*без осложнений
IL1 α (ж)	12,6 (3,21)	13,2 (2,91)
IL1ra	650 (112)	496 (93)*без осложнений
IL18	360 (64)	393 (87)
IL18BP	6790 (1170)	6440(1620)
IL6	21,7 (4,94)	24,9 (4,41) [^] без осложнений
sIL6r	1889 (323)	1733 (312)
TNF α	20, 2 (4,47)	26,6 (4,5)*без осложнений
sTNF-RI	2598 (680)	2873 (699)
sVCAM-1	577 (101)	591 (90)
IL2	10,6 (3,16)	10,9 (3,02)
IL8	28,7 (6,74)	30,6 (7,16)
IL4	19,8 (4,11)	20,8 (4,05)
IL10	29,3 (6,99)	23,8 (7,17)*без осложнений
IFN γ	18,4 (4,18)	18,1 (4,39)
IL37	93,2 (26,9)	90,1 (24,2)
IL17A	2,5 (0,56)	2,46 (0,49)
LIF (женщины)	7,28 (2,78)	7,76 (2,63)
sLIFr (женщины)	40500 (1120)	42100 (1600)
IGF-1	116000 (32300)	122000 (30800)
M-CSF	352 (88)	456 (69)*без осложнений
IL34	133 (40)	137 (36)
VEGF-A	339 (101)	344 (95)
CX3CL1	510 (105)	542 (120)
CXCL10	17,8 (4,33)	18,9 (3,92)
TGF β 1	21,8 (4,57)	22,1 (4,24)
Неоптерин	8,81 (3,19)	8,23 (2,8)
Эритропоэтин	11,4 (3,64)	16,6 (3,12)*без осложнений

Примечание: [^] — $p < 0,01$; * — $p < 0,001$ при сравнении с группой без осложнений за 5 лет наблюдения.

ОНМК, ИМ, и содержанием в сыворотке периферической крови ряда цитокинов: IL17, IFN γ , TNF α , IL6 [2, 11], sTNF-RI [9], представителей семейства IL1 [12, 13], хемокинов CXC-семейства [6], LIF [14], семейства IL12 [15] и др. Однако на сегодняшний день проведено ограниченное количество длительных исследований на эту тему и проанализирована динамика малого спектра цитокинов. Учитывая малое

число исследований, посвященных роли цитокинов в патогенезе ЭАГ, важно не только изучить динамику того или иного иммунорегуляторного показателя при развитии осложнений. Необходимо определить факторы, сохраняющие статистическую и патогенетическую значимость при введении в патогенетическую модель других цитокинов и классических факторов, рекомендованных

Таблица 2. Отношение изменения уровней IL1ra, IL1 β , IL6, TNF α , M-CSF, IL10 (пг/мл) в сыворотке периферической крови (начало исследования) и частоты развития осложнений (95% ДИ) у больных с ЭАГ (длительность 10–14 лет, гипотензивная терапия) в течение последующих 5 лет

	I квартиль <i>n</i> = 50	II квартиль <i>n</i> = 50	III квартиль <i>n</i> = 50	IV квартиль <i>n</i> = 50
IL1ra	(330–511)	(512–575)	(574–633)	(634–820)
Осложнения (человек)	18	9	10	10
Абсолютный риск (%)	36 [22,7–49,3]	18 [7,35–28,6]	20 [8,91–31]	20 [8,91–31]
	36 [22,7–49,3]			
Отношение рисков	I / II + III + IV квартили: 1,86 [1,13–3,05]*			
IL1 β	(2,95–14,8)	(14,9–8,7)	(18,8–22,5)	(22,6–34,4)
Осложнения (человек)	1	8	18	20
Абсолютный риск (%)	2 [2,43–4,43]	16 [5,84–26,2]	36 [22,7–49,3]	40 [26,4–53,6]
	38 [28,5–47,5]			
Отношение рисков	II / III + IV квартили: 2,37 [1,2–4,7]*			
Отношение рисков	I / II + III + IV квартили: 1,86 [1,13–3,05]*			
IL6	(12,5–20,8)	(20,9–23,7)	(23,8–27,5)	(27,6–36,4)
Осложнения (человек)	8	9	14	16
Абсолютный риск (%)	16 [5,8–26]	18 [7,35–28,6]	28 [15,6–40]	32 [19–45]
	17 [8–22,1]		30 [21–39]	
Отношение рисков	I + II / III + IV квартили: 1,76 [1,04–2,99]*			
TNF α	(10,3–18,3)	(18,6–23,7)	(21,4–24)	(24,1–32,4)
Осложнения (человек)	10	13	12	12
Абсолютный риск (%)	20 [8,9–31]	26 [13,8–38]	24 [12,2–35,8]	24 [12,2–35,8]
Отношение рисков	I / II квартили: 1,3 [0,63–2,69]		II / III + IV квартили: 0,92 [1,04–1,65]	
M-CSF	(138–319)	(320–388)	(389–453)	(454–640)
Пациенты с осложнениями (человек)	0	7	31	9
Абсолютный риск (%)	0	14 [4,42–23,6]	62 [48,5–55,4]	18 [7,55–28,6]
Отношение рисков	II + IV / III квартили: 3,87 [2,35–6,38]* II/IV квартили = 1,28 [0,52–3,18]			
IL10	(5,1–19,9)	(20–26,2)	(26,3–31,5)	(31,6–47,5)
Пациенты с осложнениями (человек)	15	16	8	8
Абсолютный риск (%)	30 [19–45]	32 [15,6–40]	16 [5,84–26,2]	16 [5,84–26,2]
	31 [22–40]		16 [5,84–26,2]	
Отношение рисков	I + II / III + IV квартили: 1,94 [1,13–3,31]*			

Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении абсолютных рисков, если интервал не включает 1.

Таблица 3. Анализ влияния содержания IL1 β , IL1ra, IL6, IL10, M-CSF на частоту развития осложнений (95% ДИ) в течение последующих 5 лет наблюдения у больных с ЭАГ II стадии и регрессионная модель Кокса, однофакторный анализ

Переменные	Beta	Standard	t-value	Exponent Beta	<i>p</i>
IL1 β (> 18,8 пг/мл)	1,99	0,35	5,68	2,37	0,006
IL1ra (< 511 пг/мл)	1,24	0,28	4,43	2,06	0,009
IL6 (> 23,8 пг/мл)	1,27	0,35	3,62	1,89	0,042
IL10 (< 26,3 пг/мл)	1,22	0,27	4,52	1,91	0,007
M-CSF (389–453) пг/мл	2,44	0,25	9,76	3,89	0,0004

Примечание: данные модели Кокса: Beta — коэффициент регрессии; Standard — стандартная ошибка коэффициента регрессии; t-value — значение t-критерия для оценки коэффициента регрессии; Exponent Beta — значения относительного риска, связь с интервалом изменения анализируемого фактора; *p* — уровень значимости.

для расчета риска развития осложнений у данной категории больных. Полученные в ходе исследования данные показали, что изменения содержания в сыворотке периферической крови больных исследуемой группы IL1ra, IL10, IL1β, IL6, M-CSF были связаны с развитием осложнений (ИМ, ОНМК, ТНМК) в последующие 5 лет. Повышение уровней противовоспалительных цитокинов IL1ra, IL10 коррелировало с меньшим числом осложнений. Корреляции уровней остальных анализируемых цитокинов с риском развития осложнений ЭАГ не выявлено. Есть расхождения с некоторыми данными литературы, указывающими на связь LIF, IL1α и др. с частотой осложнений [10, 14]. Это объясняется различиями критериев включения в разные исследования (гендерное соотношение, возраст, сопоставимая гипотензивная терапия, достижение целевых уровней АД и др.) и подчеркивает высокую значимость степени однородности группы наблюдения, влияющую на патогенетическую значимость полученных данных. Важно

отметить, что, по результатам нашего исследования, только цитокины, коррелирующие с содержанием ADMA, являются потенциальными предикторами повреждения органов-мишеней у больных ЭАГ II стадии при длительности патологии 10–14 лет (на фоне гипотензивной терапии). ADMA — метилированный аналог L-аргинина (субстрата для синтеза NO), конкурентно ингибирует функциональную активность eNOS [16], что снижает образование NO и его доступность для вазорелаксации и вазопротекции [17]. Данная патогенетическая цепочка важна, на сегодняшний день многие научные платформы подчеркивают актуальность расширения информации о роли ADMA и SDMA в развитии патологических процессов. В ходе работы определено, что M-CSF является единственным независимым критерием из спектра анализируемых цитокинов, обладающим высокой предикторной информативностью в отношении повышения риска развития ОНМК, ИМ, ТНМК у больных ЭАГ II стадии при длительности патологии 10–14 лет (на

Таблица 4. Корреляционная матрица цитокинов сыворотки периферической крови и вазоактивных веществ при ЭАГ II стадии (длительность 10–14 лет) на фоне гипотензивной терапии

	IL37	LIF	sLIFr	IGF-1	IGFBP-1	M-CSF	IL34	VEGF-A	CX3CL1	CXCL10	TGFβ1	IL17A	Эритропоэтин
AT II	-0,28 <i>p</i> > 0,05	0,51 <i>p</i> < 0,05	-0,36 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	0,29 <i>p</i> > 0,05	0,12 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05
ET-1	-0,41 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,28 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,22 <i>p</i> > 0,05	0,43 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,42 <i>p</i> > 0,05	0,27 <i>p</i> > 0,05	0,35 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05	0,32 <i>p</i> > 0,05
NO	0,69 <i>p</i> < 0,05	0,42 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05	0,18 <i>p</i> > 0,05	0,32 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,39 <i>p</i> > 0,05	0,48 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05
ADMA	-0,32 <i>p</i> > 0,05	0,33 <i>p</i> > 0,05	0,49 <i>p</i> > 0,05	0,28 <i>p</i> > 0,05	0,45 <i>p</i> > 0,05	0,58 <i>p</i> < 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	0,28 <i>p</i> > 0,05	0,22 <i>p</i> > 0,05	0,15 <i>p</i> > 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,32 <i>p</i> > 0,05
SDMA	-0,78 <i>p</i> < 0,001	0,28 <i>p</i> > 0,05	0,45 <i>p</i> > 0,05	0,38 <i>p</i> > 0,05	0,27 <i>p</i> > 0,05	0,52 <i>p</i> < 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,52 <i>p</i> < 0,05	0,5 <i>p</i> < 0,05	0,26 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05
eNOS	0,32 <i>p</i> > 0,05	0,38 <i>p</i> > 0,05	-0,39 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	0,11 <i>p</i> > 0,05	-0,18 <i>p</i> > 0,05	-0,31 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05	0,32 <i>p</i> > 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05
iNOS	-0,41 <i>p</i> > 0,05	0,28 <i>p</i> > 0,05	0,45 <i>p</i> > 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05	0,38 <i>p</i> > 0,05	0,17 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,69 <i>p</i> < 0,01	0,71 <i>p</i> < 0,01	0,34 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05
NT-proCNP	-0,27 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	-0,28 <i>p</i> > 0,05	0,27 <i>p</i> > 0,05	0,37 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	0,25 <i>p</i> > 0,05	0,32 <i>p</i> > 0,05	-0,31 <i>p</i> > 0,05	-0,27 <i>p</i> > 0,05	0,52 <i>p</i> < 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05
NT-proBNP	-0,78 <i>p</i> < 0,01	-0,65 <i>p</i> < 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	0,45 <i>p</i> > 0,05	0,18 <i>p</i> > 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,2 <i>p</i> > 0,05	0,33 <i>p</i> > 0,05	0,27 <i>p</i> > 0,05	0,12 <i>p</i> > 0,05

Примечание: данные представлены в виде коэффициента множественной корреляции, знак указывает направление связи; *p* — уровень значимости.

Таблица 5. Корреляционная матрица цитокинов сыворотки периферической крови и вазоактивных веществ при ЭАГ II стадии (длительность 10–14 лет) на фоне гипотензивной терапии

	IL1β	IL1α	IL1ra	IL18	IL18BP	IL6	sIL6r	TNFα	sTNF-R1	sVCAM-1	IL2	IL8	IL4	IL10	IFNγ
AT II	0,41 <i>p</i> > 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05	-0,19 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	-0,23 <i>p</i> > 0,05	0,43 <i>p</i> > 0,05	0,33 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	0,22 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,18 <i>p</i> > 0,05	0,37 <i>p</i> > 0,05	0,22 <i>p</i> > 0,05	-0,62 <i>p</i> < 0,05	0,16 <i>p</i> > 0,05
ET-1	0,68 <i>p</i> < 0,05	0,65 <i>p</i> < 0,05	-0,62 <i>p</i> < 0,05	0,34 <i>p</i> > 0,05	-0,36 <i>p</i> > 0,05	0,27 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	0,36 <i>p</i> > 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,25 <i>p</i> > 0,05	0,69 <i>p</i> < 0,01	0,24 <i>p</i> > 0,05	-0,36 <i>p</i> > 0,05	0,18 <i>p</i> > 0,05
NO	0,64 <i>p</i> < 0,05	0,46 <i>p</i> > 0,05	0,49 <i>p</i> < 0,05	-0,27 <i>p</i> > 0,05	0,64 <i>p</i> < 0,05	0,49 <i>p</i> > 0,05	0,33 <i>p</i> > 0,05	0,44 <i>p</i> > 0,05	-0,38 <i>p</i> > 0,05	0,25 <i>p</i> > 0,05	0,37 <i>p</i> > 0,05	-0,41 <i>p</i> > 0,05	-0,38 <i>p</i> > 0,05	0,33 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05
ADMA	0,52 <i>p</i> < 0,05	0,4 <i>p</i> > 0,05	-0,58 <i>p</i> < 0,05	0,36 <i>p</i> > 0,05	-0,41 <i>p</i> > 0,05	0,57 <i>p</i> < 0,05	0,25 <i>p</i> > 0,05	0,38 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	0,38 <i>p</i> > 0,05	0,33 <i>p</i> > 0,05	0,27 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	-0,55 <i>p</i> < 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05
SDMA	0,34 <i>p</i> > 0,05	0,29 <i>p</i> > 0,05	-0,16 <i>p</i> > 0,05	0,48 <i>p</i> > 0,05	-0,71 <i>p</i> < 0,01	0,29 <i>p</i> > 0,05	0,23 <i>p</i> > 0,05	0,26 <i>p</i> > 0,05	0,25 <i>p</i> > 0,05	0,43 <i>p</i> > 0,05	0,72 <i>p</i> < 0,01	0,53 <i>p</i> < 0,05	0,25 <i>p</i> > 0,05	-0,23 <i>p</i> > 0,05	0,58 <i>p</i> < 0,05
eNOS	-0,62 <i>p</i> < 0,05	-0,67 <i>p</i> < 0,05	0,51 <i>p</i> < 0,05	0,22 <i>p</i> > 0,05	0,37 <i>p</i> > 0,05	-0,22 <i>p</i> > 0,05	-0,35 <i>p</i> > 0,05	0,4 <i>p</i> > 0,05	0,27 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	-0,13 <i>p</i> > 0,05	-0,31 <i>p</i> > 0,05	0,27 <i>p</i> > 0,05	0,46 <i>p</i> > 0,05	-0,19 <i>p</i> > 0,05
iNOS	0,78 <i>p</i> < 0,01	0,49 <i>p</i> > 0,05	-0,12 <i>p</i> > 0,05	0,36 <i>p</i> > 0,05	-0,39 <i>p</i> > 0,05	0,68 <i>p</i> < 0,05	0,56 <i>p</i> < 0,05	0,42 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	0,62 <i>p</i> < 0,05	0,42 <i>p</i> > 0,05	0,41 <i>p</i> > 0,05	-0,4 <i>p</i> > 0,05	0,52 <i>p</i> < 0,05
NT-proCNP	-0,58 <i>p</i> < 0,05	0,68 <i>p</i> < 0,05	0,13 <i>p</i> > 0,05	0,31 <i>p</i> > 0,05	-0,37 <i>p</i> > 0,05	-0,61 <i>p</i> < 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	0,52 <i>p</i> < 0,05	0,39 <i>p</i> > 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	-0,74 <i>p</i> < 0,01	-0,37 <i>p</i> > 0,05	0,39 <i>p</i> > 0,05	0,29 <i>p</i> > 0,05	-0,64 <i>p</i> < 0,05
NT-proBNP	0,47 <i>p</i> > 0,05	0,29 <i>p</i> > 0,05	-0,31 <i>p</i> > 0,05	0,14 <i>p</i> > 0,05	-0,73 <i>p</i> < 0,01	0,17 <i>p</i> > 0,05	-0,12 <i>p</i> > 0,05	0,51 <i>p</i> < 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	0,32 <i>p</i> > 0,05	0,32 <i>p</i> > 0,05	0,21 <i>p</i> > 0,05	0,24 <i>p</i> > 0,05	-0,22 <i>p</i> > 0,05	0,32 <i>p</i> > 0,05

Примечание: данные представлены в виде коэффициента множественной корреляции, знак указывает направление связи; *p* — уровень значимости.

Таблица 6. Анализ влияния содержания IL1 β , IL1ra, IL6, IL10, M-CSF, ADMA и классических факторов риска на частоту развития осложнений (95% ДИ) в течение последующих 5 лет наблюдения у больных с ЭАГ II стадии; регрессионная модель Кокса; многофакторный анализ

Переменные	Beta	Standard	t-value	Exponent Beta	p
IL1 β (> 18,8 пг/мл)	1,19	0,73	1,63	2,05	0,058
IL1ra (< 511 пг/мл)	1,04	0,62	1,67	1,34	0,067
IL6 (> 23,8 пг/мл)	1,07	0,63	1,69	2,17	0,062
IL10 (< 26,3 пг/мл)	1,06	0,66	1,61	1,32	0,072
M-CSF (389–453) пг/мл	2,17	0,34	6,38	2,53	0,0007
ADMA (> 0,86 мкмоль/л)	1,49	0,77	1,93	2,09	0,068
Общий холестерин > 4,9 ммоль/л	1,18	0,73	1,62	1,63	0,062
ЛПНП > 3,0 ммоль/л	1,88	0,43	4,37	2,28	0,004
ЛПВП у мужчин < 1,0 ммоль/л, у женщин < 1,2 ммоль/л	1,12/1,19	0,71/0,68	1,58	1,38/1,32	0,071/0,069

Примечание: данные модели Кокса; Beta — коэффициент регрессии; Standard — стандартная ошибка коэффициента регрессии; t-value — значение t-критерия для оценки коэффициента регрессии; Exponent Beta — значения относительного риска, связь с интервалом изменения анализируемого фактора; p — уровень значимости.

фоне гипотензивной терапии), в том числе при сравнении с ADMA и классическими факторами риска. Это еще раз подтверждает приоритет цитокина в корреляционной патогенетической модели M-CSF–ADMA с дальнейшим каскадом реакций прогрессирования. Ранее нами были опубликованы данные о прямой корреляции уровня M-CSF > 453 пг/мл и содержания в сыворотке периферической крови VEGF-A, что соотносилось по данным коронарографии с выраженным коллатеральным кровообращением в миокарде и может объяснять снижение частоты ИМ у пациентов с данными характеристиками [18], суммарно влияя на общий риск осложнений. M-CSF через рецептор M-CSFR-1 способен активировать MAP-киназы, которые играют ключевую роль в производстве VEGF-A посредством активации ERK, повышая промоторную активность p38 и JNK, стабилизируя мРНК VEGF-A, при этом данные эффекты дозозависимы [19].

ВЫВОДЫ

В ходе исследования получены данные, доказывающие, что изменения содержания цитокинов в сыворотке периферической крови больных ЭАГ II стадии: IL1 β >

18,8 пг/мл, IL1ra < 511 пг/мл, IL6 > 23,8 пг/мл, IL10 < 26,3 пг/мл, коррелируют с пятилетней частотой развития осложнений (ИМ, ОНМК, ТНМК) у больных ЭАГ II стадии при длительности патологии 10–14 лет (на фоне гипотензивной терапии). При этом только M-CSF в интервале 389–453 пг/мл имеет статистически независимые характеристики в отношении развития кардиальных и цереброваскулярных осложнений. Несмотря на теоретическую значимость полученных результатов, необходимо отметить, что при высокой специфичности (81%) содержания M-CSF в интервале 389–453 пг/мл в сыворотке периферической крови больных ЭАГ II стадии при длительности патологии 10–14 лет (на фоне гипотензивной терапии) в отношении формирования ИМ, ОНМК, ТНМК зарегистрирована относительно низкая чувствительность этого показателя (66%) в рамках предикции осложнений, что требует введения дополнительного критерия, связанного с данным цитокином и повышающего диагностическую (практическую) ценность. Требуется дополнительное изучение роли индивидуальных характеристик, в частности генетического компонента (полиморфных вариантов генотипа CSF1R TC/CA rs386693509: TC/CA) в реализации выявленных связей при прогрессивном течении заболевания.

Литература

- Wenzel U, Turner JE, Krebs C, et al. Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27 (3): 677–86.
- McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end organ damage. *Circ Res.* 2015; 116 (6): 1022–33.
- Bennardo M, Alibhai F, Tsimakouridze E, et al. Day-night dependence of gene expression and inflammatory responses in the remodeling murine heart post-myocardial. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016; 311 (6): 1243–54.
- Ji Q, Cheng G, Ma N, et al. Circulating Th1, Th2, and Th17 Levels in Hypertensive Patients. *Dis Markers* 2017; (2017): 7146290. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2017/7146290>. PubMed PMID: 28757677.
- Nosalski R, McGinnigle E, Siedlinski M, Guzik TJ. Novel Immune Mechanisms in Hypertension and Cardiovascular Risk. *Current Cardiovascular Risk Reports.* 2017; 11 (4): 12. Available from: https://www.researchgate.net/publication/314274524_Novel_Immune_Mechanisms_in_Hypertension_and_Cardiovascular_Risk.
- Rudemiller NP, Crowley SD. The role of chemokines in hypertension and consequent target organ damage. *Pharmacological research.* 2017; (119): 404–11.
- Schwanekamp JA, Lorts A, Sargent MA, et al. TGFB1 functions similar to periostin but is uniquely dispensable during cardiac injury. *PLoS ONE.* 2017; 12 (7). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0181945>.
- Wang P, He Q, Liu C, et al. Functional polymorphism rs3783553 in the 3'-untranslated region of IL-1A increased the risk of ischemic stroke: A case-control study. *Medicine.* 2016; 96 (46). Available from: https://www.researchgate.net/publication/320348816_4-bp_insertiondeletion_rs3783553_polymorphism_within_the_3aposUTR_of_IL1A_contributes_to_the_risk_of_prostate_cancer_in_a_sample_of_Iranian_Population.
- Carlsson AC, Jansson JH, Söderberg S, et al. Levels of soluble tumor necrosis factor receptor 1 and 2, gender, and risk of myocardial infarction in Northern Sweden. *Atherosclerosis.* 2018; (272): 41–6.
- Huang S, Frangogiannis NG. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *Br J Pharmacol.* 2018; 175 (9): 1377–400.
- Itani HA, Harrison DG. Memories that last in hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015; 308 (11): F1197–F1199. DOI: 10.1152/ajprenal.00633.2014.

12. Rucker JA, Crowley SD. The role of macrophages in hypertension and its complications *Pflugers Arch*. 2017; 469 (3–4): 419–30.
13. Hartman MHT, Groot HE, et al. Translational overview of cytokine inhibition in acute myocardial infarction and chronic heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 2018; 28 (6). DOI: 10.1016/j.tcm.2018.02.003. Available from: https://www.researchgate.net/publication/260757993_Heart_Failure.
14. Jia D, Cai M, XiY, et al. Interval exercise training increases LIF expression and prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle atrophy in rats. *Life Sci*. 2018; (193): 77–86.
15. Van der Heijden T, Bot I, Kuiper J. The IL-12 cytokine family in cardiovascular diseases. *Cytokine*. 2017; S1043-4666(17)30315-0. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.10.010.
16. Papageorgiou N, Androulakis E, Papaioannou S, et al. Homoarginine in the shadow of asymmetric dimethylarginine: from nitric oxide to cardiovascular disease. *Amino Acids*. 2015; 47 (9): 1741–50.
17. Shin S, Thapa SK, Fung H-L. Cellular interactions between L-arginine and asymmetric dimethylarginine: Transport and metabolism. *PLoS One*. 2017; 12 (5): e0178710. DOI: 10.1371/journal.pone.0178710.
18. Радаева О. А., Симбирцев А. С. M-CSF, IL-34, VEGF-A как факторы риска развития инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения у больных эссенциальной артериальной гипертензией. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9 (1): 93–101.
19. Lee S, Shi XQ, Fan A et al. Targeting macrophage and microglia activation with colony stimulating factor 1 receptor inhibitor is an effective strategy to treat injury-triggered neuropathic pain. *Mol Pain*. 2018; (14): 1744806918764979. DOI: 10.1177/1744806918764979.

References

1. Wenzel U, Turner JE, Krebs C, et al. Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27 (3): 677–86.
2. McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end organ damage. *Circ Res*. 2015; 116 (6): 1022–33.
3. Bennardo M, Alibhai F, Tsimakouridze E, et al. Day-night dependence of gene expression and inflammatory responses in the remodeling murine heart post-myocardial. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016; 311 (6): 1243–54.
4. Ji Q, Cheng G, Ma N, et al. Circulating Th1, Th2, and Th17 Levels in Hypertensive Patients. *Dis Markers* 2017; (2017): 7146290. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2017/7146290>. PubMed PMID: 28757677.
5. Nosalski R, McGinnigle E, Siedlinski M, Guzik TJ. Novel Immune Mechanisms in Hypertension and Cardiovascular Risk. *Current Cardiovascular Risk Reports*. 2017; 11 (4): 12. Available from: https://www.researchgate.net/publication/314274524_Novel_Immune_Mechanisms_in_Hypertension_and_Cardiovascular_Risk.
6. Rudemiller NP, Crowley SD. The role of chemokines in hypertension and consequent target organ damage. *Pharmacological research*. 2017; (119): 404–11.
7. Schwaneckamp JA, Lorts A, Sargent MA, et al. TGFBI functions similar to periostin but is uniquely dispensable during cardiac injury. *PLoS ONE*. 2017; 12 (7). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0181945>.
8. Wang P, He Q, Liu C, et al. Functional polymorphism rs3783553 in the 3'-untranslated region of IL-1A increased the risk of ischemic stroke: A case-control study. *Medicine*. 2016; 96 (46). Available from: https://www.researchgate.net/publication/320348816_4-bp_insertiondeletion_rs3783553_polymorphism_within_the_3aposUTR_of_IL1A_contributes_to_the_risk_of_prostate_cancer_in_a_sample_of_Iranian_Population.
9. Carlsson AC, Jansson JH, Söderberg S, et al. Levels of soluble tumor necrosis factor receptor 1 and 2, gender, and risk of myocardial infarction in Northern Sweden. *Atherosclerosis*. 2018; (272): 41–6.
10. Huang S, Frangogiannis NG. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *Br J Pharmacol*. 2018; 175 (9): 1377–400.
11. Itani HA, Harrison DG. Memories that last in hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015; 308 (11): F1197–F1199. DOI: 10.1152/ajprenal.00633.2014.
12. Rucker JA, Crowley SD. The role of macrophages in hypertension and its complications *Pflugers Arch*. 2017; 469 (3–4): 419–30.
13. Hartman MHT, Groot HE, et al. Translational overview of cytokine inhibition in acute myocardial infarction and chronic heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 2018; 28 (6). DOI: 10.1016/j.tcm.2018.02.003. Available from: https://www.researchgate.net/publication/260757993_Heart_Failure.
14. Jia D, Cai M, XiY, et al. Interval exercise training increases LIF expression and prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle atrophy in rats. *Life Sci*. 2018; (193): 77–86.
15. Van der Heijden T, Bot I, Kuiper J. The IL-12 cytokine family in cardiovascular diseases. *Cytokine*. 2017; S1043-4666(17)30315-0. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.10.010.
16. Papageorgiou N, Androulakis E, Papaioannou S, et al. Homoarginine in the shadow of asymmetric dimethylarginine: from nitric oxide to cardiovascular disease. *Amino Acids*. 2015; 47 (9): 1741–50.
17. Shin S, Thapa SK, Fung H-L. Cellular interactions between L-arginine and asymmetric dimethylarginine: Transport and metabolism. *PLoS One*. 2017; 12 (5): e0178710. DOI: 10.1371/journal.pone.0178710.
18. Radaeva OA, Simbirtsev AS. M-CSF, IL-34, VEGF-A kak faktory riska razvitiya infarkta miokarda, ostrogo narusheniya mozgovogo krovoobrashheniya u bol'nyh jessencial'noj arterial'noj gipertenziej. *Rossiiskij immunologicheskij zhurnal*. 2015; 9 (1): 93–101.
19. Lee S, Shi XQ, Fan A et al. Targeting macrophage and microglia activation with colony stimulating factor 1 receptor inhibitor is an effective strategy to treat injury-triggered neuropathic pain. *Mol Pain*. 2018; (14): 1744806918764979. DOI: 10.1177/1744806918764979.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНАЦИИ РИБОСОМНОГО И ФАГОВОГО ДИСПЛЕЕВ ДЛЯ БЫСТРОГО ОТБОРА ВЫСОКОАФФИННЫХ VHH-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ АЛЬПАК

Ю. Е. Кравченко, С. В. Иванов, Д. С. Кравченко, Е. И. Фролова, С. П. Чумаков ✉

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

Селекция антител с помощью фагового дисплея предполагает предварительное клонирование репертуара последовательностей, кодирующих антигенсвязывающие участки, в фагмиду, что считается «бутылочным горлышком» метода, ограничивающим итоговое разнообразие библиотек и ведущим к потере слабо представленных вариантов еще до начала процедуры селекции. Отбор в бесклеточных условиях при помощи рибосомного дисплея лишен этого недостатка, однако отличается высокой чувствительностью к артефактам ПЦР и присутствию РНКаз. Целью работы было исследование эффективности сочетания двух методов: проведения предварительной селекции в бесклеточной системе для обогащения исходной библиотеки с последующим клонированием и заключительной селекцией при помощи фагового дисплея. Предполагалось, что такой режим селекции позволит устранить недостатки каждого из методов и повысить эффективность отбора. Для селекции использовали последовательности VHH-антител альпаки, удобные для построения иммунной библиотеки из-за отсутствия VL-доменов. Анализ иммунных библиотек из генов семейств VH3, VHH3 и VH4 показал, что в группах генов VH3 и VH4 доля VHH-антител незначительна, и селекция из комбинированной библиотеки менее эффективна, чем из библиотеки последовательностей семейства VHH3. Мы установили, что комбинация рибосомного и фагового дисплея приводит к более высокому обогащению высокоаффинными фрагментами и позволяет избежать потери исходного разнообразия при клонировании. Комбинированный метод позволил получить большее количество различных высокоаффинных последовательностей, а все протестированные VHH-фрагменты оказались способными специфично распознавать мишень, в том числе в тотальных белковых экстрактах клеточных культур.

Ключевые слова: наноантитела, VHH-антитела, рибосомный дисплей, фаговый дисплей, биопаннинг, PDLIM4

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, уникальный код проекта RFMEFI60716X0156.

Информация о вкладе авторов: Ю. Е. Кравченко выделяла генетический материал альпак, готовила РНК, проводила ИФА; С. В. Иванов конструировал библиотеки VHH-фрагментов антител, проводил селекцию методом фагового дисплея; Д. С. Кравченко нарабатывал белковые препараты, работал с эукариотическими клеточными культурами; Е. И. Фролова планировала исследование, проводила иммунизацию животных, редактировала рукопись; С. П. Чумаков планировал исследование, проводил селекцию методом рибосомного дисплея, анализировал результаты, писал рукопись.

Соблюдение этических стандартов: работу с животными проводили в соответствии с принципами и требованиями Международной лаборатории по уходу за животными и Директивой совета европейских сообществ (86/609/ЕЕС) от 24 ноября 1986 г.

✉ **Для корреспонденции:** Степан Петрович Чумаков
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997; hathkul@gmail.com

Статья получена: 08.12.2018 **Статья принята к печати:** 22.12.2018 **Опубликована онлайн:** 24.02.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.002

COMBINATION OF RIBOSOME AND PHAGE DISPLAY FOR FAST SELECTION OF HIGH AFFINITY VHH ANTIBODY FRAGMENTS

Kravchenko YE, Ivanov SV, Kravchenko DS, Frolova EI, Chumakov SP ✉

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Selection of antibodies using phage display involves the preliminary cloning of the repertoire of sequences encoding antigen-binding domains into phagemid, which is considered the bottleneck of the method, limiting the resulting diversity of libraries and leading to the loss of poorly represented variants before the start of the selection procedure. Selection in cell-free conditions using a ribosomal display is devoid from this drawback, however is highly sensitive to PCR artifacts and the RNase contamination. The aim of the study was to test the efficiency of a combination of both methods, including pre-selection in a cell-free system to enrich the source library, followed by cloning and final selection using phage display. This approach may eliminate the shortcomings of each method and increase the efficiency of selection. For selection, alpaca VHH antibody sequences suitable for building an immune library were used due to the lack of VL domains. Analysis of immune libraries from the genes of the VH3, VHH3 and VH4 families showed that the VHH antibodies share in the VH3 and VH4 gene groups is insignificant, and selection from the combined library is less effective than from the VHH3 family of sequences. We found that the combination of ribosomal and phage displays leads to a higher enrichment of high-affinity fragments and avoids the loss of the original diversity during cloning. The combined method allowed us to obtain a greater number of different high-affinity sequences, and all the tested VHH fragments were able to specifically recognize the target, including the total protein extracts of cell cultures.

Keywords: nanobodies, VHH antibodies, ribosome display, phage display, biopanning, PDLIM4

Funding: the work was funded by MESR, project code RFMEFI60716X0156.

Author contribution: Kravchenko YuE — Alpaca blood collection and processing, RNA extraction, ELISA; Ivanov SV — construction of libraries of VHH-fragments of antibodies, selection by phage display; Kravchenko DS — protein purification, experiments with eucaryotic cell cultures; Frolova EI — research planning, animal immunization, manuscript editing; Chumakov SP — research planning, selection by ribosome display, analysis of the results, writing a manuscript.

Compliance with ethical standards: the work with animals was carried out in accordance with the principles and requirements of the International Animal Care Laboratory and the Council of Europe Directive (86/609 / EEC) of November 24, 1986.

✉ **Correspondence should be addressed:** Stepan P. Chumakov
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997; hathkul@gmail.com

Received: 08.12.2018 **Accepted:** 22.12.2018 **Published online:** 24.02.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.002

Моноклональные антитела, а также их антигенсвязывающие фрагменты — один из важнейших инструментов для проведения биологических исследований, медицинской диагностики и терапии заболеваний. Традиционный способ получения антител путем отбора индивидуальных клонов гибридом отличается трудоемкостью и низкой производительностью. Более эффективные подходы, включающие селекцию *in vitro* из библиотек участков антител, ответственных за взаимодействие с антигеном, упрощают получение антител против заданной мишени и позволяют отбирать варианты антител, обладающие определенными свойствами, например способностью блокировать взаимодействие двух белковых молекул. Среди способов селекции *in vitro* наибольшее распространение получила технология фагового дисплея, позволяющая относительно быстро и с высокой надежностью создавать библиотеки антигенсвязывающих фрагментов антител. Технология основана на получении генетически модифицированных фаговых частиц, экспонирующих на своей поверхности антигенсвязывающие участки антител. Селекция включает инкубирование смеси фаговых частиц с иммобилизованным антигеном. После отмыва и элюирования связавшиеся варианты фаговых частиц разноожируют в перmissive бактериях с последующим отбором индивидуальных вариантов, обладающих наибольшей представленностью в смеси [1]. Одним из недостатков метода является необходимость клонирования репертуара фрагментов, кодирующих антигенсвязывающие участки, в специальную фагмиду и последующего получения пула трансформированных клеток для наработки библиотек фаговых частиц. Этот этап считается «бутылочным горлышком» метода, ограничивающим разнообразие получаемых клонотек. Редкие варианты фрагментов антител могут в результате теряться еще до начала стадии селекции [2]. Другой недостаток обусловлен самой структурой традиционных антител, в которых связывание антигена осуществляется взаимодействием участков, расположенных на разных полипептидных цепях. При создании клонотек вероятность попадания компонентов каждого антигенсвязывающего участка тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина в состав одного одноцепочечного антигенсвязывающего фрагмента scFv крайне мала из-за случайности процесса образования комбинаций. В результате, в получаемой смеси в основном присутствуют неактивные сочетания участков тяжелых и легких цепей, что существенно затрудняет отбор вариантов с требуемыми свойствами.

Для преодоления недостатка, связанного с необходимостью проведения трансформации бактерий, разработаны варианты, основанные на селекции в бесклеточных условиях, в частности, рибосомный дисплей. Такой метод основан на совмещенной бесклеточной системе транскрипции и трансляции, где комплексы, состоящие из транскриптов (мРНК), рибосомы и растущих цепей белка, соответствующих репертуару антигенсвязывающих участков антител, подвергаются аффинной селекции на иммобилизованном антигене. Связавшиеся варианты амплифицируются при помощи ОТ-ПЦР, в результате чего достигается обогащение искомыми вариантами [3]. Хотя исходное разнообразие репертуара при использовании этого метода выше, в ходе селекции довольно велики шансы отбора вариантов антигенсвязывающих участков, обладающих низкой специфичностью узнавания мишени, но имеющих преимущества амплифирования при ПЦР [4]. Можно

предположить, что при сочетании методов рибосомного и фагового дисплея удастся добиться преодоления слабых сторон каждого из подходов и повышения совокупной эффективности отбора. При этом можно предварительно проводить селекцию вариантов в бесклеточной системе, достигая обогащения высокоаффинными вариантами, а затем клонировать получаемый репертуар фрагментов в фагмиду и проводить окончательную селекцию при помощи фагового дисплея.

Животные семейства верблюдовых обладают, помимо антител традиционной структуры, антителами, состоящими только из тяжелых цепей иммуноглобулинов (*variable heavy-heavy*, VHH-антителами) [5]. Этот тип антител образовался в результате мутации в шарнирной области тяжелой цепи, что привело к делеции участка связывания тяжелой и легкой цепей. Для компенсации отсутствия антигенраспознающего участка второй цепи VH-домены таких антител имеют более протяженные участки CDR3, что обеспечивает высокую аффинность и специфичность распознавания антигенов. Антитела такой структуры позволяют получать компактные антигенраспознающие участки. В процессе селекции репертуаров антител *in vitro*, при отсутствии необходимости комбинирования из двух полипептидных цепей, итоговые пулы оказываются лишенными неактивных вариантов. VHH-антитела уже широко используются для проведения *in vitro* селекции методом фагового дисплея, а на их основе создаются продукты для диагностики и терапии заболеваний [6].

Целью работы было получить из иммунной библиотеки альпаки при помощи различных методов VHH-антитела к опухолевому маркеру PDLIM4 и проверить, позволяет ли сочетание рибосомного и фагового дисплея повысить эффективность отбора последовательностей антигенсвязывающих фрагментов, обладающих высокой аффинностью и специфичностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Иммунизация животного

Источником биологического материала (крови) служило животное альпака (*Vicugna pacos*) семейства верблюдовых. В качестве антигена использовали очищенный белок PDLIM4 в количестве 700 мкг, растворенный в полном (для первичной иммунизации) или неполном (для повторных иммунизаций) адъюванте Фрейнда (*Pierce*; CSHA) согласно протоколу производителя. Иммунизацию альпаки проводили в три этапа (первичная и две повторных, с интервалом в 3 недели) посредством введения препарата внутримышечно в бедро животного. Спустя 4 недели после последней иммунизации производили забор венозной крови в количестве 100 мл. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) получали из свежезабранной гепаринизированной крови альпаки с помощью центрифугирования с раствором фиколла плотностью 1,077 (ПанЭко; Россия) согласно стандартному протоколу.

Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР

Образец тотальной РНК получали из клеток PBMC с помощью реагента ExtractRNA (Евроген; Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Целевые молекулы мРНК, кодирующие VHH-фрагменты, использовали для приготовления кДНК с праймером

CH2-IgG-sp rev (таблица) с использованием набора реагентов ProtoScript (NEB; США). Дальнейшую амплификацию проводили с использованием высокоточной полимеразы Tersus (Евроген; Россия) и праймеров AlpVHH3 uni fwd, AlpVH4 uni fwd, AlpVH3 uni fwd, AlpVHH-R1 и AlpVHH-R2 для создания библиотеки, содержащей гены семейств VH3, VHH3 и VH4, либо с помощью праймеров AlpVHH3 uni fwd, AlpVHH-R1 и AlpVHH-R2 для создания библиотеки, содержащей только гены семейства VHH3 (таблица).

Получение экспрессионных конструкций для селекции методом рибосомного дисплея

Конструкции для рибосомного дисплея получали в реакции бридж-ПЦР в смеси с предварительно амплифицированным с праймерами Flag-Ck (CGGATCCGGATTACAAGGACGACGACGATAAGACTGTGGCTGCACC) и Ck/for 4 (AACACTCTCCCCTGTTGAAGCT) фрагментом гена Ck с использованием концевых праймеров RD1x (GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAACAGACCACCATGTCTAG) и Ck/for 4. Полноразмерные конструкции выделяли из агарозного геля при помощи набора реагентов Cleanup standard (Евроген; Россия) и использовали для проведения селекции методом рибосомного дисплея.

Получение фагмидной библиотеки для селекции методом фагового дисплея

Фагмидную библиотеку получали при помощи клонирования амплифицированных последовательностей VHH в модифицированную фагмиду pHEN2-XB, содержащую рестриктные сайты XbaI и BamHI между последовательностями сигнала периплазматической локализации PelB и эпитопа с-Мус по указанным рестриктным сайтам, с использованием эндонуклеаз XbaI и BamHI-HF (NEB; США) и T4 DNA Ligase (NEB; США). Трансформации подвергали клетки штамма TG-1 при помощи электропоратора Genepulser (Bio-Rad; США).

Селекция методом рибосомного дисплея

Селекцию проводили согласно описанной ранее методике [7]. В общих словах, использовали набор для *in vitro* транскрипции-трансляции TNT T7 Quick for PCR (Promega; США), на реакцию брали по 20 мкл смеси и 100 нг экспрессионных конструкторов. Мишень (фрагмент PDLIM4, аминокислоты 111–224, соответствующие линкерной области между доменами LIM и PDZ) была иммобилизована за С-концевой биотин на гидрофильных стрептавидиновых магнитных микросферах, конъюгированных со стрептавидином (NEB; США) в количестве 100 нг на 5 мкл микросфер, в качестве мишени для контрселекции

выступали микросферы, обработанные биотином. Восстановление полноразмерных экспрессионных конструкций после селекции проводили с использованием набора реагентов OneTaq Onestep RT-PCR kit (NEB; США) и полимеразы HSTaq (Евроген; Россия) с использованием праймеров RD1x, RT1 (ACTTCGCAGGCGTAGAC) и Kc/for 9 (AACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCCCTGATGGGTGACTTCGCAGGCGTAGACTT TG). Клонирование прошедших селекцию конструкций осуществляли непосредственно после стадии ОТ-ПЦР по рестриктным сайтам XbaI и BamHI.

Селекция методом фагового дисплея

Селекцию проводили согласно опубликованному протоколу [8] с использованием антигена, иммобилизованного в соответствии с данным выше описанием и без проведения предварительной контрселекции.

Наработка растворимых форм VHH-фрагментов антител

Индивидуальные клоны клеток штамма TG-1, выявленные после селекции, использовали для получения препаратов бактериофага, которыми затем трансдуцировали клетки линии HB-2151, культивированные в среде M9. Трансдуцированные культуры выращивали на твердой среде в присутствии ампициллина, после чего индивидуальные колонии использовали для получения растворимого белка в жидкой среде в соответствии с описанным ранее протоколом [9]. Очистку проводили с использованием Ni-NTA magbeads (Cube Biotech; Германия) согласно рекомендациям производителя.

Оценка обогащения библиотек в ходе рибосомного и фагового дисплея

Для фагового дисплея оценку производили в соответствии с опубликованным ранее протоколом [8]. Лунки иммунологического планшета с сорбированным PDLIM4 (111–224 а. о.) либо бычьим сывороточным альбумином (контроль) обрабатывали препаратами экспонирующих VHH-фрагменты фаговых частиц, полученными после каждого раунда селекции. Детекцию производили с использованием меченых пероксидазой хрена антител к фагу M13 (Sino Biological; Китай; кат. 11973-MM05T-H). Для селекции методом рибосомного дисплея вместо фаговых частиц брали смеси комплексов мРНК-рибосома-белок, полученные при помощи набора для *in vitro* транскрипции-трансляции TNT T7 Quick for PCR (Promega; США). Детекцию осуществляли с использованием антител к эпитопу Flag, меченых пероксидазой хрена (Proteintech; США; кат. HRP-66008).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для амплификации VHH-фрагментов

AlpVHH3 uni fwd	GAACAGACCACCATGTCTAGASAGKTGCAGSTSGTRGAGTCTGKGGGAGG
AlpVH4 uni fwd	GAACAGACCACCATGTCTAGASAGGTGCAGSKGCAGGAGTCGGGCCAGGC
AlpVH3 uni fwd	GAACAGACCACCATGTCTAGASARKTGCRRTSGTRGAGWCYKGGGRRG
AlpVHH-R2	CCTTGAATCCGGATCCGGTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG
AlpVHH-R1	CCTTGAATCCGGATCCGGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG
CH2-IgG-sp rev	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

Оценка связывающей способности индивидуальных вариантов VHH-фрагментов антител

Поверхность лунок иммунологического планшета покрывали PDLIM4 либо тотальными белковыми экстрактами, полученными из клеточных линий MBA-MB-231 и T47D в соответствии со стандартными протоколами, в количестве 10 мкг клеточного экстракта на лунку. Далее лунки обрабатывали очищенными препаратами VHH-фрагментов, полученными согласно вышеописанной процедуре; детекцию проводили с использованием биотинилированных антител к эпитопу Мус (СайСторЛаб; Россия; кат. PSM003BN-100) и стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (R&D Systems; США; кат. DY998). Для получения статистически достоверных результатов каждую реакцию воспроизводили в трех независимых повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Многие работы, посвященные отбору VHH-фрагментов к различным мишеням, основаны на использовании разработанного более 15 лет назад набора праймеров для амплификации последовательностей VHH [10]. С тех пор локус VHH3 генома альпаки и ламы был проанализирован с помощью глубокого секвенирования и определены последовательности всех входящих в него генов [11]. Кроме того, получена информация, что некоторые гены локусов VH4 и VH3 также могут быть использованы для формирования зрелых VHH-антител. Мы собрали все известные последовательности генов VH3, VHH3 и VH4 и составили на их основе набор праймеров для амплификации всех членов каждого из семейств генов (таблица). В качестве обратных праймеров мы использовали хорошо зарекомендовавшие себя последовательности, соответствующие уникальным шарнирным областям VHH-антител. Каждый вариант праймеров был проверен тестовой реакцией ПЦР на

кДНК альпаки), полученной с использованием праймера на область CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина, которая является общей для VHH-антител и антител традиционной структуры. Секвенирование индивидуальных клонов показало, что каждый из вариантов праймеров специфично амплифицирует варианты последовательностей, относящиеся к соответствующему семейству.

Каждая дополнительная стадия амплификации библиотеки VHH-фрагментов приводит к изменению представленности вариантов и вымыванию из нее редких последовательностей. Чтобы избежать снижения качества библиотек при комбинировании рибосомного и фагового дисплея мы модифицировали фагмиду pHEN2 и ввели в праймеры для создания конструкторов рибосомного дисплея рестриктивные сайты, что позволило напрямую клонировать библиотеку VHH-фрагментов в фагмиду (рис. 1).

Для того чтобы проверить, может ли комбинирование двух методов селекции приводить к увеличению ее эффективности, из общей исходной кДНК альпаки было сконструировано две библиотеки VHH-фрагментов: библиотека 1 состояла исключительно из последовательностей, относящихся к семейству VHH3, библиотека 2 состояла из последовательностей, входящих в семейства VH3, VHH3 и VH4. Каждая библиотека была клонирована в фагмиду, а также использована для получения линейного конструктора для селекции в бесклеточной системе. Фаговые библиотеки были подвергнуты трем раундам селекции, а библиотеки линейных конструкторов после первого раунда селекции методом рибосомного дисплея были разделены на две части: одну подвергли еще двум раундам селекции, а вторую клонировали в фагмиду и селектировали методом фагового дисплея. После каждого раунда у каждой из библиотек была оценена степень обогащения аффинными фрагментами при помощи прямого иммуноферментного анализа (ИФА) против отрицательного контроля — бычьего сывороточного альбумина, и мишени — линкерной области белка PDLIM4. Соотношения сигналов,

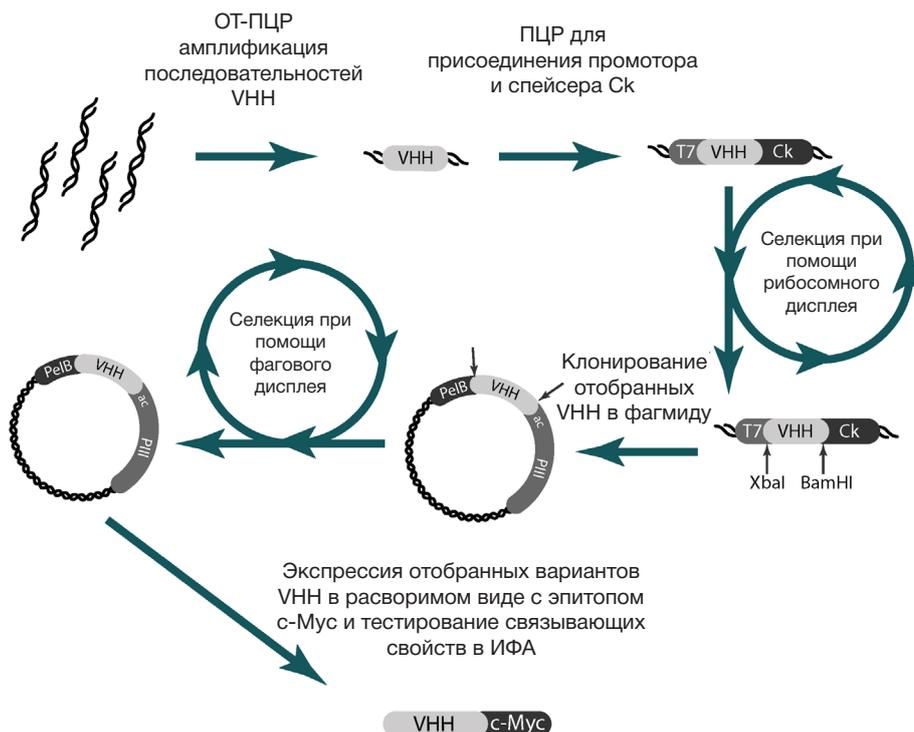


Рис. 1. Схема проведения селекции с последовательным использованием методов рибосомного и фагового дисплея

полученных в реакциях опыт/контроль, использовали для оценки представленности в библиотеке целевых VHH-последовательностей (рис. 2).

Результаты сравнения показали, что библиотека, состоящая исключительно из последовательностей семейства VHH3, демонстрировала большие темпы обогащения аффинными вариантами во всех трех режимах селекции. На основании этого можно сделать вывод, что семейства VHH3 и VHH4 не вносят существенный вклад в формирование разнообразия одноцепочечных VHH-антител, и их включение в итоговую библиотеку нецелесообразно. Если сравнивать эффективность селекции различными методами из библиотеки последовательностей семейства VHH3, то селекция в рибосомном дисплее оказалась гораздо менее эффективной, чем в фаговом. В среднем, обогащение от раунда к раунду составляло 26,45% для рибосомного и 220,4% для фагового дисплея. При этом использование сочетания методов селекции позволило повысить среднее обогащение до 355%.

После трех раундов селекции методом фагового дисплея и комбинированным методом из итоговых обогащенных библиотек было выделено и проанализировано по 35 индивидуальных клонов. Вопреки ожиданиям, разнообразие вариантов в итоговой библиотеке после комбинированной селекции было выше, чем после селекции методом фагового дисплея — было обнаружено 18 различных типов последовательностей, в то время как при фаговой селекции всего 11.

Для оценки того, насколько отобранные последовательности VHH-фрагментов способны специфично и аффинно взаимодействовать с мишенью, пять наиболее представленных вариантов полученных после

комбинированной селекции были экспрессированы в виде мономеров в штамме HB-2151, очищены при помощи аффинной хроматографии и протестированы методом ИФА. В качестве мишени были использованы препарат антигена PDLIM4 (центральная часть белка, уникальная для этого члена семейства PDLIM) либо суммарные белковые фракции клеточных линий MDA-MB-231 и T47D, характеризующихся нормальным и нокаутным статусом гена PDLIM4 [12] соответственно (рис. 3).

Результаты эксперимента показали, что все пять вариантов VHH-фрагментов способны специфично связывать белок PDLIM4. Вариант VHH-R53 обладал максимальной специфичностью в опыте с очищенным белком PDLIM4, но при этом достаточно интенсивно окрашивал PDLIM4-негативный образец белковой фракции из клеток T47D. Вариант VHH-R08 обладал несколько худшей специфичностью относительно очищенного белкового препарата, но демонстрировал наибольшую разницу сигналов в опытах с суммарными белковыми фракциями.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Независимо от использованного способа селекции, нами наблюдались различия в динамике обогащения функционально-активными фрагментами. Можно предположить, что доля VHH-антител для семейств генов VHH3 и VHH4 незначительна и что комбинированная библиотека может содержать большое количество неполноценных вариантов VHH-фрагментов, которые могли бы специфично связывать антиген только в паре с VL-фрагментом, и затрудняющих селекцию. Возможно, некоторые задачи могут потребовать использования такой

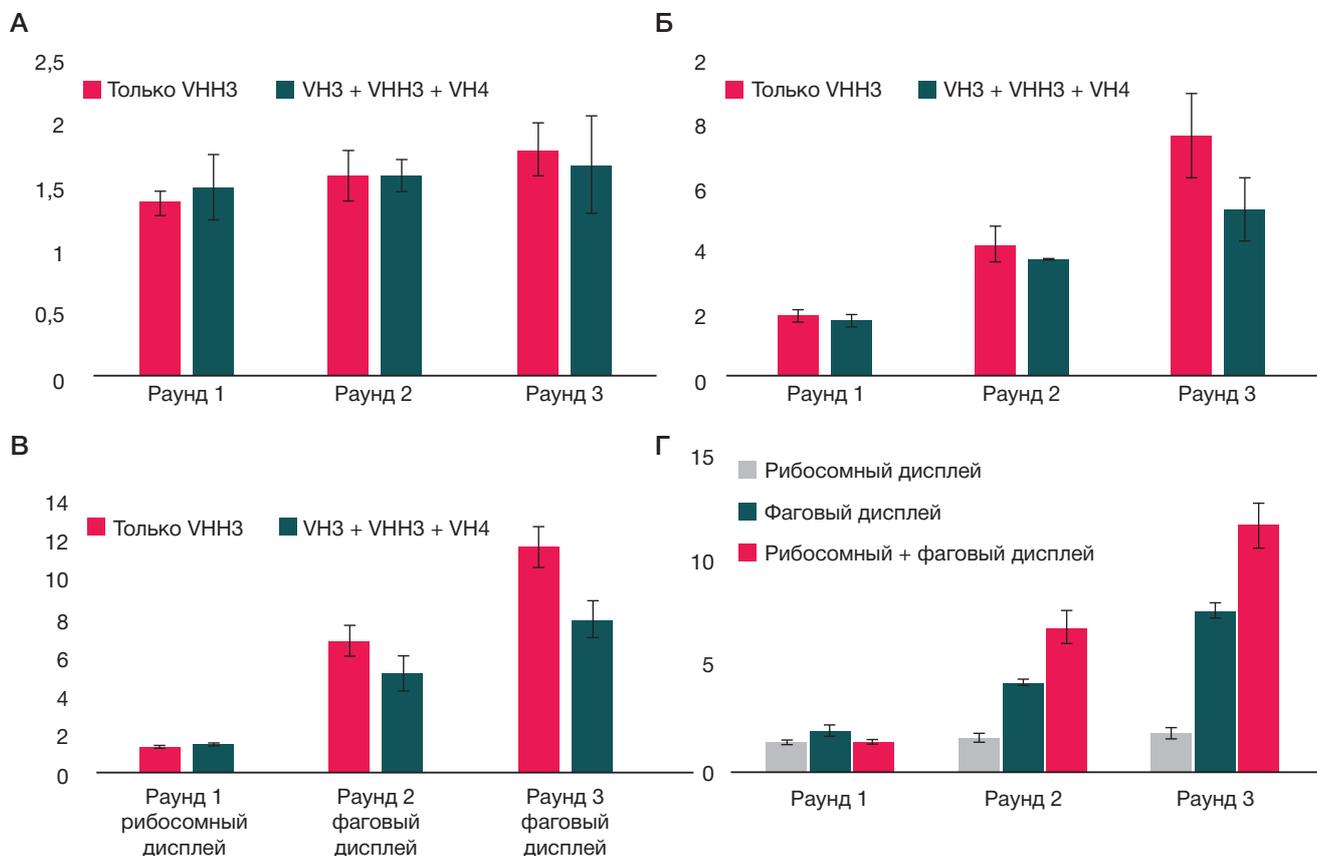


Рис. 2. Обогащение библиотек VHH-фрагментов в ходе селекции методом рибосомного дисплея (А); методом фагового дисплея (Б); при комбинировании рибосомного и фагового дисплея (В). Сравнение обогащения всеми тремя методами для библиотеки VHH3 (Г)

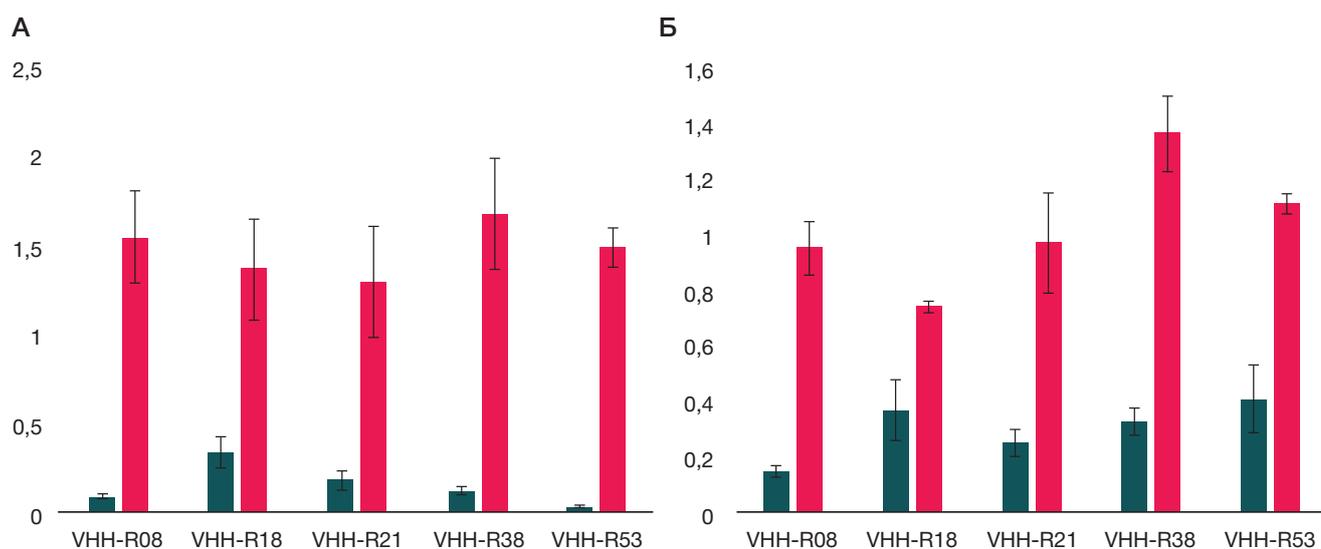


Рис. 3. Сравнение способности пяти отобранных вариантов VHH-фрагментов специфически окрашивать PDLIM4 в реакции ИФА

комбинации вариантов. Например, поскольку каркасная структура антител VHH-семейства альпак чрезвычайно близка по структуре антителам человека, такие антитела хорошо подходят для дальнейшей гуманизации [13]. Однако для рутинной селекции предпочтительно использование библиотеки, содержащей только члены семейства VHH3.

Относительно низкая эффективность селекции при использовании рибосомного дисплея может быть обусловлена двумя факторами: использованием слишком мягких условий, препятствующих удалению низкоаффинных последовательностей, либо систематической кросс-контаминацией библиотек ДНК-фрагментами, не полностью удаленными на стадии приготовления функциональных единиц библиотеки. При этом следует иметь в виду, что использование более жестких условий селекции и удаления ДНК может приводить к разрушению целевых комплексов мРНК-рибосома-белок. Представляется, что дальнейшая оптимизация условий данного метода селекции может повысить эффективность отбора, однако вряд ли качественно улучшит результат. Любопытно, что хотя при комбинированном методе селекции эффективность первого раунда, использовавшего рибосомный дисплей, была относительно низка (37% обогащения против 97% в первом раунде фагового дисплея), итоговая эффективность комбинированной селекции оказалась улучшенной. Вероятно, такая комбинация позволила повысить представленность перспективных вариантов VHH-фрагментов на стадии клонирования библиотеки в фагмиду, тогда как «паразитные» последовательности, сохранявшиеся от раунда к раунду при селекции в рибосомном дисплее, подвергались удалению в ходе последующего раунда фагового дисплея. В результате комбинированный метод селекции приводил к устранению характерного для метода фагового дисплея «бутылочного горлышка». В пользу этого также говорит большее

разнообразие вариантов VHH-фрагментов, обнаруженное в результате комбинированной селекции.

Отобранные нами варианты VHH-фрагментов демонстрировали высокую специфичность в отношении белка PDLIM4 в опытах *in vitro*. Однако в экспериментах с тотальными белковыми фракциями клеток некоторые варианты, по-видимому, были способны связываться и с другими белками семейства PDLIM. С точки зрения использования для определения статуса внутриклеточного PDLIM4, наибольший интерес представляет отобранный вариант VHH-R08, для которого неспецифическое связывание оказалось минимальным.

Можно заключить, что разработанные условия комбинирования методов селекции позволяют добиться лучших результатов без повышения трудозатрат и времени отбора, а также необходимости внесения дополнительных стадий амплификации при получении клонотек.

Выводы

Успешно протестирована новая система праймеров для амплификации всех членов семейства VHH3 и создания библиотек фрагментов VHH-антител для проведения комбинированной селекции методом рибосомного и фагового дисплея. Сравнение эффективности селекции показало, что комбинированный метод позволяет добиться большего обогащения библиотеки высокоаффинными фрагментами и уменьшить потерю исходного разнообразия репертуара при клонировании в фагмидный вектор. Селекцией комбинированным методом удалось получить большее количество вариантов высокоаффинных последовательностей, причем все VHH-фрагменты, подвергнутые индивидуальному тестированию, оказались способными специфически распознавать мишень (фрагмент белка PDLIM4) в реакциях как с очищенным препаратом белка, так и с суммарными белковыми фракциями клеток.

Литература

1. Carmen S, Jermutus L. Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2002; 1 (2): 189–203. PubMed PMID: 15239904.
2. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display

- library. *Nat Biotechnol.* 1996; 14 (3): 309–14. DOI: 10.1038/nbt0396-309. PubMed PMID: 9630891.
3. He M, Khan F. Ribosome display: next-generation display technologies for production of antibodies in vitro. *Expert Rev Proteomics.* 2005; 2 (3): 421–30. Epub 2005/07/08. DOI: 10.1586/14789450.2.3.421. PubMed PMID: 16000087.
 4. Ponsel D, Neugebauer J, Ladetzki-Baehs K, Tissot K. High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation. *Molecules.* 2011; 16 (5): 3675–700. Epub 2011/05/05. DOI: 10.3390/molecules16053675 [pii]. PubMed PMID: 21540796.
 5. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaler A, Shoemaker CB. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods.* 2007; 324 (1–2): 13–25. Epub 2007/06/15. DOI: S0022-1759(07)00119-6 [pii]. 10.1016/j.jim.2007.04.008. PubMed PMID: 17568607.
 6. Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009; 10 (11): 1212–24. Epub 2009/10/31. PubMed PMID: 19876789.
 7. He M, Taussig MJ. Eukaryotic ribosome display with in situ DNA recovery. *Nat Methods.* 2007; 4 (3): 281–8. DOI: 10.1038/nmeth1001. PubMed PMID: 17327849.
 8. Benhar I, Reiter Y. Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr Protoc Immunol.* 2002; Chapter 10: Unit 10 9B. DOI: 10.1002/0471142735.im1019bs48. PubMed PMID: 18432867.
 9. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005; 41 (1): 207–34. PubMed PMID: 15915565.
 10. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol.* 2000; 37 (10): 579–90. PubMed PMID: 11163394.
 11. Avila F, Baily MP, Perelman P, Das PJ, Pontius J, Chowdhary R, et al. A comprehensive whole-genome integrated cytogenetic map for the alpaca (*Lama pacos*). *Cytogenet Genome Res.* 2014; 144 (3): 196–207. DOI: 10.1159/000370329. PubMed PMID: 25662411.
 12. Grigoriadis A, Mackay A, Noel E, Wu PJ, Natrajan R, Frankum J, et al. Molecular characterisation of cell line models for triple-negative breast cancers. *BMC Genomics.* 2012; (13): 619. DOI: 10.1186/1471-2164-13-619. PubMed PMID: 23151021.
 13. Deschacht N, De Groeve K, Vincke C, Raes G, De Baetselier P, Muyldermans S. A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *J Immunol.* 2010; 184 (10): 5696–704. DOI: 10.4049/jimmunol.0903722. PubMed PMID: 20404276.

References

1. Carmen S, Jermutus L. Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2002; 1 (2): 189–203. PubMed PMID: 15239904.
2. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol.* 1996; 14 (3): 309–14. DOI: 10.1038/nbt0396-309. PubMed PMID: 9630891.
3. He M, Khan F. Ribosome display: next-generation display technologies for production of antibodies in vitro. *Expert Rev Proteomics.* 2005; 2 (3): 421–30. Epub 2005/07/08. DOI: 10.1586/14789450.2.3.421. PubMed PMID: 16000087.
4. Ponsel D, Neugebauer J, Ladetzki-Baehs K, Tissot K. High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation. *Molecules.* 2011; 16 (5): 3675–700. Epub 2011/05/05. DOI: 10.3390/molecules16053675 [pii]. PubMed PMID: 21540796.
5. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaler A, Shoemaker CB. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods.* 2007; 324 (1–2): 13–25. Epub 2007/06/15. DOI: S0022-1759(07)00119-6 [pii]. 10.1016/j.jim.2007.04.008. PubMed PMID: 17568607.
6. Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009; 10 (11): 1212–24. Epub 2009/10/31. PubMed PMID: 19876789.
7. He M, Taussig MJ. Eukaryotic ribosome display with in situ DNA recovery. *Nat Methods.* 2007; 4 (3): 281–8. DOI: 10.1038/nmeth1001. PubMed PMID: 17327849.
8. Benhar I, Reiter Y. Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr Protoc Immunol.* 2002; Chapter 10: Unit 10 9B. DOI: 10.1002/0471142735.im1019bs48. PubMed PMID: 18432867.
9. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005; 41 (1): 207–34. PubMed PMID: 15915565.
10. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol.* 2000; 37 (10): 579–90. PubMed PMID: 11163394.
11. Avila F, Baily MP, Perelman P, Das PJ, Pontius J, Chowdhary R, et al. A comprehensive whole-genome integrated cytogenetic map for the alpaca (*Lama pacos*). *Cytogenet Genome Res.* 2014; 144 (3): 196–207. DOI: 10.1159/000370329. PubMed PMID: 25662411.
12. Grigoriadis A, Mackay A, Noel E, Wu PJ, Natrajan R, Frankum J, et al. Molecular characterisation of cell line models for triple-negative breast cancers. *BMC Genomics.* 2012; (13): 619. DOI: 10.1186/1471-2164-13-619. PubMed PMID: 23151021.
13. Deschacht N, De Groeve K, Vincke C, Raes G, De Baetselier P, Muyldermans S. A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *J Immunol.* 2010; 184 (10): 5696–704. DOI: 10.4049/jimmunol.0903722. PubMed PMID: 20404276.

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИИ SER450LEU В ГЕНЕ *RPOB* *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* МЕТОДОМ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕВОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

М. Л. Филипенко¹✉, И. П. Оскорбин¹, Е. А. Храпов¹, Д. В. Шамовская¹, А. Г. Чередниченко², Я. Ш. Шварц²

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза, Новосибирск, Россия

Для выявления генетических мутаций широко используют достаточно трудоемкий и дорогостоящий метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Целью работы было оценить возможность применения двух схем метода аллель-специфичной изотермической петлевой амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) для выявления мутации TCG/TTG (S450L) в гене *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis*. Использовали 48 клинических изолятов *M. tuberculosis* и 11 образцов мокроты, выбранных случайным образом и полученных в микробиологической лаборатории г. Новосибирска от пациентов с впервые выявленным заболеванием. Показано, что применение схемы анализа с использованием аллель-специфичного праймера FIP по сравнению с F3 имеет лучшую разрешающую способность: разница между временем амплификации мутации и аллеля дикого типа составила $22 \pm 2,4$ против $13 \pm 4,1$ мин ($p = 0,0011$). При использовании 100 геном-эквивалентов ДНК истинно положительный сигнал (амплификация гена *rpoB* с мутацией при использовании соответствующего аллель-специфичного праймера) детектировался после $29,4 \pm 3,4$ мин. Положительный сигнал визуализировался после добавления в реакцию SYBR Green I, как при освещении дневным светом, так и при использовании трансиллюминатора с УФ-излучением. С помощью разработанного нами метода была проанализирована выборка ДНК 20 RIF^R изолятов *M. tuberculosis*, несущих мутацию Ser450Leu в гене *rpoB*, 10 RIF^S изолятов, несущих другие мутации в гене *rpoB*, а также 18 RIF^S изолятов без мутаций; наличие мутаций в образцах было определено с помощью классического секвенирования по Сенгеру. Чувствительность и специфичность LAMP для выявления мутации Ser450Leu в гене *rpoB* составили 100%. Данный подход позволяет использовать в качестве ДНК грубые лизаты микобактерий, что сокращает тотальное время анализа до 1,5 ч.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, лекарственная устойчивость, мутации, рифампицин, ген *rpoB*, изотермическая петлевая амплификация, LAMP

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке проекта базового бюджетного финансирования № VI.62.1.5 «Синтетическая биология: разработка средств манипуляции генетическим материалом и создание перспективных препаратов для терапии и диагностики» (0309-2018-0003).

Информация о вкладе авторов: М. Л. Филипенко — общий замысел работы, планирование экспериментов, анализ результатов экспериментов, написание статьи; И. П. Оскорбин — написание статьи; Е. А. Храпов — проведение экспериментов; Д. В. Шамовская — проведение экспериментов; А. Г. Чередниченко — анализ результатов экспериментов; Я. Ш. Шварц — планирование и анализ результатов экспериментов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено комитетом по медицинской этике Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 4 от 9 апреля 2009 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Максим Леонидович Филипенко
пр. академика Лаврентьева, д. 8/2, г. Новосибирск, 630090; mfilipenko@gmail.com

Статья получена: 07.12.2018 Статья принята к печати: 25.02.2019 Опубликовано онлайн: 09.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.007

DETECTION OF SER450LEU MUTATION IN *RPOB* GENE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY ALLELE-SPECIFIC LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL DNA AMPLIFICATION METHOD

Filipenko ML¹✉, Oscorbin IP¹, Khrapov EA¹, Shamovskaya DV¹, Cherednichenko AG², Shvartz YaSh²

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

To identify genetic mutations a rather time-consuming and expensive method of polymerase chain reaction (PCR) is widely used. The aim of the present work was to evaluate the possibility of using the two schemes of the method of allele-specific isothermal loop amplification (LAMP) to detect the TCG/TTG (S450L) mutation in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. 48 clinical isolates of *M. tuberculosis* and 11 samples of sputum were used, randomized and obtained in the microbiological laboratory of the city of Novosibirsk from incident patients. It is shown that the use of an analysis scheme using the allele-specific primer FIP compared to F3 has the best resolution: the difference between the amplification time of the mutation and the wild type allele was $22 \pm 2,4$ versus $13 \pm 4,1$ minutes ($p = 0,0011$). When using 100 DNA genomic equivalents a true positive signal (amplification of the *rpoB* gene with a mutation using the corresponding allele-specific primer) was detected after $29,4 \pm 3,4$ minutes. A positive signal was visualized after adding SYBR Green I to the reaction, both when illuminated with daylight and when using a UV transilluminator. Using the developed method the DNA sample of 20 RIF^R isolates from *M. tuberculosis* was analyzed containing the Ser450Leu mutation in the *rpoB* gene, 10 RIF^S isolates containing other mutations in the *rpoB* gene and 18 RIF^S isolates without any mutations; the presence of mutations in the samples was determined using classical Sanger sequencing. The sensitivity and specificity of LAMP for detecting a Ser450Leu mutation in the *rpoB* gene was 100%. This approach allows the use of crude lysates of mycobacteria as DNA, which reduces the total analysis time to 1,5 hour.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, rifampicin, *rpoB* gene, isothermal loop amplification, LAMP

Funding: the study was done with the financial support of the basic budgetary financing project № VI.62.1.5 «Synthetic biology: development of tools for the genetic material manipulation and creation of promising drugs for therapy and diagnostics» (0309-2018-0003).

Author contribution: Filipenko ML created a general concept of the study, planned experiments, analyzed the results and participated in the writing of this article; Oscorbin IP participated in the writing of this article; Khrapov EA conducted experiments; Shamovskaya DV conducted experiments; Cherednichenko AG analyzed the experiments results; Shvartz YaSh was involved in planning and analyzed the experiments results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine (Protocol 4 dated April 09, 2009). All patients signed a voluntary informed consent to participate in the study.

✉ Correspondence should be addressed: Maxim L. Filipenko
Lavrentyev Prospect 8/2, Novosibirsk, 630090; mfilipenko@gmail.com

Received: 07.12.2018 Accepted: 25.02.2019 Published online: 09.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.007

В течение многих столетий туберкулез входит в число самых сложных в терапии инфекционных заболеваний с высокой летальностью. Сейчас лекарственно устойчивые (ЛУ) изоляты *M. tuberculosis* представляют собой угрозу для здравоохранения: затрудняют консервативное лечение, приводят к инвалидизации пациентов, при этом наблюдается рост и распространение ЛУ-штаммов среди здорового населения. Это обуславливает необходимость разработки эффективных и, по возможности, простых методов выявления лекарственной резистентности микобактерий. Одним из широко используемых противотуберкулезных препаратов первого ряда при лечении туберкулеза является рифампицин. Резистентность к нему часто рассматривают как суррогатный маркер множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) микобактерий туберкулезного комплекса (МТБ) [1]. Рифампицин был введен в лечебную практику фтизиатров в 1972 г. Он высокоэффективен против МТБ, минимальная ингибиторная концентрация (МИК) рифампицина составляет 0,1–0,2 мкг/мл [2]. В сочетании с изониазидом и пиперазиномидом рифампицин лежит в основе химиотерапии туберкулезной инфекции.

Клеточной мишенью рифампицина служит фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза, исключительно консервативный среди бактерий и архей. Подавляющее большинство мутаций, обуславливающих устойчивость к рифампицину, локализуется в трех регионах гена *rpoB*, кодирующего бета-субъединицу РНК-полимеразы: кластере I (кодирует 512–534 позиции аминокислот), кластере II (563–574) и кластере III (687). В 95% случаев мутации затрагивают кластер I или так называемый регион, детерминирующий резистентность к рифампицину (RRDR) размером 81 п.н. Этот регион соответствует кодонам 426–452 у МТБ и 507–533 у *Escherichia coli*. Традиционно обозначаемые по номенклатуре *E. coli* мутации в кодонах 521, 526, 531 и 533 (позиции 440, 445, 450 и 452 в гене *rpoB* МТБ) наиболее часто встречаются у устойчивых к рифампицину микобактерий туберкулеза [3].

Аминокислотные замены в положении 526 и 531 ведут к резистентности к высоким дозам рифампицина. Аминокислотная замена Ser450Leu (S450L, номенклатура гена МТБ, которая в дальнейшем будет использована в настоящей статье) доминирует среди всех других замен, определяя резистентность у 30–70% устойчивых к рифампицину (RIF^R) изолятов (с медианой около 60%) [3]. Это делает мутацию S450L (TCG/TTG) наиболее значимым кандидатом для валидации самых разнообразных методов генетического скрининга с целью выявления резистентности МТБ к рифампицину [4, 5].

Сегодня наиболее часто используемым методом выявления генетических мутаций является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Метод прост в исполнении и достаточно надежен. Модификации ПЦР с использованием мониторинга специфических ампликонов путем детекции накопления флуоресцентного сигнала (ПЦР в реальном времени) делают анализ гомогенным и позволяют избежать дополнительных манипуляций с ампликоном вне пробирки. Однако ПЦР выполняют с помощью достаточно сложных и дорогостоящих приборов. Это послужило причиной для разработки альтернативных методов амплификации нуклеиновых кислот, в первую очередь осуществимых в изотермических условиях [6].

В 2000 г. была разработана технология изотермической петлевой амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP). Первоначально метод предполагал использование двух пар праймеров (внешней и

внутренней) и ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью [7]. Позднее разработчиками была введена дополнительная пара праймеров для улучшения кинетики амплификации.

LAMP по специфичности и чувствительности (предел чувствительности до нескольких молекул ДНК) сравнима с ПЦР, а в некоторых случаях превосходит ее. Отмечена также повышенная устойчивость LAMP к действию ингибиторов ПЦР [8]. Для детекции результатов LAMP можно использовать подходы, основанные на разных принципах. В первую очередь это измерение оптической плотности за счет образующегося при синтезе ДНК пирофосфата магния [9], или флуоресценции при введении интеркалирующих красителей [9], модификации праймеров [10] или введения флуоресцентно-меченных зондов [11], а также колориметрическая детекция металл-чувствительными красителями за счет связывания ионов магния пирофосфатом [12].

К настоящему времени проведено значительное количество исследований, посвященных разработке тест-систем для выявления МТБ с использованием LAMP [13]. Коммерческий набор Loopamp MTBC Detection Kit (Eiken Chemical Company Ltd; Япония), основанный на LAMP, был отмечен ВОЗ как возможная замена микроскопических исследований для диагностики туберкулеза [14]. Он был рекомендован также как дополнительный к микроскопии тест при диагностике взрослых с клиническими симптомами туберкулеза, в том числе для диагностики негативных по результатам микроскопии пациентов. Однако применение LAMP для выявления мутаций МТБ, вызывающих лекарственную резистентность, до настоящего времени описано не было.

Целью нашей работы было разработать метод выявления мутации TCG/TTG (S450L) в гене *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* для детекции устойчивости к рифампицину без применения дорогостоящего оборудования, а также провести оценку эффективности двух типов дизайна построения аллель-специфичной изотермической петлевой амплификации (AS-LAMP) и определить аналитические характеристики оптимальной системы на представительной выборке ДНК изолятов МТБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические изоляты

Клинические изоляты *M. tuberculosis* (48 изолятов), а также 11 образцов мокроты были выбраны случайным образом и получены в микробиологической лаборатории НИИТуб, г. Новосибирск от пациентов, проживающих в г. Новосибирске и Новосибирской области и проходивших обследование в 2009–2011 гг. Взятие и обработку мокроты осуществляли в соответствии с приказом № 109 МЗ РФ от 21 марта 2003 г. (ред. от 29 октября 2009 г.). Критерии включения пациентов в исследование: мужчины и женщины любого возраста; впервые выявленное заболевание; наличие устойчивости к рифампицину. Критерии исключения: не впервые выявленное заболевание; отсутствие устойчивости к рифампицину. Устойчивость к рифампицину (40 мкг/мл) определяли в соответствии с методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна–Йенсена. Устойчивость изолятов к рифампицину определяли в флуориметрической системе «BACTEC MGIT 960» (Becton-Dickinson; США). Грубые лизаты бактериальных клеток, а также ДНК из

бактериальных колоний изолятов получали нагреванием в 300 мкл буфера, содержащего 10 мМ тетрабората натрия (рН 9.5) и 1% 2-метоксиэтанола, в течение 10 мин при 98 °С с последующим центрифугированием для осаждения клеточного дроба.

Секвенирование гена *rpoB*

Для амплификации фрагмента *rpoB* гена размером 322 п.н. использовали праймеры *rpoB1* 5'-AACCGCCGCGCTGCGTACGGT-3' и *rpoB2* 5'-GGCCGTAGTGCGACGGGTGCA-3'. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 65 мМ Трис-НСl (рН 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 3 мМ MgCl₂, 0,05% Tween-20, 0,2 мМ дНТФ, 1 ед. *Taq*-полимеразы (Fermentas; Литва), 0,3 мкМ вышеуказанных олигонуклеотидных праймеров и 1–10 нг геномной ДНК *M. tuberculosis*. Амплификацию проводили в амплификаторе PTC-200 (BioRad; США) по следующей программе: 96 °С — 3 мин, далее 35 циклов 95 °С — 10 с, 64 °С — 10 с и 72 °С — 20 с, с финальной элонгацией 72 °С — 3 мин. Присутствие продукта амплификации требуемого размера проверяли электрофорезом в 6% ПААГ с визуализацией фрагментов ДНК бромистым этидием при облучении ультрафиолетом. Последовательность продуктов ПЦР определяли в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН с использованием реагентов для секвенирования Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies; США) и прибора для капиллярного электрофореза ABI 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies; США) согласно инструкциям производителей. Мутации выявляли путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с геном *rpoB* *M. tuberculosis* (H37Rv) с помощью программного обеспечения Unipro UGENE software 1.11.3 (Унипро; Россия).

Получение стандартных плазмидных образцов, несущих частые мутации

Фрагмент ДНК размером 505 п.н. получили с помощью амплификации с олигонуклеотидными праймерами *cl-rpoB*U и *cl-rpoB*R (табл. 1) в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 50 мкл содержала буфер для *Taq*-полимеразы (65 мМ ТрисНСl; рН 8,9; 16 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween-20; 3,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ дНТФ, 10 нг геномной ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv или ДНК изолята, с мутацией TCG/TTG (S450L) в гене *rpoB*, 1 е.а. *Taq*-полимеразы (Биосан; Россия). Амплификацию проводили в амплификаторе Терцик (ДНКтехнология; Россия) согласно следующей программе: 3 мин при 95 °С для начальной денатурации, далее 34 цикла: 10 с при 95 °С для денатурации, 10 с при 60 °С для гибридизации праймеров, 20 с при 72 °С для элонгации. Продукты амплификации гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *Hind* III и *Bam*HI (Сибэнзим; Россия) и лигировали с вектором pBluescript II SK (+), гидролизованным теми же эндонуклеазами, в течение 8 ч со 100 ед. акт. T4 ДНК-лигазы (Биосан; Россия). Лигазная смесь трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL1Blue (Stratagene; США). У плазмидных клонов, отобранных по результатам рестрикционного анализа, для подтверждения структуры определяли нуклеотидную последовательность вставки секвенированием по методу Сенгера. Секвенирование выполняли на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL GeneticAnalyzer (Applied Biosystems; США) с использованием набора BigDye 3.1 (ЦКП «Геномика», ИХБФМ СО РАН; Россия). Рекомбинантные плазмидные ДНК rRPOB-M и rRPOB-W выделяли из 50 мл ночной культуры в среде LB с помощью набора QIAGEN

Таблица 1. Список олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченных зондов, использованных в работе

	Название	Нуклеотидная последовательность
		AS-FIP-дизайн
1	450-F3	5'-CCAGAACAACCCGCTGTGCG-3'
2	450-B3	5'-TGACCCGACAGTACACCGACA-3'
3	450a-FIP-M	5'-GGACCTCCAGCCCGGCACACCCACAAGCGCCGACTGCT-3'
4	450a-FIP-W	5'-GGACCTCCAGCCCGGCACACCCACAAGCGCCGACTGGC-3'
5	450a-FIP-rpoB	5'-GGACCTCCAGCCCGGCACACCCACAAGCGCCGACTG-3'
6	450a-BIP	5'-TGCACCCGTGCACTACGGGCGGATCAGACCGATGTTGG-3'
7	450a-LF	5'-CCGATCGAAACCCCTGAGG-3'
8	450a-LB	5'-CACGTGACAGACCGCCG-3'
		AS-F3-дизайн
9	450b-F3m	5'-CCACAAGCGCCGACTGCT-3'
10	450b-F3w	5'-CCACAAGCGCCGACTGGC-3'
11	450b-FIP	5'-CACGTGCGGACCTCCAG-GCGCTGGGGCCCGGC-3'
12	450b-BIP	5'-ACCGTTCGCACTACGGC-GATCAGACCGATGTTGGGC-3'
13	450b-B3	5'-CGTACACCGACAGCGAGC-3'
14	450b-531-LF	5'-CCGATCGAAACCCCTGAGG-3'
15	450b-LB	5'-CCCGGCACGCTCACGT-3'
16	<i>cl-rpoB</i> U	5'-GAAGGATCCACCATCGAATATCTGGTC-3'
17	<i>cl-rpoB</i> R	5'-AAGCTTCTCCTCGTCGGCGGTCAGGT-3'
18	Bla-U	5'-CGTCGTTTGGTATGGCTTCATT-3'
19	Bla-R	5'-AGGACCGAAGGAGCTAACCG-3'
20	Bla-P	5'-HEX-CGGTTCACACGATCAAGGCGAG-BHQ2-3'

Plasmid Midi Kit (QIAGEN; Германия) согласно инструкции производителя.

Концентрацию полученных стандартных плазмидных ДНК определяли спектрофотометрически и флуориметрически с помощью набора Qubit™ BR (Invitrogen; США). Далее 2 мкг ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции HindIII для линейаризации. Полученные линейные стандарты разводили до концентрации 10^5 и далее до 5×10^2 копий плазмидной ДНК на мкл в стерильном буфере, содержащем 10 mM Tris HCl (pH 7,6) и ДНК фага лямбда 5 нг/мкл.

Концентрацию ДНК в полученных стандартах уточняли с использованием цифровой ПЦР на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad; США) согласно инструкциям производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую ДНК (около 103 копий на 20 мкл), $1 \times$ ПЦР-смесь (Bio-Rad; США), 300 нМ олигонуклеотидные праймеры Bla-U, Bla-R и 100 нМ TaqMan Bla-P зонд для амплификации гена бета-лактамазы (табл. 1). Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель помещали в соответствующие лунки картриджа DG8. Затем 40 мкл полученных микрокапель переносили на 96-луночную ПЦР-плашку, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Была использована следующая программа амплификации: 96 °C — 10 мин и далее 50 циклов 96 °C — 15 с, 60 °C — 40 с с финальным прогревом в течение 10 мин при 98 °C. После этого микрокапли подвергали считыванию с помощью прибора Droplet Reader, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad; США).

Изотермическая петлевая амплификация

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала $1 \times$ реакционный буфер (pH 8,0) для Bst-полимеразы (New England Biolabs; США), по 0,2 мкМ внешних праймеров (F3/B3), 0,4 мкМ петлевых праймеров (LF/BF), 1,2 мкМ внутренних праймеров (FIP/BIP), последовательности которых представлены в табл. 1, ДНК-матрицу (1000 копий плазмид или 0,5–2 нг ДНК изолята МТБ на одну реакционную смесь), 2 е.а. Gss-полимеразы из *Geobacillus* sp. 777 [15]. В случае проведения LAMP в режиме реального времени добавляли интеркалирующий краситель SYTO-9 до концентрации 2 мкМ [16]. Реакцию проводили в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad; США). Программа включала в себя следующие стадии: отжиг праймеров и элонгацию при температуре 60 °C в течение

80 мин с регистрацией сигнала флуоресценции раз в минуту на канале FAM; определение температуры плавления продуктов амплификации в диапазоне 75–95 °C после амплификации для анализа специфичности. Результаты изотермической амплификации оценивали по параметру Tt (time-to-threshold — времени до пересечения кривой накопления продукта амплификации порогового значения). Все реакции LAMP проводили в трех повторах, в таблице указаны средние значения и стандартные отклонения от них.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы использовали две ранее описанные [17, 18] схемы дизайна аллель-специфичной изотермической петлевой амплификации (AS-LAMP) (рис. 1). По первой схеме выявление мутации или аллеля дикого типа осуществляют с помощью двух аллель-специфичных праймеров FIP. По второй схеме аллель-специфичную LAMP инициируют со специфичного для мутации праймера F3. На начальном этапе в качестве матрицы для отработки условий мы использовали плазмиды с клонированным фрагментом *groV* дикого типа и фрагментом, содержащим мутацию. Для оптимизации реакции матрицей для AS-LAMP служил pS450L-M или pS450L-W в концентрации 1000 копий на реакцию. Все реакции оптимизации проводили, отслеживая накопление продуктов изотермической амплификации в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYTO9. В качестве основного параметра для оптимизации использовали индекс дискриминации мутации, который определяли как разность Tt для ДНК «дикого типа» и Tt для мутантной ДНК при использовании для амплификации набора праймеров, в состав которого входит аллель-специфичный праймер (AS-FIP или AS-F3).

В модельных экспериментах на плазмидных ДНК нами было показано, что применение схемы анализа с использованием аллель-специфичного праймера FIP по сравнению с F3 имеет лучший индекс дискриминации мутации: разница между амплификацией мутации и аллеля дикого типа составила $22 \pm 2,4$ против $13 \pm 4,1$ мин (рис. 2). Применение непараметрического U-критерия (критерий Манна-Уитни) показало, что полученные индексы дискриминации отличаются статистически значимо ($p = 0,0011$). При использовании 100 геном-эквивалентов ДНК истинно положительный сигнал (амплификация *groV* гена с мутацией при использовании соответствующего аллель-специфичного праймера) детектировался после $29,4 \pm 3,4$ мин.

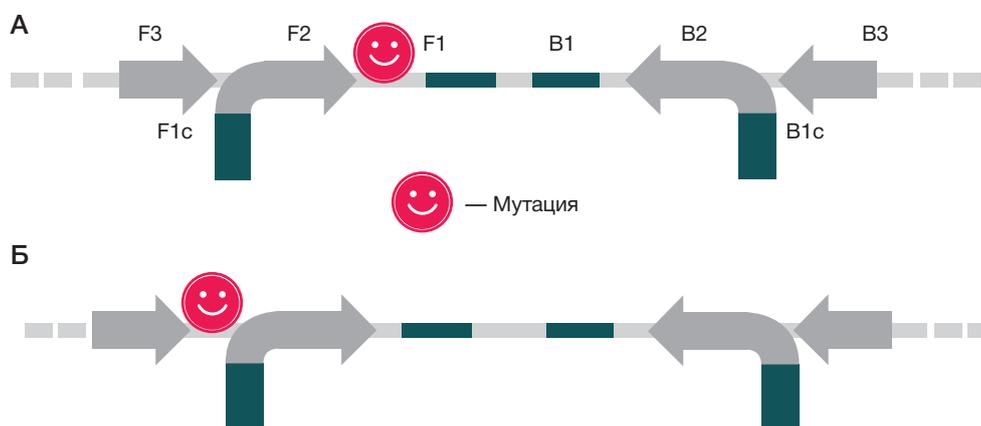


Рис. 1. Схематическое изображение разных принципов аллель-специфичной изотермической петлевой амплификации (AS-LAMP): аллель-специфичный праймер FIP (А), аллель-специфичный праймер F3 (Б)

Нами были также предприняты попытки улучшения индекса дискриминации мутации с помощью изменения концентрации бетаина, а также путем добавления диметилсульфоксида (ДМСО), который обладает способностью увеличивать специфичность стандартной ПЦР [19]. Оптимальная концентрация бетаина составила 0,75 М, добавление ДМСО не приводило к улучшению дискриминации и даже несколько увеличивало общее время реакции.

Положительный сигнал надежно визуализировали после добавления в реакцию SYBR Green I (в концентрации 1 : 1000 от коммерческого стока красителя), как при освещении дневным светом, так и при использовании трансиллюминатора с УФ-излучением (рис. 3). Для дальнейшей диагностической валидации для каждого тестируемого образца выполняли две реакции: одну AS-LAMP с праймером 531-FIP-M для выявления наличия мутации, другую с праймером 531-FIP-rpoB для определения наличия ДНК МТБ. Реакции выполняли или в термостате при 65 °С в течение 40 мин с визуализацией результата реакции с помощью SYBR Green I, или в режиме реального времени (см. «Материалы и методы»).

Используя разработанный метод, мы проанализировали выборку ДНК 20 RIF^R изолятов МТБ, несущих мутацию Ser450Leu в гене *rpoB*, 10 RIF^R изолятов, несущих другие мутации в гене *rpoB* (в частности, в кодонах His445 и

Asp440), а также 18 RIF^S изолятов без мутаций, подтвердив наличие мутаций с помощью секвенирования по Сенгеру (табл. 2). Все исследованные образцы были определены верно, чувствительность и специфичность LAMP для выявления мутации Ser450Leu в гене *rpoB* составили 100%.

Применение AS-LAMP на небольшой выборке из 11 образцов ДНК из мокроты пациентов с активным бактериовыделением показало полную конкордантность с результатами секвенирования по Сенгеру (4 образца с мутацией и 7 образцов без мутации).

Использование в качестве матрицы ДНК человека не продуцировало значимого сигнала.

Было показано, что анализ может выполняться на грубых лизатах бактериальных клеток. При этом суммарное время проведения анализа начиная с биологического образца может не превышать 1,5 ч, с учетом того, что получение грубых лизатов микобактерий занимает не более 15–30 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние несколько лет было предложено несколько подходов к выявлению однонуклеотидных замен ДНК с помощью LAMP. Все они используют аллель-специфичную гибридизацию с продуктами амплификации [20, 21], аллель-специфичные праймеры [22, 23] также селективно

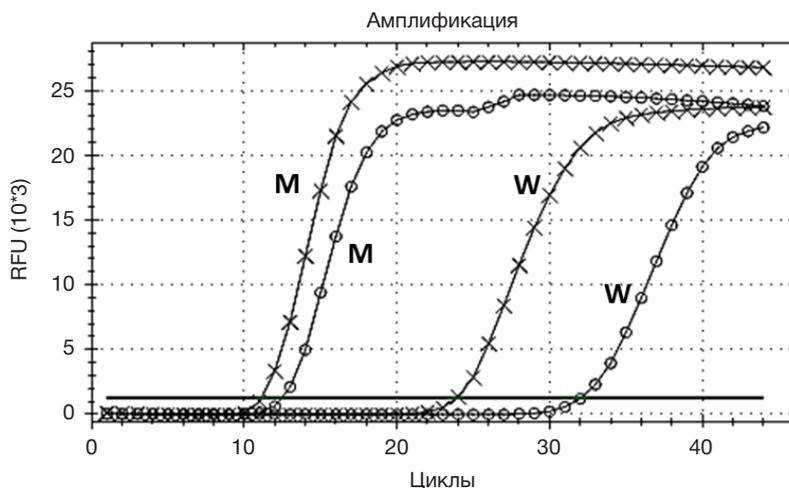


Рис. 2. Кривые накопления флуоресценции продуктов AS-LAMP. Кривые, выделенные окружностями, соответствуют FIP-AS-LAMP, крестами — F3-AS-LAMP

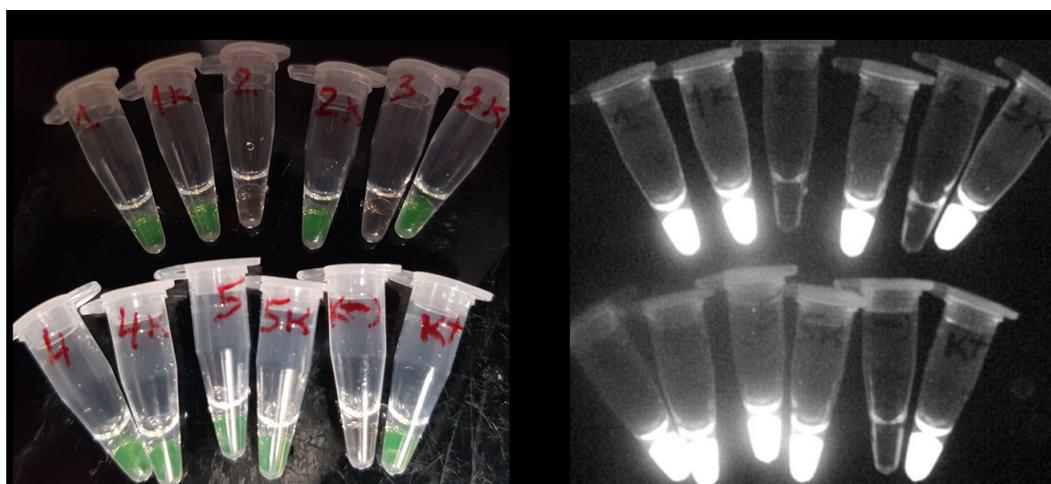


Рис. 3. Выявление мутации TCG/TTG (S450L) гена *rpoB* методом AS-LAMP с визуализацией продуктов амплификации добавлением интеркалирующего красителя SYBR Green I при естественном освещении (А) и UV-освещении 280 нм (Б). Образцы 1, 4, 5 содержат мутацию, 2 и 3 — нет, их амплифицировали с праймером, специфичным для мутации, пробирки с «К» амплифицировали с праймером, специфичным для нормы

Таблица 2. Спектр выявленных с помощью секвенирования по Сенгеру мутаций гена *rpoB* у изолятов МТБ и результаты выявления мутации TCG/TTG (S450L) с помощью AS-LAMP

№	Мутация	Секвенирование	AS-LAMP
1	Нет	18	18
2	Ser450Leu (TCG->TTG)	20	20
3	His445Leu (CAC->CTC)	4	0
4	His445Gln (CAC->CAA)	1	0
5	Asp440Val (GAC->GTC)	3	0
6	Asp440Asn (GAC->AAC)	1	0
7	Asp440His (GAC->CAC)	1	0

блокирующие амплификацию исследуемых структурных вариантов олигонуклеотиды [24].

Аллель-специфичная полимеразная цепная реакция (АС-ПЦР) — один из наиболее широко используемых методов выявления мутаций ДНК [25]. Классический вариант АС-ПЦР предполагает использование двух аллель-специфичных праймеров, в которых 3'-концевой нуклеотид комплементарен полиморфному нуклеотиду, и третьего общего праймера. В основе метода лежит различие эффективности элонгации спаренного и неспаренного 3'-нуклеотида ДНК-полимеразой. В идеальных условиях (при полном ингибировании элонгации) это должно привести к отсутствию продукта амплификации в реакции с праймером к мутации на матрице ДНК дикого типа.

Для улучшения дискриминации продуктов с «мутантной» и «нормальной» ДНК широко используют введение дополнительных неспаренных нуклеотидов на 3'-конце праймера (в позиции -2, -3 или -4) для дальнейшей дестабилизации дуплекса с целью уменьшения эффективности элонгации ДНК-полимеразой. Мы предположили, что при элонгации аллель-специфичных праймеров цепь-вытесняющей ДНК-полимеразой можно использовать схожий принцип. Для дизайна аллель-специфичных праймеров мы выбрали подход, описанный в 2004 г. [26]. Его авторы предложили для увеличения дискриминации мутантного аллеля вводить второй неспаренный нуклеотид в позиции -2 аллель-специфичного праймера, а также простой набор правил выбора типа этого основания для достижения максимального эффекта. Используя данные рекомендации, мы синтезировали два принципиально разных набора AS-праймеров для изотермической петлевой амплификации: один из них соответствует FIP-праймеру, а другой — праймеру F3.

Оптимизация выявления мутации TCG/TTG (S450L) в гене *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* на плазмидных контрольных ДНК показала предпочтительность AS-FIP. При его использовании мы смогли правильно классифицировать все анализируемые образцы ДНК изолятов МТБ, в том числе как отрицательные по замене TCG/TTG (S450L) образцы ДНК с мутациями в кодонах 445 и 440, путем визуального анализа результатов изотермической амплификации в стандартном термостате,

поддерживающем температуру 65 °С. AS-LAMP также оказался эффективным для выявления мутации Ser450Leu гена *rpoB* в ДНК из мокроты пациентов с известным статусом мутаций гена *rpoB*. Нам удалось правильно классифицировать 4 образца с мутацией Ser450Leu и 7 образцов без этой мутации. Предложенный нами подход показал высокую специфичность и чувствительность для выявления наиболее распространенной мутации МТБ, вызывающей резистентность к действию рифампицина. Тем не менее для значимого определения указанных выше параметров необходимо тестирование метода на выборке значительно большего объема.

Несмотря на то что подавляющее число работ, посвященных LAMP, описывает качественное выявление присутствия инфекционного агента, указанный метод также имеет высокий потенциал для определения структурного полиморфизма анализируемой ДНК. Например, показана возможность определения изолятов семейства *Beijing Mycobacterium tuberculosis* с использованием в качестве мишеней региона RD207 и гена Rv0679c [27]. Наша работа вносит определенный вклад в развитие методов выявления точечных мутаций с помощью LAMP и также увеличивает исследовательский потенциал указанного метода.

К ограничениям и недостаткам предложенного в настоящей работе метода можно отнести необходимость дополнительной валидации способа экстракции ДНК и связанного с ним количества бактерий ввиду зависимости выбора оптимального времени проведения анализа, при котором позитивный сигнал мутация-специфической системы еще не определяется, от концентрации анализируемой микобактериальной ДНК.

ВЫВОДЫ

Мы продемонстрировали принципиальную возможность определения мутации TCG/TTG (S450L) в гене *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* методом аллель-специфичной изотермической петлевой амплификации с высокой надежностью без применения дорогостоящего оборудования. Суммарное время, необходимое для проведения тестирования клинического образца ДНК, может не превышать 1,5 ч.

Литература

1. Drobniewski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* — a molecular story. *J Med Microbiol.* 1998; 47 (3): 189–96.
2. Heifets LB. Antimycobacterial drugs. *Semin Respir Infect.* 1994; 9 (2): 84–103.
3. TB Drug Resistance Mutation Database. Доступно по ссылке:

<https://tbdreamdb.ki.se/Data/MutationDetail.aspx?Areald=RIF&GeneID=Rv0667>.

4. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Allele-specific *rpoB* PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47 (7): 2231–5.

5. Филипенко М. Л., Дымова М. А., Храпов Е. А., Боярских, У. А., Петренко Т. И., Чередниченко А. Г. и др. Способ выявления устойчивых к рифампицину изолятов. Вестник НГУ. 2012; 10 (2): 101–6.
6. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008; 27 (3): 224–43.
7. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28 (12): E63.
8. Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti E-J, Boehme CC, Notomi T et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011; 62 (1): 41–8.
9. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289 (1): 150–4.
10. Kouguchi Y, Fujiwara T, Teramoto M, Kuramoto M. Homogenous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxinigenic *Escherichia coli* isolates. *Mol Cell Probes*. 2010; 24 (4): 190–5.
11. Liu W, Huang S, Liu N, Dong D, Yang Z, Tang Y et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci Rep*. 2017; (7): 40125.
12. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 2009; 46 (3): 167–72.
13. Nagai K, Horita N, Yamamoto M, Tsukahara T, Nagakura H, Tashiro K et al. Diagnostic test accuracy of loop-mediated isothermal amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis*: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016; (6): 39090.
14. World Health Organization, editors. Global Tuberculosis Programme The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance. 2016.
15. Oscorbin IP, Boyarskikh UA, Filipenko ML. Large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications. *Mol Biotechnol*. 2015; 57 (10): 947–59.
16. Oscorbin IP, Belousova EA, Zakabunin AI, Boyarskikh UA, Filipenko ML. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*. 2016; 61 (1): 20–5.
17. Badolo A, Bando H, Traoré A, Ko-ketsu M, Guelbeogo WM, Kanuka H et al. Detection of G119S ace-1 R mutation in field-collected *Anopheles gambiae* mosquitoes using allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) method. *Malar J*. 2015; (14): 477.
18. Carlos FF, Veigas B, Matias AS, Doria G, Flores O, Baptista PV. Allele specific LAMP-gold nanoparticle for characterization of single nucleotide polymorphisms. *Biotechnol Reports*. 2017; (16): 21–5.
19. Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene*. 2001; 274 (1–2): 293–8.
20. Jiang YS, Bhadra S, Li B, Wu YR, Milligan JN, Ellington AD. Robust strand exchange reactions for the sequence-specific, real-time detection of nucleic acid amplicons. *Anal Chem*. 87 (6): 3314–20.
21. Nakamura N, Ito K, Takahashi M, Hashimoto K, Kawamoto M, Yamanaka M et al. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Anal Chem*. 2007; 79 (12): 9484–93.
22. Yongkiettrakul S, Kampeera J, Chareanchim W, Rattanajak R, Pornthanakasem W, Kiatpathomchai W et al. Simple detection of single nucleotide polymorphism in *Plasmodium falciparum* by SNP-LAMP assay combined with lateral flow dipstick. *Parasitol Int*. 2017; 66 (1): 964–71.
23. Zhang L, Zhang Y, Wang C, Feng Q, Fan F, Zhang G, et al. Integrated microcapillary for sample-to-answer nucleic acid pretreatment, amplification, and detection. *Anal Chem*. 2014; 86 (20): 10461–6.
24. Itonaga M, Matsuzaki I, Warigaya K, Tamura T, Shimizu Y, Fujimoto M, et al. Novel methodology for rapid detection of KRAS mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2016; (11): e0151654.
25. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989; 17 (7): 2503–16.
26. Li B, Kadura I, Fu D-J, Watson DE. Genotyping with TaqMAMA. *Genomics*. 2004; 83 (2): 311–20.
27. Nagai Y, Iwade Y, Nakano M, Akachi S, Kobayashi T, Nishinaka T. Rapid and simple identification of Beijing genotype strain of *Mycobacterium tuberculosis* using a loop-mediated isothermal amplification assay. *Microbiol Immunol*. 2016; 60 (7): 459–67.

References

1. Drobniwski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* — a molecular story. *J Med Microbiol*. 1998; 47 (3): 189–96.
2. Heifets LB. Antimycobacterial drugs. *Semin Respir Infect*. 1994; 9 (2): 84–103.
3. TB Drug Resistance Mutation Database. Available from: <https://tbdrugdb.ki.se/Data/MutationDetail.aspx?Areald=RIF&GeneID=Rv0667>.
4. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47 (7): 2231–5.
5. Filipenko ML, Dymova MA, Hrapov EA, Boyarskikh, UA, Petrenko TI, Cheredniuchenko AG i dr. Sposob vyjavlenija ustojchivyh k rifampicinu izoljatov. Vestnik NGU. 2012; 10 (2): 101–6.
6. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008; 27 (3): 224–43.
7. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28 (12): E63.
8. Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti E-J, Boehme CC, Notomi T et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011; 62 (1): 41–8.
9. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289 (1): 150–4.
10. Kouguchi Y, Fujiwara T, Teramoto M, Kuramoto M. Homogenous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxinigenic *Escherichia coli* isolates. *Mol Cell Probes*. 2010; 24 (4): 190–5.
11. Liu W, Huang S, Liu N, Dong D, Yang Z, Tang Y et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci Rep*. 2017; (7): 40125.
12. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 2009; 46 (3): 167–72.
13. Nagai K, Horita N, Yamamoto M, Tsukahara T, Nagakura H, Tashiro K et al. Diagnostic test accuracy of loop-mediated isothermal amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis*:

- systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016; (6): 39090.
14. World Health Organization, editors. Global Tuberculosis Programme The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance. 2016.
 15. Oscorbin IP, Boyarskikh UA, Filipenko ML. Large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications. *Mol Biotechnol.* 2015; 57 (10): 947–59.
 16. Oscorbin IP, Belousova EA, Zakabunin AI, Boyarskikh UA, Filipenko ML. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques.* 2016; 61 (1): 20–5.
 17. Badolo A, Bando H, Traoré A, Ko-ketsu M, Guelbeogo WM, Kanuka H et al. Detection of G119S ace-1 R mutation in field-collected *Anopheles gambiae* mosquitoes using allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) method. *Malar J.* 2015; (14): 477.
 18. Carlos FF, Veigas B, Matias AS, Doria G, Flores O, Baptista PV. Allele specific LAMP-gold nanoparticle for characterization of single nucleotide polymorphisms. *Biotechnol Reports.* 2017; (16): 21–5.
 19. Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene.* 2001; 274 (1–2): 293–8.
 20. Jiang YS, Bhadra S, Li B, Wu YR, Milligan JN, Ellington AD. Robust strand exchange reactions for the sequence-specific, real-time detection of nucleic acid amplicons. *Anal Chem.* 87 (6): 3314–20.
 21. Nakamura N, Ito K, Takahashi M, Hashimoto K, Kawamoto M, Yamanaka M et al. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Anal Chem.* 2007; 79 (12): 9484–93.
 22. Yongkiettrakul S, Kampeera J, Chareanchim W, Rattanajak R, Pornthanakasem W, Kiatpathomchai W et al. Simple detection of single nucleotide polymorphism in *Plasmodium falciparum* by SNP-LAMP assay combined with lateral flow dipstick. *Parasitol Int.* 2017; 66 (1): 964–71.
 23. Zhang L, Zhang Y, Wang C, Feng Q, Fan F, Zhang G, et al. Integrated microcapillary for sample-to-answer nucleic acid pretreatment, amplification, and detection. *Anal Chem.* 2014; 86 (20): 10461–6.
 24. Itonaga M, Matsuzaki I, Warigaya K, Tamura T, Shimizu Y, Fujimoto M, et al. Novel methodology for rapid detection of KRAS mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One.* 2016; (11): e0151654.
 25. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989; 17 (7): 2503–16.
 26. Li B, Kadura I, Fu D-J, Watson DE. Genotyping with TaqMAMA. *Genomics.* 2004; 83 (2): 311–20.
 27. Nagai Y, Iwade Y, Nakano M, Akachi S, Kobayashi T, Nishinaka T. Rapid and simple identification of Beijing genotype strain of *Mycobacterium tuberculosis* using a loop-mediated isothermal amplification assay. *Microbiol Immunol.* 2016; 60 (7): 459–67.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ ЭЯКУЛЯТА МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР И КУЛЬТУРАЛЬНЫМ МЕТОДОМ

Е. С. Ворошилина^{1,2} ✉, Д. Л. Зорников¹, Е. А. Паначева^{1,2}

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

Одной из причин мужского бесплодия могут быть воспалительные заболевания урогенитального тракта, развитие которых в ряде случаев ассоциировано с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ). В связи с этим актуальна проблема внедрения современных методов выявления и идентификации УПМ в урогенитальном тракте. Целью работы было провести сравнительный анализ результатов исследования микробиоты эякулята мужчин репродуктивного возраста с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (тест Андрофлор) и культурального метода. Исследовали 86 образцов эякулята, собранных у мужчин в возрасте 18–57 лет после соблюдения полового воздержания в течение 3–5 суток. При культуральном исследовании в 50% образцов наблюдали рост грамположительных факультативно анаэробных бактерий в количестве менее 10^3 КОЕ/мл; в 16,3% образцов — роста бактерий отмечено не было. При использовании ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в каждом образце выявляли 8–15 групп микроорганизмов (в том числе определяли преобладающую) в количестве 10^2 – 10^6 ГЭ/мл. Во всех 86 образцах были обнаружены облигатные анаэробы, которые не культивируются *in vitro*. Преобладающие группы микроорганизмов, определяемые в ПЦР-РВ, были выявлены культуральным методом только в 24,4% случаев.

Ключевые слова: микробиота эякулята, ПЦР-РВ, культуральный метод

Благодарности: авторы благодарят директора Медицинского центра «Гармония» В. Н. Хаютина за предоставленную возможность проведения исследования на базе лабораторного отделения клиники.

Информация о вкладе авторов: Е. С. Ворошилина — организация исследования, выполнение ПЦР-РВ, анализ данных, написание статьи; Д. Л. Зорников — анализ данных, статистическая обработка, написание статьи; Е. А. Паначева — обзор литературы, сбор клинических данных, статистический анализ, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом при ФГБОУ ВО УГМУ МЗ РФ (протокол № 4 от 18 октября 2017 г.). Все пациенты подписали информированное письменное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Сергеевна Ворошилина
ул. Фурманова, 30, г. Екатеринбург, 620142; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 11.02.2019 **Статья принята к печати:** 28.02.2019 **Опубликована онлайн:** 11.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.009

EVALUATION OF THE EJACULATE MICROBIOTA BY REAL-TIME PCR AND CULTURE-BASED TECHNIQUE

Voroshilina ES^{1,2} ✉, Zornikov DL¹, Panacheva EA^{1,2}

¹ Ural State Medical University of the Ministry of health, Yekaterinburg, Russia

² Medical Center "Garmonia", Yekaterinburg, Russia

Among other things male sterility can be caused by inflammatory diseases of the urogenital tract, often associated with opportunistic microorganisms. Thus, it is necessary to implement modern methods for the detection and identification of opportunistic microorganisms in the urogenital tract. The aim of the work was to conduct comparative analysis of the ejaculate microbiota from men of the reproductive age and studied using quantitative polymerase chain reaction (PCR) and culture method. 86 samples of ejaculate collected from men aged 18–57 years after observing sexual abstinence for 3–5 days were examined. With culture study in 50% of samples we observed growth of gram positive facultative anaerobic bacteria in the amount less than 10^3 CFU/ml; in 16.3% of samples — the growth of bacteria was not observed. With real-time PCR in each sample 8–15 groups of microorganisms were detected (including the prevailing groups) in the amount of 10^2 – 10^6 GE/ml. In all 86 samples obligate anaerobes that cannot not be cultured *in vitro* were detected. The predominant groups of microorganisms, as determined by real-time PCR, were detected by the culture metod only in 24.4% of cases.

Keywords: ejaculate microbiota, real-time PCR, culture-based technique

Acknowledgments: the authors would like to thank V. N. Khayutin, director of Garmonia Medical Center, for allowing to conduct the study in the clinic's laboratory department.

Author contribution: Voroshilina ES — organization of the study, conducting tests, data analysis, article authoring; Zornikov DL — data analysis, statistical processing, article authoring; Panacheva EA — literature review, clinical data collection, statistical analysis, article authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education under the Ministry of Health of the Russian Federation (Minutes № 4 of October 18, 2017). All patients signed the informed written consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina S. Voroshilina
Furmanova 30, Yekaterinburg, 620142; voroshilina@gmail.com

Received: 11.02.2019 **Accepted:** 28.02.2019 **Published online:** 11.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.009

Исследования последних лет изменили парадигму в отношении стерильности некоторых биотопов, в частности мочи и мочевого пузыря. В моче здоровых мужчин было установлено присутствие условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) родов *Lactobacillus*, *Sneathia*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus* и *Ureaplasma* [1]. Если результаты ранних исследований

микробиоты урогенитального тракта (УГТ) здоровых мужчин указывают на наличие микроорганизмов исключительно в уретре и венечной борозде [2, 3, 4], то в настоящее время бактерии обнаружены и в верхних отделах УГТ клинически здоровых мужчин, в частности в ткани простаты [5].

Микробиота эякулята состоит из комплекса микроорганизмов, происходящих из разных отделов

УГТ. У здоровых мужчин она представлена главным образом микроорганизмами уретры, но при наличии патологического процесса дополнительно отмечаются микроорганизмы из верхних отделов УГТ [2].

Сведения о микробном составе эякулята при патологических состояниях (например, бесплодии и простатите) представляют огромный интерес для практической медицины. Недавно были выявлены различия в составе микробиоты эякулята у пациентов с простатитом и у здоровых мужчин: у последних отмечали большее количество *Lactobacillus iners*, тогда как у пациентов с простатитом — повышенное общее количество микроорганизмов, в том числе представителей филума *Proteobacteria*, а также большее видовое разнообразие микробиоты [6].

С инфекциями УГТ связано 6–10% случаев мужского бесплодия [7]. Однако этиология большинства простатитов остается неясной, а отсутствие роста микроорганизмов при культуральном исследовании не позволяет подобрать адекватную схему терапии [8]. Обсуждается вопрос вклада отдельных УПМ в развитие воспалительных процессов УГТ. Отмечается, что при отсутствии облигатных патогенов такие УПМ как *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis* могут являться триггером развития воспаления в этой области [7].

В последние десятилетия среди урогенитальных инфекций преобладают субклинические формы протекания заболеваний. В таких случаях диагноз устанавливают на основании лабораторных данных, отражающих интенсивность локального воспалительного ответа и состав микробиоты УГТ. Это обуславливает необходимость применения наиболее современных и информативных методов исследования, позволяющих получать точную информацию о микробном составе отделяемого УГТ.

На сегодняшний день для оценки микробиоты эякулята в клинической практике применяют несколько подходов. Наряду с культуральным исследованием в практику внедрен метод количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) — тест Андрофлор. Он позволяет проводить количественную оценку сложных микробных сообществ, в образовании которых принимают участие разнообразные микроорганизмы, в том числе трудно культивируемые и некультивируемые. Однако рекомендовать ПЦР-РВ в качестве полноценной замены культурального метода для исследования микробиоты эякулята затруднительно ввиду отсутствия качественно проведенных сравнительных исследований.

Целью работы было провести сравнительный анализ результатов исследования микробиоты эякулята с использованием культурального метода и ПЦР-РВ (тест Андрофлор).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В период с января по май 2018 г. были отобраны образцы эякулята 86 мужчин, обратившихся в Медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург) для решения репродуктивных проблем. Возраст пациентов составил 18–57 лет (средний возраст $34 \pm 6,7$ лет). Критерии включения в исследование: соблюдение полового воздержания в течение 3–5 суток до исследования для исключения возможной контаминации материала транзитной микрофлорой (*Lactobacillus spp.*) партнерши. Критерии исключения из исследования:

обнаружение облигатных патогенов (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*). Непосредственно перед сбором материала пациенту требовалось помочиться, полностью осуществляли путем мастурбации в стерильный контейнер объемом до 60 мл, избегая касания стенок и крышки контейнера руками. Транспортировку проб эякулята в лабораторию осуществляли в термоконтейнере в течение не более 4 ч с момента сбора образца. Культуральное исследование и ПЦР-РВ выполняли одновременно из одной пробы.

Культуральное исследование эякулята проводили в микробиологической лаборатории «Кволити Мед» (г. Екатеринбург). Для этого 1 мл эякулята разводили стерильным физиологическим раствором (1 : 1) и центрифугировали при 1500 об./мин в течение 15 мин. После удаления супернатанта по 10 мкл осадка высевали на 5 питательных сред (Bio-Rad; Франция): 5%-й кровяной агар, обогащенный сывороткой и дрожжевым экстрактом; шоколадный агар, приготовленный на основе кровяного агара; хромогенный агар UriSelect4; агар Сабуро; маннит-солевой агар. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24–48 ч в аэробных условиях и в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Идентификацию полученных колоний микроорганизмов производили методом время-пролетной матричноассоциированной лазерной десорбционной ионизационной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе Vitek MS (BioMérieux; Франция).

ПЦР-исследование проводили в лаборатории МЦ «Гармония» (г. Екатеринбург). Для проведения ПЦР-РВ 1 мл эякулята помещали в пробирку Эппендорф с 1 мл транспортной среды с муколитиком (ИнтерЛабСервис; Россия), встряхивали с помощью центрифуги «Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400» (BioSan; Латвия) до полного перемешивания. Пробирку центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости 50 мкл осадка использовали для последующего выделения ДНК с помощью комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ДНК-Технология; Россия) согласно инструкции производителя; амплификацию ДНК целевых групп УПМ проводили с помощью набора реагентов «Андрофлор» (ДНК-Технология; Россия) в детектирующем амплификаторе ДТ-96 согласно инструкции производителя (ДНК-Технология; Россия) [9]. После реакции амплификации по показателю индикаторного цикла с помощью специального программного обеспечения (ДНК-Технология; Россия) проводили автоматический расчет количества общей бактериальной массы (ОБМ) и каждого из УПМ в представленном образце. Количество выявленных микроорганизмов выражали в геном-эквивалентах на 1 мл (ГЭ/мл). Расчет доли отдельных видов и групп бактерий проводили относительно суммы всех выявленных в образце микроорганизмов. Спектр определяемых набором УПМ представлен следующими группами: грамположительные факультативно анаэробные микроорганизмы (*Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*); грамотрицательные факультативно анаэробные микроорганизмы (*Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia spp.* / *Burkholderia spp.*); группа *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus spp.*; облигатно анаэробные микроорганизмы (*Gardnerella vaginalis*, *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp.* / *Leptotrichia spp.* / *Fusobacterium spp.*, *Megasphaera spp.* / *Veillonella spp.* / *Dialister spp.*, *Bacteroides spp.* / *Porphyromonas spp.* / *Prevotella spp.*,

Anaerococcus spp., *Peptostreptococcus spp.*, *Atopobium cluster*), микоплазмы (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*), транзитная микробиота (*Lactobacillus spp.*), грибы рода *Candida*.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2016 (Microsoft; США), пакета статистических программ WinPepi. Сравнительный анализ частоты выявления различных вариантов микробиоты культуральным методом и ПЦР-РВ проводили с помощью двустороннего критерия Фишера, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты культурального исследования эякулята

При культуральном исследовании рост микроорганизмов обнаружили в 72 (83,7%) из 86 образцов эякулята, идентифицировали 28 видов микроорганизмов. В 14 (16,3%) образцах рост бактерий отсутствовал.

В 33 (38,4%) образцах эякулята при культивировании выявили только один микроорганизм, идентифицировали 10 видов. В большинстве случаев это были представители нормальной микробиоты УГТ мужчин или кожи. В 21 (63,6%) из 33 образцов микробиота была представлена одним из грамположительных факультативно анаэробных микроорганизмов: *Staphylococcus spp.* (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*); *Streptococcus spp.* (*S. anginosus*), *Corynebacterium coyleae*, *Dermabacter hominis*. В 8 (24,2%) случаях обнаружили *Enterococcus faecalis*, в 4 (12,2%) из 33 образцов выявили грамотрицательные факультативно анаэробные бактерии *Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, *Moraxella osloensis*.

При выявлении монокультуры в образце эякулята количество бактерий в большинстве случаев (28 (84,8%) из 33) было клинически малозначимым и составляло 10^2 – 10^3 КОЕ/мл. В 6 (18,2%) образцах количество выявленных бактерий составило 10^4 КОЕ/мл, и только в одном образце — 10^6 КОЕ/мл.

В 27 (31,4%) из 86 образцов выявили по 2 вида микроорганизмов, идентифицировали 20 видов. Исключительно грамположительные факультативно анаэробные бактерии выявили в 16 (59,3%) из 27 образцов, характерными были сочетания *S. mitis* / *S. oralis* — 8 случаев; *C. glucuronolyticum* / *S. epidermidis* и *E. faecalis* / *S. epidermidis* — по 2 случая; *E. faecalis* / *S. haemolyticus*, *S. capitis* / *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* / *S. agalactiae*, *C. glucuronolyticum* / *E. faecalis* — по одному случаю. В одном образце были выявлены только грамотрицательные микроорганизмы: *Enterobacter hormaechei* / *Pseudomonas aeruginosa*. В 5 (18,5%) образцах одновременно присутствовали грамположительные и грамотрицательные факультативно анаэробные микроорганизмы: *E. faecalis* / *E. coli* — в 2 случаях; *Klebsiella pneumoniae* / *S. haemolyticus* — в 2 случаях и *E. faecalis* / *K. oxytoca* — в одном. В 2 (7,4%) образцах эякулята выявили *G. vaginalis*, в одном случае в сочетании с *Actinomyces neuii*, в другом — с *S. epidermidis*. Еще в 2 (7,4%) образцах выявили *Lactobacillus spp.* в сочетании с грамположительными кокками: *L. iners* / *S. gallolyticus*, *L. crispatis* / *S. warneri*.

При выявлении двух культур в образце количество выделенных бактерий в 17 (62,9%) из 27 образцов составило 10^2 – 10^3 КОЕ/мл, что расценивают как клинически малозначимое [10]. В 9 (33,3%) образцах количество одного из выявленных видов (*E. faecalis*,

K. oxytoca, *G. vaginalis*, *S. agalactiae*) составило 10^4 КОЕ/мл. Только в одном образце количество обоих выделенных видов (*K. pneumoniae* / *S. haemolyticus*) составило 10^6 КОЕ/мл.

Одновременно 3 микроорганизма выделили в 9 (10,5%) из 86 образцов эякулята, идентифицировали 12 видов микроорганизмов в различных сочетаниях. В 4 (44,4%) из 9 случаев микробиота была представлена исключительно грамположительными факультативно анаэробными бактериями из числа представителей нормальной микробиоты УГТ: *C. glucuronolyticum*, *S. mitis* / *S. oralis*, *S. hominis*. В 2 (22,2%) образцах были выявлены сочетания *C. glucuronolyticum* / *G. vaginalis* / *S. anginosus*. В 3 случаях выявили сочетание грамположительных и грамотрицательных бактерий: *S. agalactiae* / *E. coli* / *C. glucuronolyticum*; *Corynebacterium amycolatum* / *E. hormaechei* / *E. faecalis* и *E. faecalis* / *E. coli* / *S. anginosus*.

Количество выявленных бактерий при одновременном обнаружении трех видов в 3 из 9 случаев было клинически малозначимым (не более 10^3 КОЕ/мл), в остальных образцах как минимум один вид присутствовал в количестве 10^4 КОЕ/мл и более. В количестве 10^4 КОЕ/мл и более определяли *C. glucuronolyticum*, *E. hormaechei*, *E. faecalis*, *S. anginosus*, *G. vaginalis*, *S. agalactiae*.

В 3 образцах при культуральном исследовании выявили по 4 и более микроорганизма одновременно. В одном случае это было сочетание *C. gluconormum* / *E. faecalis* / *S. mitis* / *S. oralis* / *E. coli*, где *E. faecalis* присутствовал в количестве 10^4 КОЕ/мл. В двух других случаях были выявлены сочетания грамположительных представителей нормальной микробиоты в количестве не более 10^3 КОЕ/мл, что в совокупности со спектром выявленных микроорганизмов позволяет предположить, что образцы могли быть контаминированы в процессе сбора эякулята.

Результаты исследования эякулята методом ПЦР-РВ

При использовании ПЦР-РВ микробиота была выявлена во всех 86 образцах эякулята. В каждом образце определяли 8–15 групп микроорганизмов, представленных в разных количествах — от 10^2 до 10^6 ГЭ/мл. Использование математического алгоритма для расчета доли каждого из микроорганизмов по отношению к ОБМ позволило определить в большинстве образцов численно преобладающую группу бактерий.

В 15 (17,4%) из 86 образцов преобладали грамположительные факультативно анаэробные микроорганизмы, представители нормальной микробиоты УГТ мужчин — *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* В 27 (31,4%) образцах — облигатные анаэробы, в 4 (4,7%) — грамотрицательные факультативно анаэробные бактерии (*P. aeruginosa* / *Ralstonia spp.* / *Burkholderia spp.* и *Haemophilus spp.*). В 23 (26,7%) образцах преобладали бактерии группы *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus spp.*; в 7 (8,1%) — транзитная микробиота (*Lactobacillus spp.*); в 10 (11,6%) пробах выявлены смешанные микробные сообщества, в которых выделить преобладающую группу не представлялось возможным. Последнее демонстрирует разнородность микробиоты, которую можно определить с помощью ПЦР-РВ в отличие от культурального метода.

Интерпретируя результаты оценки микрофлоры эякулята методом ПЦР-РВ, мы понимали, что рассматривать совокупность выявленных МО как микробное сообщество или микробиоценоз нельзя, так как бактерии попадают в эякулят из разных отделов УГТ мужчины. Поэтому мы

предлагаем дифференцировать варианты микробиоты эякулята по преобладающей группе микроорганизмов — превышающей в процентном соотношении другие группы. По этому критерию были выделены 6 вариантов микробиоты эякулята, частота выявления различных вариантов была проанализирована с учетом ОБМ (табл. 1).

Анализ полученных данных позволил выявить несколько закономерностей. По мере увеличения ОБМ эякулята было отмечено статистически значимое снижение частоты выявления варианта III (с преобладанием группы *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.*), в то время как достоверно возросла доля варианта IV (с преобладанием облигатных анаэробов). Отмечена тенденция к увеличению частоты выявления варианта V (с преобладанием транзитной микробиоты, *Lactobacillus spp.*), что может быть обусловлено несоблюдением правил подготовки к сбору эякулята (воздержание от половых контактов в течение предшествующих 3–5 дней). Примечательно, что в образцах с низкой ОБМ чаще всего выявляли вариант III и вариант VI (смешанный, без преобладания определенной группы), по мере увеличения ОБМ структура микробиоты изменялась.

Вариант I (с преобладанием грамположительных факультативно анаэробных МО) по результатам исследования методом ПЦР-РВ был выявлен только в 17,4% случаев, в то время как при культуральном исследовании данная группа бактерий была выявлена в 50% образцов.

Сравнение результатов культурального метода и ПЦР-РВ

Результаты культурального исследования были подтверждены методом ПЦР-РВ в 100% случаев — при получении роста чистой культуры определенного микроорганизма были получены положительные сигналы в соответствующей группе в тесте Андрофлор. Однако при использовании ПЦР-РВ во всех образцах были обнаружены другие группы

микроорганизмов, отсутствовавшие в посевах. Особо стоит отметить, что во всех образцах с помощью ПЦР-РВ были идентифицированы некультивируемые *in vitro* облигатные анаэробы.

При использовании ПЦР-РВ микрофлора была обнаружена во всех 14 «стерильных» пробах эякулята. В данных образцах чаще всего определяли вариант III (с преобладанием группы *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.*) — 5 (35,7%) из 14 проб и вариант I (с преобладанием грамположительных факультативно анаэробных МО) — 4 (28,5%) из 14 проб. Варианту IV (с преобладанием облигатных анаэробов) выявленная микробиота соответствовала в 2 (14,3%) пробах; на варианты II, V и VI — приходилось по одной пробе (7,2%). ОБМ в этой группе проб была менее 10^4 ГЭ/мл, что может отчасти объяснить отсутствие роста при культуральном исследовании.

Далее анализировали, насколько часто микроорганизм, выявленный в наибольшем количестве при культивировании, совпадал с преобладающей группой бактерий по данным ПЦР-РВ (табл. 2).

Результаты культурального исследования полностью соответствовали результатам ПЦР-РВ только в 21 (24,4%) из 86 случаев. В этих образцах единственный выделенный вид микроорганизмов или численно превышающий количество других выделенных видов при культуральном исследовании относился к преобладающей группе микроорганизмов по данным ПЦР-РВ. В остальных случаях микробиота при культуральном исследовании либо отсутствовала (14 (16,8%)), либо спектр выявленных или численно преобладающих микроорганизмов отличался.

Количество выявленных при ПЦР-РВ микроорганизмов совпадало с количеством, определенным при культуральном исследовании, в 41 (47,7%) из 86 проб; превышало в 10–1000 раз — в 38 (44%) образцах. В 7 (8,3%) образцах количество выявленных микроорганизмов в ПЦР-РВ отличалось от количества, определенного методом посева, в меньшую сторону. Дискордантные результаты были

Таблица 1. Варианты микробиоты эякулята по данным ПЦР-РВ ($n = 86$)

Вариант микробиоты	Преобладающая группа микроорганизмов в микрофлоре эякулята	ОБМ $< 10^3$ ГЭ/мл n (%)	ОБМ $10^3 < 10^4$ ГЭ/мл n (%)	ОБМ $> 10^4$ ГЭ/мл n (%)	Достоверность различий ³
		1	2	3	
Вариант I	Грамположительные факультативно анаэробные микроорганизмы	4 (14,8)	9 (19,6)	2 (15,4)	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
Вариант II	Грамотрицательные факультативно анаэробные микроорганизмы	2 (7,4)	2 (4,4)	0	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
Вариант III	Энтеробактерии/энтерококки ¹	12 (44,4)	8 (17,4)	3 (23,1)	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
Вариант IV	Облигатные анаэробы	2 (7,4)	19 (41,3)	6 (46,2)	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} > 0,05$
Вариант V	Транзитная микрофлора (<i>Lactobacillus spp.</i>)	1 (3,7%)	4 (8,7)	2 (15,4)	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
Вариант VI	Нет преобладающей группы (смешанное микробное сообщество) ²	6 (22,2%)	4 (8,7)	0	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
	Всего в группе	27	46	13	

Примечание: ¹ — данный вариант был предложен в связи с особенностями компоновки теста Андрофлор, в котором бактерии *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* определяются в одной пробирке отдельно от прочих грамположительных и грамотрицательных факультативных анаэробов, но без учета принадлежности к конкретному семейству; ² — критерием для данного варианта микробиоты было присутствие нескольких групп микроорганизмов в равных или незначительно различающихся долях; ³ — достоверность различий рассчитывали по двустороннему критерию Фишера.

обусловлены выявлением в этих образцах при посеве следующих видов бактерий: *S. agalactiae* (в 2 пробах), *S. anginosus* (в 2 пробах), *S. mitis* / *S. oralis*, *S. hominis*, *L. crispatus* — по одному случаю. Дискордантные результаты связаны с тем, что ростовые свойства бактерий *in vitro* могут существенно различаться, а некоторые виды не переносят даже кратковременной транспортировки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При культуральном исследовании образцов эякулята в большинстве случаев были выявлены грамположительные факультативно анаэробные МО, традиционно относимые к нормальной микрофлоре УГТ мужчины. При этом в 43% проб количество их было менее 10^4 КОЕ/мл, что принято оценивать как клинически мало значимое [10]. Присутствие нескольких видов микроорганизмов из числа нормальной микрофлоры в незначительном количестве может свидетельствовать о контаминации проб в процессе сбора.

Результаты культурального исследования были подтверждены методом ПЦР-РВ в 100% случаев — при получении роста чистой культуры определенного микроорганизма были получены положительные сигналы в соответствующей группе в тесте Андрофлор, в том числе во всех 14 «стерильных» пробах эякулята. Отсутствие роста *in vitro* большинства групп микроорганизмов, выявленных методом ПЦР-РВ, вполне объяснимо, так как многие из данных микроорганизмов являются трудно культивируемыми или некультивируемыми [11].

Основные различия между результатами культурального исследования и ПЦР-РВ касались преобладающей в микрофлоре группы микроорганизмов. Полное соответствие по этому параметру было установлено только в 24,4% случаев. Дискордантные результаты могут быть обусловлены двумя причинами: во-первых, различием ростовых свойств бактерий *in vitro*, во-вторых, гибелью некоторых видов при транспортировке. Кроме того, облигатно анаэробные микроорганизмы, присутствующие в эякуляте, не могут быть выявлены при рутинном

культуральном исследовании, что искажает представления о микрофлоре в целом.

Количество выявленных микроорганизмов в 1 мл эякулята различалось в 52,3% образцов. В 44% образцов ОБМ, определяемая методом ПЦР-РВ, была выше в 10–1000 раз по сравнению с культуральным методом. В 7 (8,3%) образцах данный показатель был выше при культуральном исследовании. При этом мы понимаем, что прямое сравнение количеств микроорганизмов, выявленных в эякуляте методом ПЦР-РВ и культуральным методом, не вполне корректно. Эякулят значительно отличается по вязкости и гомогенности, что может приводить к неравномерному распределению микробных клеток в биоматериале. Стоит также отметить, что перед проведением ПЦР-РВ мы дополнительно обрабатывали эякулят средой с муколитиком, что снижало вязкость образца и, возможно, обеспечивало более равномерное распределение микроорганизмов в объеме исследуемого материала.

Полученные в ходе настоящего исследования данные позволяют рекомендовать метод ПЦР-РВ (тест Андрофлор) как альтернативу культуральному исследованию для комплексной оценки микрофлоры эякулята.

ВЫВОДЫ

Параллельное исследование эякулята посредством ПЦР-РВ и культурального метода позволило оценить преимущества ПЦР-РВ (теста Андрофлор) для комплексной оценки микрофлоры данного биологического материала. Использование только культурального метода для оценки микрофлоры эякулята позволяло выявить лишь часть присутствующих в образце микроорганизмов, при этом каждый 6-й образец был «стерильным». Применение ПЦР-РВ позволило идентифицировать от 8 до 15 групп микроорганизмов в количестве 10^2 – 10^6 ГЭ/мл во всех исследованных пробах эякулята, при этом в большинстве проб преобладала одна из групп микроорганизмов. Во всех 86 образцах, кроме вида,

Таблица 2. Сравнение преобладающих групп микроорганизмов по результатам культурального исследования и ПЦР-РВ (n = 86)

Преобладающая группа микроорганизмов по данным ПЦР-РВ	Преобладающая группа микроорганизмов по данным культурального исследования (количество проб)						
	Грамположительные факультативные анаэробы (n = 15)	Грамотрицательные факультативные анаэробы (n = 4)	Энтеробактерии / энтерококки (n = 23)	Облигатные анаэробы (n = 27)	Транзиторная микрофлора (n = 7)	Смешанная микрофлора (n = 10)	Микрофлора отсутствовала
Грамположительные факультативные анаэробы (n = 15)	8	0	2	0	0	1	4
Грамотрицательные факультативные анаэробы (n = 4)	0	0	0	0	0	1	2
Энтеробактерии / энтерококки (n = 23)	9	0	8	0	0	3	3
Облигатные анаэробы (n = 27)	11	1	4	4	1	4	2
Транзиторная микрофлора (n = 7)	5	0	0	0	1	0	1
Смешанная микрофлора (n = 10)	7	0	2	0	0	0	1
Микрофлора отсутствовала	0	0	0	0	0	0	0

выявленного культуральным методом, были обнаружены представители других групп бактерий. Преобладающая группа микроорганизмов в микробиоте эякулята по данным культурального исследования полностью соответствовала результатам ПЦР-РВ только в 24,4% проб, в большинстве случаев получение дискордантных результатов было обусловлено невозможностью выявить при культуральном

исследовании некультивируемые и трудно культивируемые группы облигатно анаэробных бактерий, которые обнаружили с помощью теста Андрофлор. Этиологическая значимость выявления определенных преобладающих групп микроорганизмов и их количеств в эякуляте требуют проведения дальнейшего исследования с учетом клинических данных и диагноза пациента.

Литература

1. Cornelia Gottschick, Zhi-Luo Deng, Marius Vital et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017; 5 (99): 1–15.
2. Hou D, Zhou X, Zhong X, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *FertilSteril*. 2013 Nov; 100(5): 1261–9.
3. Nelson DE, Dong Q, Van der Pol B, et al. Bacterial communities of the coronal sulcus and distal urethra of adolescent males. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36298.
4. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One*. 2014 Oct 23; 9 (10): e110152.
5. Domes T, Lo KC, Grober ED, et al. The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertil Steril*. 2012 May; 97 (5): 1050–5.
6. Mändar R, Punab M, Korrovits P, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol*. 2017 Mar; 24 (3): 211–6.
7. Schuppe H-C, Pilatz A, Hossain H, et al. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Deutsches Aerzteblatt Online*. 2017. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.
8. Божедомов В. А. Хронический простатит: новая парадигма лечения. *Урология*. 2016; (36): 78–90.
9. Инструкция по применению набора реагентов для исследования микрофлоры урогенитального тракта мужчин методом ПЦР в режиме реального времени Андрофлор® Скрин (ООО НПО «ДНК-Технология»). Доступно по ссылке: <http://www.dna-technology.ru/information/aboutamethod/>.
10. Jungwirth A, Diemer T, Kopa Z, et al. EAU Guidelines on Male Infertility. 2017. Available from: https://www.researchgate.net/publication/318239925_EAU_Guidelines_on_Male_Infertility_2017.
11. Aragón IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño MI, et al. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *Eur Urol Focus*. 2018 Jan; 4 (1): 128–38.

References

1. Cornelia Gottschick, Zhi-Luo Deng, Marius Vital et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017; 5 (99): 1–15.
2. Hou D, Zhou X, Zhong X, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *FertilSteril*. 2013 Nov; 100(5): 1261–9.
3. Nelson DE, Dong Q, Van der Pol B, et al. Bacterial communities of the coronal sulcus and distal urethra of adolescent males. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36298.
4. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One*. 2014 Oct 23; 9 (10): e110152.
5. Domes T, Lo KC, Grober ED, et al. The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertil Steril*. 2012 May; 97 (5): 1050–5.
6. Mändar R, Punab M, Korrovits P, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol*. 2017 Mar; 24 (3): 211–6.
7. Schuppe H-C, Pilatz A, Hossain H, et al. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Deutsches Aerzteblatt Online*. 2017. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.
8. Bozhedomov V. A. Hronicheskiy prostatit: novaya paradigma lecheniya. *Urologiya*. 2016; (36): 78–90. Russian.
9. Instrukcija po primeneniju nabora reagentov dlja issledovanija mikroflory urogenital'nogo trakta muzhchin metodom PCR v rezhime real'nogo vremeni Androflor® Skrin (OOO NPO «DNK-Tehnologija»). Dostupno po ssylke: <http://www.dna-technology.ru/information/aboutamethod/>. Russian.
10. Jungwirth A, Diemer T, Kopa Z, et al. EAU Guidelines on Male Infertility. 2017. Available from: https://www.researchgate.net/publication/318239925_EAU_Guidelines_on_Male_Infertility_2017.
11. Aragón IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño MI, et al. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *Eur Urol Focus*. 2018 Jan; 4 (1): 128–38.

ИЗМЕНЕНИЕ КЛЮЧЕВЫХ ПАРАМЕТРОВ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ МОЗГА КРЫС ПРИ ПЕРМАНЕНТНОЙ ИШЕМИИ

А. И. Костюк¹, Д. А. Котова^{1,2}, А. Д. Демидович^{1,3}, А. С. Панова¹, И. В. Кельмансон^{1,4}, В. В. Белоусов^{1,4}✉, Д. С. Билан¹✉

¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

² Биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Химический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Инсульт головного мозга является важнейшей проблемой современного человечества, миллионы людей ежегодно становятся жертвами этого недуга. Несмотря на масштабные исследования в этой области, до сих пор существует недостаток информации о патофизиологии ишемического инсульта. Тщательное изучение изменений биохимических показателей на раннем этапе заболевания позволит установить механизм его протекания и в будущем найти эффективное решение проблемы. Ключевая роль в патогенезе инсульта принадлежит липидам и молекулам, ассоциированным с их биосинтезом и поддержанием их функционального состояния. С одной стороны, при патогенезе инсульта происходит мощный окислительный стресс, который приводит к повреждению молекул, в том числе липидного состава. С другой стороны, из-за нехватки восстановительных эквивалентов останавливается биосинтез новых молекул взамен поврежденных. Целью работы было исследовать изменения в тканях мозга крыс при ишемии таких параметров, как концентрации общего холестерина, свободных жирных кислот (СЖК), малонового диальдегида (МДА), а также уровней восстановленного глутатиона (GSH) и общего НАДФ(Н). В результате исследования выявлено, что через 24 ч с момента начала развития ишемии уровни СЖК, холестерина и GSH существенно снижаются, при этом уровень МДА, маркера перекисного повреждения липидов, увеличивается. Уровень общего пула НАДФ(Н) снижается в 2 раза уже через 6 ч с момента окклюзии сосуда.

Ключевые слова: ишемия, инсульт, перекисное окисление липидов, окислительный стресс, активные формы кислорода

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-15-01175).

Информация о вкладе авторов: Д. С. Билан и В. В. Белоусов планировали экспериментальную работу и писали текст статьи; Д. С. Билан, Д. А. Котова и И. В. Кельмансон осуществляли хирургические манипуляции с животными; А. И. Костюк, Д. А. Котова, А. Д. Демидович и А. С. Панова проводили биохимические измерения.

Соблюдение этических стандартов: эксперименты с животными выполняли в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. Протокол исследования (№ 237 от 14 сентября 2017 г.) был утвержден комиссией ИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием животных.

✉ **Для корреспонденции:** Всеволод Вадимович Белоусов ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; vsevolod.belousov@gmail.com Дмитрий Сергеевич Билан ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; d.s.bilan@gmail.com

Статья получена: 12.12.2018 **Статья принята к печати:** 26.02.2019 **Опубликована онлайн:** 09.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.008

LIPID METABOLIC CHANGES IN RAT BRAIN DURING PERMANENT CEREBRAL ISCHEMIA

Kostyuk AI¹, Kotova DA^{1,2}, Demidovich AD^{1,3}, Panova AS¹, Kelmanson IV^{1,4}, Belousov VV^{1,4}✉, Bilan DS¹✉

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ The Research Institute for Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

With each year, millions of people remain targeted by brain stroke, it still is by all means a global concern of the mankind. Despite all efforts to understand this disease better, there is still a lack of information on pathophysiology of ischemic stroke. Scrutinized data on biochemical changes at early stages of ischemia may help understand the mechanisms of the disorder and possibly reveal ways to finding the cure. The key role in the pathogenesis of stroke belongs to lipids as well as to the molecules associated with their biosynthesis and functionality. On the one hand, stroke evokes a deep oxidative stress leading to damage to biomolecules including lipids while on the other hand, due to the lack of reducing equivalents, the cellular biosynthesis processes are interrupted. The focus of this work was to study the changes taking place in the tissues of rat brain as a result of ischemia including estimation of levels of total cholesterol, FFA, MDA, GSH, and NADP(H). It was shown that in 24 hours from the onset of ischemia, there was a significant decrease in levels of FFA, total cholesterol and GSH, and an increase in the level of MDA, a marker of lipid peroxidation. NADP(H) pool level decreases twice in 6 hours from MCAO.

Keywords: ischemia, stroke, lipid peroxidation, oxidative stress, reactive oxygen species

Funding: the work was supported by the Russian Science Foundation Grant 17-15-01175.

Author contribution: Bilan DS and Belousov VV were responsible for the study design and drafting the manuscript; Bilan DS, Kotova DA and Kelmanson IV performed surgeries; Kostyuk AI, Kotova DA, Demidovich AD and Panova AS performed biochemical measurements.

Compliance with ethical standards: experiments were carried out in compliance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the European Council, dated September 22, 2010. All experimental procedures were approved by The Animal Care and Use Committee of the Institute of Bioorganic Chemistry, RAS on September 14, 2017, Ref. No.237.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vsevolod V. Belousov ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Moscow, 117997; vsevolod.belousov@gmail.com Dmitry S. Bilan ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Moscow, 117997; d.s.bilan@gmail.com

Received: 12.12.2018 **Accepted:** 26.02.2019 **Published online:** 09.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.008

По данным Всемирной организации здравоохранения, инсульт находится на втором месте в числе заболеваний, приводящий к летальному исходу. Более 15 млн людей во всем мире ежегодно становятся жертвами этой болезни, 6 млн из них погибает, 5 млн становятся нетрудоспособными [1]. Ишемический инсульт возникает вследствие стеноза или закупорки сосудов головного мозга, что приводит к нарушению кровоснабжения и быстрому повреждению тканей [2].

Исследования последних лет выявили изменения биохимии клеток мозга, происходящих при развитии инсульта. В частности, состояние гипоксии ткани способствует возрастанию внеклеточной концентрации важного нейромедиатора глутамата и его связыванию с глутаматными рецепторами [3], что приводит к резкому увеличению концентрации внутриклеточного кальция. Неконтролируемая регуляция кальция приводит к активации кальций-зависимых белков и глобальному нарушению регуляции клеточных каскадов [4]. Одновременно с этими происходят другие биохимические процессы, которые приводят к истощению энергетических запасов клетки, изменяют внутриклеточный ионный состав, снижают pH цитоплазмы [5, 6]. На более поздних стадиях патогенеза происходит повреждение ДНК, изменение белкового и липидного состава [7]. Все описанные выше процессы приводят к дисфункции митохондрий и массовой клеточной гибели [8].

Липиды составляют около половины сухой массы мозговой ткани и выполняют важные структурные и метаболические функции. Глицерофосфолипиды и сфинголипиды составляют основную часть клеточных мембран; холестерин входит в состав липидных рафтов — структур, которые влияют на текучесть мембраны, регулируют синаптическую передачу. Поскольку липиды не проходят через гемато-энцефалический барьер, их биосинтез в нервных клетках происходит *de novo*. Одним из ключевых участников синтеза является НАДФ(Н) — основной донор восстановительных эквивалентов в реакциях анаболизма.

При ишемии-реперфузии ткани образуются активные формы кислорода (АФК) [9], которые приводят к окислению липидного состава, что обуславливает увеличение в клетке продуктов перекисного окисления липидов, например, малонового диальдегида, 4-гидроксиноненала [10]. Эти соединения могут быть использованы в качестве маркеров окислительного стресса.

В ответ на внутриклеточное повышение АФК активируются антиоксидантные системы защиты. Глутатион играет ключевую роль в реакциях тиол-дисульфидного обмена клетки [11, 12]. При этом поддержание определенного редокс-состояния пула глутатиона опосредовано НАДФ(Н) зависимыми системами [12]. Таким образом, оба эти параметра играют первостепенную роль в регуляции процессов, направленных против окислительного стресса в условиях ишемического повреждения ткани [13].

Целью настоящего исследования стало определение наиболее важных биохимических параметров, касающихся липидного обмена, в тканях мозга крыс через разные промежутки времени с момента начала развития ишемического повреждения. Оценку уровней метаболитов производили с помощью коммерческих наборов и по стандартным протоколам (МДА, НАДФ(Н)) [14, 15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и хирургические манипуляции

Работу проводили на самцах крыс линии Wistar из питомника лабораторных животных «Пушино» весом 280–330 г. Крыс содержали в виварии ИБХ РАН по три особи в пластмассовых клетках со свободным доступом к воде и пище. Экспериментальная работа (хирургические операции и биохимические тесты) была проведена в течение месяца (июнь 2018 г.).

Окклюзию средней мозговой артерии проводили по ранее описанному протоколу [16]. Использовали ингаляционный наркоз: смесь воздуха с изофлураном (Аерран, Baxter; США). Используемые концентрации: 5% — введение в наркоз; 2% — поддержание во время хирургической операции.

Для обезболивания использовали кетопрофен 5 мг/кг подкожно (Ketonal, Sandoz; Швейцария), местное обезболивание проводили с помощью 2%-го новокаина.

В работе использовали готовые окклюдеры диаметром 0,185 мм (Dосcol; США; кат. No 403756PK10Re).

Подготовка ткани

Для проведения биохимических тестов животные случайным образом были поделены на пять экспериментальных групп по четыре особи в каждой. Контрольная группа включала в себя интактных животных. В остальных четырех группах животным было проведено моделирование перманентной ишемии левого полушария мозга путем окклюзии средней мозговой артерии. После этого биохимический анализ ткани проводили через 1 ч с момента окклюзии сосуда (2-я группа), 3 ч (3-я группа), 6 ч (4-я группа) и через 24 ч (5-я группа).

Для анализа мозг каждого животного был извлечен с последующим удалением мозжечка и обонятельных луковиц. Ткань помещали в предварительно охлажденную фарфоровую ступку и добавляли жидкий азот, после чего тщательно растирали пестиком. Полученный материал взвешивали и хранили при температуре -70°C .

Измерение концентрации свободных жирных кислот

Содержание свободных жирных кислот в образцах мозга определяли при помощи коммерческого набора согласно инструкции производителя (Free Fatty Acid Quantification Assay Kit; Abcam, Англия). Общая схема анализа устроена следующим образом. Сначала свободные жирные кислоты переводят в ацил-КоА под действием ацил-КоА синтетазы. Затем специфичный фермент окисляет полученные тиоэфир, что сопровождается восстановлением бесцветной пробы с образованием флуоресцирующего соединения (Ex. 535 нм; Em. 587 нм).

Ткань размораживали на льду, после чего перетирали в 200 мкл 1% Triton X-100 в чистом хлороформе при помощи ручного гомогенизатора Поттера. Полученный гомогенат инкубировали на льду в течение 30 мин для увеличения эффективности экстракции. Далее образцы центрифугировали в течение 10 мин на максимальной скорости, после чего отбирали органическую фазу. Для извлечения от хлороформа препараты сначала сушили при $+50^{\circ}\text{C}$ в вытяжном шкафу в течение часа, после чего помещали их в вакуумную сушилку еще на один час.

Полученную липидную фракцию растворяли в 200 мкл Fatty Acid Assay Buffer, активно перемешивая.

Для анализа использовали аликвоты объемом от 10 до 40 мкл. Общий объем пробы доводили до 50 мкл раствором Fatty Acid Assay Buffer. Параллельно готовили ряд стандартных растворов с известными концентрациями пальмитиновой кислоты для последующего построения калибровочного графика. В каждую пробу реакционной смеси добавляли по 2 мкл ACS Reagent (препарат с ацил-КоА синтетазной активностью), после чего инкубировали при +37 °С в течение 30 мин. По окончании данного времени ко всем образцам добавляли по 50 мкл смеси следующего состава: 45,6 мкл Assay Buffer; 0,4 мкл Fatty Acid Probe; 2 мкл Enzyme Mix; 2 мкл Enhancer. Образцы перемешивали и вновь инкубировали при +37 °С в течение 30 мин.

Флуоресцентный сигнал каждой пробы регистрировали с помощью прибора Tecan Reader Infinite® 200 PRO (Tecan; Швейцария). Параметры измерения: Em. 587 нм, Ex. 535 нм. По показаниям образцов стандартного ряда определяли зависимость интенсивности флуоресценции от количества свободных жирных кислот в пробе. После этого рассчитывали значения в каждой экспериментальной пробе. Полученные значения нормировали на массу ткани.

Измерение концентрации холестерина

Содержание общего уровня холестерина (как свободного, так и в составе эфиров) в образцах мозга определяли с помощью коммерческого набора согласно инструкции производителя (Cholesterol/Cholesteryl Ester Detection Kit; Abcam, Англия). Принцип анализа основан на окислении холестерина специфическим ферментом холестерин-дегидрогеназой, которое сопровождается восстановлением НАДН. Последний в свою очередь реагирует с чувствительным красителем с образованием продукта, характеризующегося поглощением в области 450 нм.

Ткань размораживали на льду, после чего перетирали ее при помощи ручного гомогенизатора Поттера в 200 мкл смеси следующего состава: 7 частей хлороформа, 11 частей изопропилового спирта, 0,1 часть 10% NP-40 в воде. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин на максимальной скорости, после чего отбирали органическую фазу. Для того чтобы избавиться от хлороформа препараты сначала сушили при +50 °С в вытяжном шкафу в течение часа, после чего помещали их в вакуумную сушилку еще на один час. Полученную липидную фракцию растворяли в 200 мкл Cholesterol Assay Buffer, интенсивно перемешивая.

Для анализа отбирали аликвоты объемом от 10 до 40 мкл. Общий объем доводили до 50 мкл раствором Cholesterol Assay Buffer. Параллельно готовили стандартный ряд растворов с известной концентрацией холестерина для построения калибровочного графика. Далее к реакционной смеси каждой пробы добавляли 2 мкл Esterase (препарат, гидролизующий эфиры холестерина), тщательно перемешивали и инкубировали при +37 °С в течение 30 мин. По окончании данного времени ко всем образцам добавляли по 48 мкл смеси следующего состава: 44 мкл Cholesterol Assay Buffer, 2 мкл Substrate Mix, 2 мкл Cholesterol Enzyme Mix. Образцы перемешивали и вновь оставляли инкубироваться при +37 °С в течение 30 мин для развития окраски.

Значения сигнала в каждой пробе регистрировали с помощью планшетного ридера Tecan Reader Infinite®

200 PRO (Tecan; Швейцария), измеряя поглощение образцов в области 450 нм. По образцам стандартного ряда определяли зависимость сигнала от количества холестерина в пробе. Все рассчитанные значения экспериментальных проб нормировали на исходную массу отобранной ткани.

Измерение концентрации общего пула НАДФ(Н)

Содержание НАДФ(Н) в образцах мозга определяли при помощи анализа, основанного на использовании нитросинего тетразолия (NBT) и феназинметасульфата (PMS). В данной системе НАДФН выступает в качестве донора электронов, восстанавливая PMS, который передает электроны NBT с образованием формазана. Формазан обладает поглощением при длине волны 620 нм. Для визуализации окисленного НАДФ⁺ использовали ферментативную реакцию, в ходе которой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа окисляет глюкозо-6-фосфат, что сопровождается восстановлением кофактора.

Около 300 мг ткани размораживали на льду, после чего перетирали ее при помощи ручного гомогенизатора Поттера в 1,5 мл предварительно охлажденного карбонатного буфера (100 мМ Na₂CO₃, 20 мМ NaHCO₃, 20 мМ никотинамид). Образцы центрифугировали при +4 °С в течение 5 мин на максимальной скорости. От супернатанта отбирали 10 мкл для определения концентрации белка в растворе, а оставшийся объем подвергали дополнительной очистке на колонках Amicon® Ultra 0,5 mL 10K (Merck Millipore; Германия) согласно протоколу производителя.

Для анализа в лунки 96-луночного планшета добавляли по 10 мкл каждого образца. Параллельно готовили стандартный ряд растворов с известным количеством НАДФН. Объем проб доводили до 100 мкл при помощи реакционной смеси следующего состава (из расчета на 10 реакций): 540 мкл MQ, 100 мкл 1 М TRIS-HCl буфера (рН 8,0), 50 мкл 10 мМ NBT, 150 мкл 10 мМ PMS, 50 мкл 100 мМ раствора ЭДТА, 10 мкл 100 мМ глюкозо-6-фосфата. Пробы инкубировали в термостате при +37 °С в течение 5 мин, после чего запускали реакцию добавлением 1 мкл 250 ед./мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Интенсивность поглощения при 620 нм в каждой пробе регистрировали с помощью планшетного ридера Tecan Reader Infinite® 200 PRO (Tecan; Швейцария) в течение 10 мин. Каждая проба была в двух повторах, в одном из случаев мы не добавляли фермент для определения фонового образования формазана под действием компонентов клеточных лизатов. По образцам стандартного ряда определяли зависимость скорости реакции от количества НАДФН в образце. Полученный калибровочный график использовали для определения общей концентрации НАДФ(Н) в экспериментальных пробах. Полученные значения нормировали на концентрацию белка.

Измерение концентрации малонового диальдегида как маркера перекисного окисления липидов

Для определения интенсивности перекисного окисления липидов в исследуемых образцах использовали классический TBARS-анализ с модификациями. В ходе данной процедуры малоновый диальдегид, являющийся одним из основных продуктов перекисного окисления липидов, взаимодействует с двумя молекулами 2-тиобарбитуровой кислоты (ТВА)

с образованием окрашенного соединения, интенсивно поглощающего свет при 532 нм.

Около 100 мг ткани размораживали на льду, после чего перетирали ее при помощи ручного гомогенизатора Поттера в 750 мкл предварительно охлажденной воды степени очистки MQ. В воду добавляли 5 мкл бутилированного гидрокситолуола, растворенного в метаноле в концентрации 10% (w/v), для предотвращения окисления образцов кислородом воздуха. Далее образцы центрифугировали при $3000 \times g$ и $+4^\circ C$ в течение 15 мин для получения растворимой фракции, содержащей клеточные мембраны. На этой стадии от супернатанта отбирали 10 мкл для определения концентрации белка, после чего к 350 мкл образца добавляли 250 мкл 40% трихлоруксусной кислоты для осаждения белков, интенсивно перемешивая пробу. Далее образцы повторно центрифугировали при $3000 \times g$ и $+4^\circ C$ в течение 15 мин.

Для анализа от образцов отбирали по 500 мкл супернатанта, после чего смешивали их с 500 мкл 0,67% ТВА в 0,05 N NaOH. Для приготовления ряда стандартных растворов использовали 0,5 mM 1,1,3,3,-тетраметоксипропан (TMP), последовательно растворенный в 1 мл 96% этилового спирта и 49 мл MQ. Стандартные растворы смешивали с 500 мкл 0,67% ТВА в 0,05 N NaOH, после чего все образцы инкубировали в термостате при $+100^\circ C$ в течение 15 мин. После инкубации в 96-луночный планшет добавляли по 200 мкл каждого образца и регистрировали поглощение при 532 нм с помощью планшетного ридера Tecan Reader Infinite® 200 PRO (Tecan; Швейцария). По образцам стандартного ряда строили калибровочный график и определяли количество малонового диальдегида в каждой экспериментальной пробе. Полученные значения нормировали на концентрацию белка.

Измерение концентрации восстановленной формы глутатиона (GSH)

Содержание восстановленной (GSH) формы глутатиона в образцах мозга определяли при помощи коммерческого набора согласно инструкции производителя (GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit, Fluorometric-Green, Abcam, Англия). Принцип анализа основан на взаимодействии GSH с бесцветным красителем Thiol Green, в ходе чего последний приобретает флуоресцентные свойства (Ex. 490, Em. 520).

Ткань размораживали на льду, после чего перетирали ее при помощи ручного гомогенизатора Поттера в 400 мкл фосфатно-солевого буфера (pH 7,4), содержащего 0,5% NP-40. Полученные гомогенаты центрифугировали на максимальной скорости при $+4^\circ C$ в течение 15 мин. На следующем этапе пробы депротенизировали добавлением 1/5 объема 100% (w/v) трихлоруксусной кислоты (ТХУ). После интенсивного перемешивания и инкубации на льду в течение 10 мин образцы вновь центрифугировали при $12000 \times g$ и $+4^\circ C$ в течение 5 мин. ТХУ нейтрализовали путем добавления в образцы раствора $NaHCO_3$. Наконец, проводили последнее центрифугирование при $13000 \times g$ и $+4^\circ C$ в течение 15 мин.

Для анализа супернатанты разводили в 10 раз раствором Assay Buffer, после чего в 96-луночный планшет вносили по 50 мкл раствора каждого образца. Параллельно готовили стандартный ряд растворов с заданными концентрациями GSH. Далее к пробам добавляли 50 мкл раствора Thiol Green, разбавленного в 100 раз Assay Buffer. После чего пробы инкубировали в темноте в течение часа.

Флуоресцентный сигнал проб регистрировали с помощью планшетного ридера Tecan Reader Infinite® 200 PRO (Tecan; Швейцария). По образцам стандартного ряда определяли зависимость интенсивности флуоресценции от количества глутатиона в пробе. По калибровочному графику определяли количество GSH в каждой пробе. Полученные значения нормировали на исходную массу отобранной ткани.

Измерение концентрации белка в препаратах тканей мозга

Для определения концентрации белка использовали коммерческий набор (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit; Sigma-Aldrich, Германия). Для построения калибровочного графика в каждой серии экспериментов готовили стандартный ряд растворов с известной концентрацией белка бычьего сывороточного альбумина. В пробы добавляли смесь, содержащую 1 часть 4% (w/v) пентагидрата сульфата меди (II) и 50 частей раствора, содержащего бицинхониновую кислоту. Далее образцы инкубировали 30 мин при $+37^\circ C$.

С помощью прибора Tecan Reader Infinite® 200 PRO (Tecan; Швейцария) измеряли поглощение образцов в области 562 нм. По калибровочному графику определяли концентрацию белка в каждой анализируемой пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были определены изменения общего уровня НАДФ(Н) в тканях большого полушария мозга крыс через разные промежутки времени с момента начала развития перманентной ишемии. Значительное изменение данного параметра наблюдается уже через 6 ч после окклюзии средней мозговой артерии. При норме $10,64 \pm 0,57$ мкмоль/мг белка, измеренной в тканях здоровых животных, уровень НАДФ(Н) в области повреждения снизился до значения $4,45 \pm 0,79$ мкмоль/мг белка. Через сутки этот параметр изменился примерно в 7 раз, составив $1,57 \pm 0,46$ мкмоль/мг белка (рис. 1А).

Поскольку НАДФ(Н) вовлечен во многие биосинтетические процессы клеток, в том числе связанные с метаболизмом липидов, мы ожидали зарегистрировать в тканях существенное падение холестерина и жирных кислот. Действительно, уровень общего холестерина (как свободного, так и в составе эфиров) начинал снижаться через 6 ч с момента начала развития патологии: значение $7,29 \pm 0,20$ мкг/мг ткани здоровых животных изменялось до $6,85 \pm 0,1$ мкг/мг ткани. Через сутки в клетках поврежденного полушария уровень холестерина продолжал снижаться до значения $5,95 \pm 0,4$ мкг/мг ткани (рис. 1Б). В первые 3 ч патогенеза разницы в уровне холестерина зафиксировано не было. Однако следует отметить, что наибольшая вариабельность значений была обнаружена в группе животных после 3 ч с момента окклюзии. Возможно, к данному моменту времени у некоторых животных в группе уровень холестерина в клетках поврежденной области начинал снижаться. При определении уровня свободных жирных кислот (СЖК) в тканях мозга нам удалось зафиксировать выраженную разницу лишь через сутки. Показатель $0,31 \pm 0,01$ нмоль/мг, свойственный для здоровой ткани, через сутки снизился до значения $0,25 \pm 0,003$ нмоль/мг (рис. 1В).

Малоновый диальдегид (МДА) является одним из маркеров перекисного окисления липидов. Поэтому в

клетках ткани мозга по мере снижения биосинтетических процессов должны накапливаться также продукты деградации, вызванные повреждением ткани. Однако выраженное увеличение концентрации МДА в тканях большого полушария крыс было зафиксировано лишь на следующие сутки. Уровень МДА определяли также в тканях здоровых животных (846,23±63,41 пмоль/мг белка), поскольку процессы деградации молекул происходят не только при развитии патологических процессов, но и при нормальном функционировании клеток. Патологическое состояние наступает, когда клетки не могут справиться с повреждением и восполнить нефункциональные молекулы синтезом новых. Через 24 ч ишемии в тканях мозга концентрация МДА увеличилась до 1272,61±124,47 пмоль/мг белка (рис. 1Г). В это же время в поврежденной области происходила массовая гибель клеток, которую можно визуализировать прокрашиванием срезов мозга специальным красителем, например, 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым.

Пул глутатиона определяет общее редокс-состояние клеток. В частности, при окислительном повреждении белки антиоксидантных систем, например, глутатион пероксидазы, используют восстановленный глутатион для нейтрализации АФК. Поэтому поддержание редокс-статуса глутатиона является важнейшей задачей клетки. При этом поддержание уровня восстановленного глутатиона в реакции глутатионредуктазы требует наличия

в системе восстановленного пула НАДФН. В течение первых 6 ч с момента наступления ишемии изменений уровня восстановленного глутатиона в тканях мозга крыс зафиксировано не было. Через сутки этот показатель уменьшался примерно в 3 раза по сравнению с тканью здоровых животных, со значения 35,1 мкг/кг до 11,8 мкг/кг ткани, соответственно (рис. 1Д).

Таким образом, исследуемые нами биохимические параметры значительно изменялись лишь через сутки с момента начала развития патологии. Исключение составляет лишь общий уровень НАДФ(Н), который оказался наиболее чувствителен к ишемии ткани и существенно снижался уже через 6 ч.

По оси ОХ представленных графиков указаны временные интервалы получения образцов тканей с момента окклюзии средней мозговой артерии животных. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. В каждой группе по 4 особи.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ишемическое повреждение мозга представляет собой выраженный стресс, сопровождающийся повреждением биологических структур на молекулярном и клеточном уровнях. Защита тканей различных организмов от последствия ишемического повреждения реализуется на нескольких уровнях, а именно на стадиях предотвращения

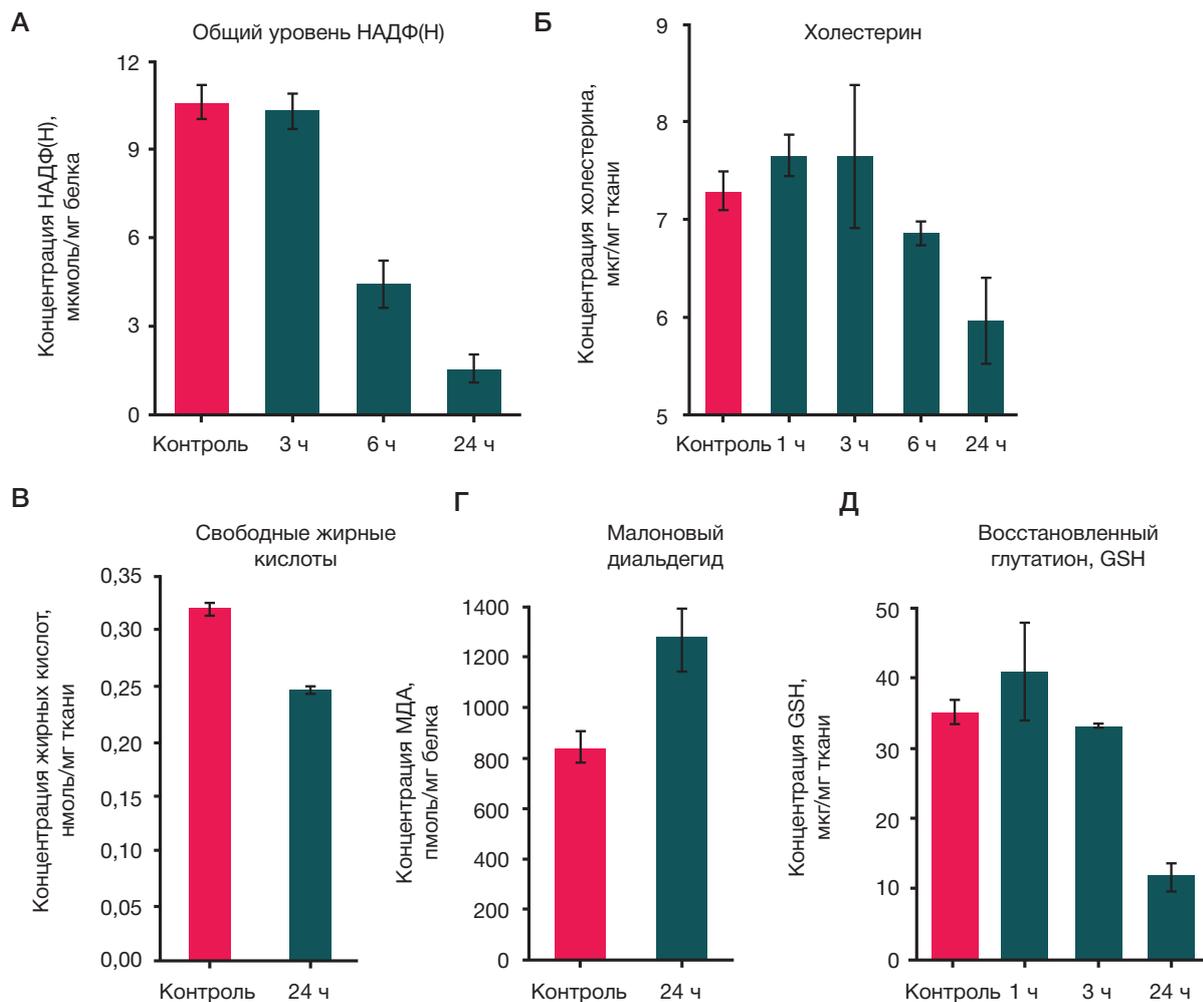


Рис. 1. Изменение биохимических параметров тканей мозга крыс через разные промежутки времени с момента развития перманентной ишемии. Представлена динамика изменения концентрации общего уровня НАДФ(Н) (А), общего холестерина (Б), свободных жирных кислот (В), малонового диальдегида (Г), восстановленного глутатиона (Д)

повреждений, репарации повреждений и полной замены структур, утративших функциональность.

Известно, что ишемический инсульт характеризуется избыточной и нерегулируемой продукцией АФК [9], которые представляют собой высокореакционные соединения, вступающие в широкий спектр взаимодействий с компонентами клетки. Так, одной из основных мишеней АФК в клетке являются липиды, находящиеся как в свободной форме, так и входящие в состав мембран. Перекисное окисление липидов является одним из распространенных процессов взаимодействия липидов с АФК. Данный процесс представляет собой радикальную цепную реакцию, конечными продуктами которой являются ковалентные агрегаты липидов, а также гидроперекиси липидов и эндоперекиси липидов, образующиеся в присутствии кислорода [10]. Последние, в свою очередь, вступают во внутримолекулярные перегруппировки с последующей фрагментацией углеводородных хвостов. Именно поэтому окислительный стресс в липидной фазе приводит к увеличению концентрации низкомолекулярных карбонильных соединений, таких как малоновый диальдегид (МДА). Большая часть методов, направленных на выявление окислительного стресса, так или иначе базируется на регистрации соединений данного класса [17, 18].

Взаимодействие липидов с активными формами кислорода может приводить к высвобождению свободных жирных кислот. Кроме того, гибель клеток в очагах ишемии сопровождается также гидролизом липидов [19]. Известно, что свободные жирные кислоты могут подвергаться автоокислению, кроме того, метаболизм арахидоновой кислоты по циклооксигеназному пути включает в себя гидроперекиси липидов и приводит непосредственно к образованию радикалов кислорода [10, 20]. В конечном счете, перечисленные факторы способствуют еще более выраженному процессу перекисного окисления.

На практике во многих исследованиях с участием пациентов или с использованием лабораторных животных детектируют уровень МДА в крови. Есть данные о том, что в первые 24 часа после ишемии уровень малонового диальдегида значительно повышается, и высокая концентрация сохраняется на протяжении 7 дней [21], показана корреляция данного параметра со смертностью пациентов, переживших инсульт. Оценка концентрации МДА в клетках головного мозга при ишемическом инсульте может дать ценную информацию о степени поражения тканей [22].

В нашей работе была использована модель перманентной окклюзии средней мозговой артерии крыс. В данных условиях зафиксировать детектируемое увеличение концентрации малонового диальдегида удалось лишь через 24 часа с момента окклюзии. Для получения полной картины происходящего в дальнейшем необходимо провести подобного рода исследования на модели ишемии-реперфузии, подразумевающей восстановление кровотока в поврежденной области. Считается, что именно реперфузия является основным мощным источником генерации АФК. Поэтому можно предположить, что гибель клеток при перманентной ишемии происходит главным образом не из-за перекисного окисления липидов. При этом очаг мертвой ткани в данной системе визуализируется уже через несколько часов с момента окклюзии сосуда. В то же время используемый нами подход TBARS-анализа крайне подвержен артефактам, вносимым на стадии пробоподготовки. Добавление антиоксидантов по типу бутилированного гидрокситолуола позволяет снизить

образование малонового диальдегида под действием атмосферного кислорода, однако не предотвращает его полностью. Таким образом, зарегистрировать незначительное повышение концентрации МДА на фоне контроля становится крайне затруднительным.

В качестве одного из маркеров редокс-состояния клеток использовали концентрацию восстановленного глутатиона (GSH). Так же как и в случае малонового диальдегида, мы не наблюдали изменения концентрации GSH в ходе активной фазы ишемического повреждения, однако его количество в ткани значительно падало спустя сутки после окклюзии. Поскольку восстановленный глутатион участвует в реакциях тиол-дисульфидного обмена, то при увеличении концентрации активных форм кислорода он переходит в окисленное состояние за счет активации ферментов антиоксидантной системы. Из этого следует, что заметное увеличение окисленных липидов и дальнейшая гибель клетки приводят к значительному уменьшению восстановленного глутатиона. Однако для однозначных выводов требуются дополнительные исследования, в том числе на модели ишемии-реперфузии. С одной стороны, продолжительное перекисное окисление может приводить к истощению пула GSH; с другой стороны, истощение пула GSH может приводить к тому, что перекисное окисление, которое до этого могло быть сдержано, начинает вызывать выраженный повреждающий эффект. Наконец, уменьшение концентрации GSH может происходить по причинам, не связанным с работой антиоксидантных систем в регионах мембран. Например, некротизация ткани в принципе будет сопровождаться неспособностью клетки поддерживать пул глутатиона в восстановленном состоянии из-за нарушения условий работы соответствующих ферментативных систем, а также недостатка восстанавливающих эквивалентов.

На исследуемой модели мы показали, что концентрация общего пула НАДФ(Н) снижается в 2 раза уже через 6 ч после окклюзии, а через 24 ч падение достигает 7 раз. Можно предположить, что снижение общего уровня НАДФ(Н) негативно сказывается на эффективности работы как антиоксидантных систем, так и анаболических процессов. Возможно, этот фактор вносит свой вклад в падение пула GSH и увеличение степени перекисного окисления липидов, о чем говорилось ранее.

Не все липиды, поврежденные в ходе перекисного окисления, могут быть подвержены репарации. Поэтому мы предполагаем, что в ходе ишемического повреждения мозга анаболические пути, направленные на синтез данных соединений, будут усилены для замены поврежденных компонентов новыми. Известно, что значение пула НАДФ(Н) напрямую связано с эффективностью биосинтеза жирных кислот и холестерина, поскольку данные метаболические пути требуют восстановительных эквивалентов. Как было сказано выше, на исследуемой модели мы наблюдали изменение общей концентрации пула НАДФ(Н), что может отразиться на эффективности обсуждаемых процессов.

Определению профиля изменения уровня свободных жирных кислот (СЖК) в плазме крови посвящено большое количество клинических и лабораторных исследований, поскольку данный параметр является потенциальным биомаркером раннего этапа ишемического инсульта. Во время инсульта происходит гидролиз фосфолипидов мозга, и в кровь высвобождаются СЖК, с чем, возможно, связано повышение их уровня в плазме в течение первых часов [23]. Также имеются данные, в которых показана корреляция уровня СЖК с тяжестью заболевания:

чем выше значение параметра, тем тяжелее состояние пациента [24, 25]. В то же время изменения профиля жирных кислот в тканях головного мозга мало изучены, несмотря на их важную метаболическую роль.

В данной работе мы определяли уровень СЖК в тканях большого полушария крыс. Анализ образцов проводили через разные промежутки времени с момента окклюзии. Нам удалось зафиксировать значительное уменьшение параметра только через 24 ч после окклюзии; в острой фазе инсульта уровень СЖК совпадал с уровнем СЖК в контрольной группе. Таким образом, мы не обнаружили данных, которые бы очевидно свидетельствовали в пользу усиления синтеза жирных кислот для возмещения поврежденных компонентов мембран. Уменьшение концентрации свободных жирных кислот через сутки после окклюзии, по всей видимости, связано с гибелью клеток, которая сопровождается истощением пула НАДФ(Н), нарушением условий работы ферментов и другими факторами. На основе этого наблюдения можно предположить, что в модели перманентной ишемии крыс гидролизованные в ходе гибели клеток липиды не накапливаются в мозговой ткани.

Аналогичные данные получены и для концентрации холестерина, однако в этом случае наблюдаемое снижение значения параметра происходит раньше (уже через 6 ч с момента операции). Кроме того, концентрации холестерина и СЖК уменьшаются одинаково через 24 ч после окклюзии относительно исходного уровня метаболитов (в 1,24 раза для жирных кислот и в 1,27 раз для холестерина).

Выводы

На модели перманентной ишемии головного мозга были исследованы следующие параметры: концентрация общего холестерина, свободных жирных кислот (СЖК), малонового диальдегида (МДА), а также уровни восстановленного глутатиона (GSH) и общего НАДФ(Н). В результате данного исследования было выявлено, что уровни СЖК, холестерина и GSH существенно снижаются через 24 ч с момента начала развития ишемии, при этом увеличивается уровень МДА, являющегося маркером перекисного повреждения липидов. Уровень общего пула НАДФ(Н) снижается в 2 раза уже через 6 ч с момента окклюзии сосуда.

Литература

- World Health Organization. Top ten causes of death. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> (accessed August 19, 2012).
- Hinkle JL, Guanci MM. Acute Ischemic Stroke Review. *Journal of Neuroscience Nursing*. 2007; 39 (5): 285–93. PubMed PMID: 17966295.
- Krzyżanowska W, Pomierny B, Filip M, Pera J. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014; 35 (4): 444–62. PubMed PMID: 24681894.
- Berlucchi L, Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005; 360 (1464): 2255–8. PubMed PMID: 16321795.
- Klogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*. 2016; (7): 113–70 PubMed PMID: 28135002.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012; (298): 229–317. PubMed PMID: 22878108.
- Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative Stress and Its Role in the Pathogenesis of Ischaemic Stroke. *International Journal of Stroke*. 2009; 4 (6): 461–70. PubMed PMID: 19930058.
- Lesnfsky EJ, Chen Q, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion: implications for novel therapies. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2017; (57): 535–65. PubMed PMID: 27860548.
- Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; (29): 2571–83. PubMed PMID: 9299379.
- Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 482 (3): 419–25. PubMed PMID: 28212725.
- Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel)*. 2018; 7 (5): 62. PubMed PMID: 29702624.
- Билан Д. С., Шохина А. Г., Лукьянов С. А., Белоусов В. В. Основные редокс-пары клетки. *Биоорганическая химия*. 2015; (41): 385–402.
- Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research*. 2004; 79 (1–2): 157–165. PubMed PMID: 15573410.
- Garcia YJ, Rodriguez-Malaver AJ, Penáloza N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005; (144): 127–35. PubMed PMID: 15848246.
- Charis WT, Scott MD. Single Extraction Method for the Spectrophotometric Quantification of Oxidized and Reduced Pyridine Nucleotides in Erythrocytes. *Analytical Biochemistry*. 1994; (222): 417–26. PubMed PMID: 7864367.
- Uluc K, Miranpuri A, Kujoth GC, Akture E, Baskaya MK. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Vis Exp*. 2011 Feb 5; (48). PubMed PMID: 21339721.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 1990; 15 (4): 129–35. PubMed PMID: 2187293.
- Ceconi C, Cargnoni A, Pasini E, Condorelli E, Currello S, Ferrari R. Evaluation of phospholipid peroxidation as malondialdehyde during myocardial ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1991; 260 (4 Pt 2): H1057–61. PubMed PMID: 2012211.
- Bazan NG. Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Lipids and Lipid Metabolism*. 1970; 218 (1): 1–10. PubMed PMID: 5473492.
- Braughler JM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 1989; (6): 289–301. PubMed PMID: 266366.
- Cojocar IM, Cojocar M, Sapira V, Ionescu A. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med*. 2013 Apr-Jun; 51 (2): 97–106. PubMed PMID: 24294813.
- Lorente L, Martin MM, Perez-Cejas A, Abreu-Gonzalez P, Ramos L, Argueso M et al. Association between total antioxidant capacity and mortality in ischemic stroke patients. *Ann Intensive Care*. 2016; 6 (1): 39. PubMed PMID: 27107565.
- Golovko SA, Golovko MI. Plasma Unesterified Fatty-Acid Profile Is Dramatically and Acutely Changed under Ischemic Stroke in the Mouse Model. *Lipids*. 2018; 52 (6): 641–645. PubMed PMID: 30206953.
- Niu Z, Hu H, Tang F. High Free Fatty Acid Levels Are Associated with Stroke Recurrence and Poor Functional Outcome in Chinese Patients with Ischemic Stroke. *J Nutr Health Aging*. 2017; 21 (10):

- 1102–1106. PubMed PMID: 29188867.
25. Wang X, Feng A, Zhu C. Cerebrospinal fluid levels of free fatty acid associated with ischemic stroke recurrence and functional outcome. *Neurol Sci.* 2016; 37 (9): 1525–9. PubMed PMID: 27245354.

References

- World Health Organization. Top ten causes of death. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> (accessed August 19, 2012).
- Hinkle JL, Guanci MM. Acute Ischemic Stroke Review. *Journal of Neuroscience Nursing.* 2007; 39 (5): 285–93. PubMed PMID: 17966295.
- Krzyżanowska W, Pomierny B, Filip M, Pera J. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? *Acta Pharmacologica Sinica.* 2014; 35 (4): 444–62. PubMed PMID: 24681894.
- Berliocchi L, Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005; 360 (1464): 2255–8. PubMed PMID: 16321795.
- Klogeris T, Baines CP, Krenz M, Korhuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol.* 2016; (7): 113–70 PubMed PMID: 28135002.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korhuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012; (298): 229–317. PubMed PMID: 22878108.
- Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative Stress and Its Role in the Pathogenesis of Ischaemic Stroke. *International Journal of Stroke.* 2009; 4 (6): 461–70. PubMed PMID: 19930058.
- Lesnefsky EJ, Chen Q, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion: implications for novel therapies. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 2017; (57): 535–65. PubMed PMID: 27860548.
- Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; (29): 2571–83. PubMed PMID: 9299379.
- Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 482 (3): 419–25. PubMed PMID: 28212725.
- Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel).* 2018; 7 (5): 62. PubMed PMID: 29702624.
- Bilan DS, Shohina AG, Lukjanov SA, Belousov VV. Osnovnye redoks-pary kletki. *Bioorganicheskaya himija.* 2015; (41): 385–402. Russian.
- Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research.* 2004; 79 (1–2): 157–165. PubMed PMID: 15573410.
- Garcia YJ, Rodriguez-Malaver AJ, Penñaloza N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *Journal of Neuroscience Methods.* 2005; (144): 127–35. PubMed PMID: 15848246.
- Charis WT, Scott MD. Single Extraction Method for the Spectrophotometric Quantification of Oxidized and Reduced Pyridine Nucleotides in Erythrocytes. *Analytical Biochemistry.* 1994; (222): 417–26. PubMed PMID: 7864367.
- Uluc K, Miranpuri A, Kujoth GC, Akture E, Baskaya MK. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Vis Exp.* 2011 Feb 5; (48). PubMed PMID: 21339721.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences.* 1990; 15 (4): 129–35. PubMed PMID: 2187293.
- Ceconi C, Cargnoni A, Pasini E, Condorelli E, Curello S, Ferrari R. Evaluation of phospholipid peroxidation as malondialdehyde during myocardial ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1991; 260 (4 Pt 2): H1057–61. PubMed PMID: 2012211.
- Bazan NG. Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Lipids and Lipid Metabolism.* 1970; 218 (1): 1–10. PubMed PMID: 5473492.
- Braugher JM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1989; (6): 289–301. PubMed PMID: 266366.
- Cojocar IM, Cojocar M, Sapira V, Ionescu A. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med.* 2013 Apr-Jun; 51 (2): 97–106. PubMed PMID: 24294813.
- Lorente L, Martin MM, Perez-Cejas A, Abreu-Gonzalez P, Ramos L, Argueso M et al. Association between total antioxidant capacity and mortality in ischemic stroke patients. *Ann Intensive Care.* 2016; 6 (1): 39. PubMed PMID: 27107565.
- Golovko SA, Golovko MI. Plasma Unesterified Fatty-Acid Profile Is Dramatically and Acutely Changed under Ischemic Stroke in the Mouse Model. *Lipids.* 2018; 52 (6): 641–645. PubMed PMID: 30206953.
- Niu Z, Hu H, Tang F. High Free Fatty Acid Levels Are Associated with Stroke Recurrence and Poor Functional Outcome in Chinese Patients with Ischemic Stroke. *J Nutr Health Aging.* 2017; 21 (10): 1102–1106. PubMed PMID: 29188867.
- Wang X, Feng A, Zhu C. Cerebrospinal fluid levels of free fatty acid associated with ischemic stroke recurrence and functional outcome. *Neurol Sci.* 2016; 37 (9): 1525–9. PubMed PMID: 27245354.

ОСНОВНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ СИМПТОМЫ ПРИ РАНЕНИЯХ СЕРДЦА

В. В. Масляков ✉, Е. В. Крюков, В. Г. Барсуков, К. Г. Куркин, П. А. Доржиев, В. Р. Горбелик

Саратовский медицинский университет «Реавиз», Саратов, Россия

Ранения сердца в мирное время нельзя отнести к самым распространенным, однако повреждение этого органа угрожает жизни, и своевременная диагностика влияет на спасение жизни. В связи с этим актуальным является выявление основных признаков повреждения сердца. Целью исследования было провести анализ основных клинических симптомов, возникающих при различных ранениях сердца. Был проведен ретроспективный анализ основных симптомов, возникающих при различных ранениях груди с повреждением сердца у 86 пациентов, находившихся на лечении в экстренном хирургическом отделении городской больницы города Энгельса в период с 1991 по 2017 г. Из общего количества пациентов колото-резаные ранения были зарегистрированы в 41 (47,6%), огнестрельные — в 45 (52,3%) случаях. При ранении груди только ранение сердца наблюдалось в 23 (26,7%) случаях, в остальных 63 (73,2%) случаях зарегистрированы повреждения других органов. Установлено, что различные ранения сердца имеют неодинаковую клиническую картину: она более выражена при колото-резаных и менее выражена при огнестрельных ранениях, что необходимо учитывать при поступлении таких пациентов. Диагностические ошибки при колото-резаных ранениях сердца встречаются в 9,7% случаев, при огнестрельных ранениях — в 17,7% случаев. Наиболее выражены клинические симптомы при колото-резаных ранениях сердца.

Ключевые слова: ранения сердца, диагностика, диагностические ошибки

Информация о вкладе авторов: В. Г. Барсуков — разработка общей концепции и дизайна исследования; В. Р. Горбелик — сбор, анализ и интерпретация данных; К. Г. Куркин, П. А. Доржиев — написание рукописи; В. В. Масляков — составление проекта и первичного варианта рукописи, критическая оценка интеллектуального содержания рукописи; В. В. Масляков, Е. В. Крюков — принятие окончательного решения о готовности рукописи к публикации.

Соблюдение этических стандартов: исследование было одобрено местным этическим комитетом Саратовского медицинского университета «Реавиз» (протокол № 12 от 21 декабря 2018 г.). Все пациенты дали письменное информированное добровольное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Владимирович Масляков
ул. Верхний рынок, корпус 10, г. Саратов, 410012; e-mail: maslyakov@inbox.ru

Статья получена: 03.07.2018 **Статья принята к печати:** 17.07.2018 **Опубликована онлайн:** 27.02.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.003

HEART INJURIES: MAIN CLINICAL SYMPTOMS

Maslyakov VV ✉, Krjukov EV, Barsukov VG, Kurkin KG, Dorzhiev PA, Gorbelyk VR

Reaviz Medical University, Saratov, Russia

Injuries to the heart are uncommon in peacetime, yet they result in life-threatening conditions, which makes timely diagnostics a crucial factor in saving patients' lives. In this connection, it is important to define the main signs of heart injuries. This study aimed to analyze the basic clinical symptoms associated with various wounds to the heart. We have retrospectively analyzed such symptoms registered in 86 patients with varying chest injuries that affect the heart. All patients were treated in the emergency surgery unit of the Engels Town Hospital from 1991 to 2017. 41 (47.6%) patient had stab wounds, and there were 45 (52.3%) cases of gunshot wounds. 23 (26.7%) patients had chest injuries affecting heart exclusively, while for 63 (73.2%) the consequences were wounds to other organs. We found that the clinical picture depends on the kind of injury to the heart: stab and slash wounds translate into more pronounced symptoms, while gunshot wounds do not produce such an effect. Accepting patients, practitioners should take this fact into account. The misdiagnosis rate for stab and slash heart wounds is 9.7%, that for gunshot wounds — 17.7%, the latter being the result of vagueness of the clinical picture. The clinical signs are most pronounced in the cases of stab and slash wounds to the heart.

Keywords: heart wounds, diagnostics, diagnostic mistakes

Author contribution: Barsukov VG — study design and general concept development; Gorbelyk VR — data collection, analysis and interpretation; Kurkin KG, Dorzhiev PA — manuscript writing; Maslyakov VV — drafting the manuscript, compilation of its first version and critical evaluation of the content; Maslyakov VV, Krjukov EV — final decision on the manuscript's readiness for publication.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Reaviz Medical University local ethics committee (minutes #12 of December 21, 2018). All patients signed the informed voluntary consent form.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir V. Maslyakov
Verkhny Rynok 10, Saratov, 410012; e-mail: maslyakov@inbox.ru

Received: 03.07.2018 **Accepted:** 17.07.2018 **Published online:** 27.02.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.003

По литературным данным, ранения сердца, возникающие при проникающих травмах грудной клетки, составляют 10–19,5% [1, 2, 3, 4, 5]. При этом летальность достигает 50% [6–8]. Основными причинами летальных исходов являются массивная кровопотеря, острая тампонада сердца, обширные разрушения внутрисердечных структур [3–7]. Среди частых осложнений, появляющихся в ближайшем послеоперационном периоде у пострадавших с ранениями сердца, отмечают перикардит, посттравматический пульпит, плеврит [9–11], ишемию миокарда, нагноение послеоперационной раны [12–15]. Диагностика ранения сердца основана на наличии раны в проекции сердца и признаках повреждения сердца. В большинстве случаев диагноз ставят только на основании осмотра больного.

Главная задача хирурга — в очень ограниченный срок диагностировать ранение сердца и как можно быстрее прооперировать больного.

Цель исследования — провести анализ основных клинических симптомов при различных ранениях сердца.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели был проведен ретроспективный анализ основных симптомов при различных ранениях груди с ранением сердца 86 пациентов, находившихся на лечении в экстренном хирургическом отделении городской больницы города Энгельса в период с 1991 по 2017 г.

Критерии включения в исследование: наличие огнестрельного или колото-резаного ранения груди с ранением сердца; возраст от 18 до 50 лет. Критерии исключения: возраст моложе 18 лет; агональное состояние в момент поступления; наличие сочетанных поврежденных головы, шеи, конечностей.

Из общего количества пациентов колото-резаные ранения были зарегистрированы в 41 (47,6%), огнестрельные — в 45 (52,3%) случаях. При ранении груди только ранение сердца наблюдалось в 23 (26,7%) случаях, в остальных 63 (73,2%) зарегистрированы повреждения других органов, в 4 (4,6%) наблюдениях помимо ранения груди отмечалось ранение живота. При этом отмечено ранение легкого в 52 (85,7%) случаях, перелом ребер в 4 (6,3%), ранение грудного отдела пищевода — 3 (4,7%), ранение нижней полой вены в 2 (3,1%) и ранение диафрагмы и печени в 1 (1,5%) случае. Необходимо отметить, что у всех пострадавших размер ран перикарда не превышал 3 см. В полости перикарда было обнаружено от 300 до 700 мл крови. У большинства пострадавших раны сердца тампонируют сгустки. Из общего количества раненых непроникающие ранения были отмечены у 46 (53,4%) пациентов, проникающие ранения были выявлены в 40 (46,5%) случаях. В группе с колото-резаными ранениями проникающие ранения сердца были в 38 (44,1%) случаях, непроникающие в 3 (4,5%) случаях, в группе с огнестрельными ранениями преобладали непроникающие ранения, которые были зарегистрированы у 43 (50%) пациентов, а проникающие — у 2 (2,3%). Во всех случаях проникающие ранения носили точечный характер.

Помимо гемоперикарда у 75 (87,2%) пациентов выявлен гемоторакс. При этом у 58 (77,3%) пострадавших его объем составил 500 мл, у 14 (18,6%) — около 1 л и у 3 (4%) выявлен тотальный гемоторакс. Все поступившие были мужского пола, средний возраст составил 31 ± 2 года.

При ранениях сердца одним из важных факторов, влияющих на прогноз, является временной фактор. В результате проведенного анализа было установлено, что с момента ранения до момента доставки в лечебное учреждение при колото-резаных ранениях груди проходило $26,7 \pm 5$ мин, а при огнестрельных ранениях — $21,3 \pm 6$ мин. Большинство больных с колото-резаными ранами груди были доставлены машиной скорой помощи (37 человек (43%)), попутным транспортом при таком ранении было доставлено 4 (4,7%). В группе больных с огнестрельными ранениями медицинским транспортом были доставлены все больные. В связи с тем, что большинство раненых были доставлены специализированным транспортом, на догоспитальном этапе большинству пациентов начали проводить лечебные мероприятия: выполнение инфузионной терапии (чаще всего использовали раствор полиглюкина, который вводили внутривенно капельно со скоростью 60–80 капель/мин в количестве 100–1000 мл) — в 79 (91,8%) случаях, обезболивание ненаркотическими анальгетиками — в 56 (65,1%) случаях, перевязка раны — в 83 (96,5%) случаях, из них окклюзионные повязки — у 74 (86%) пациентов, что, несомненно, оказало влияние на исход.

Из общего количества пациентов, доставленных в лечебное учреждение, в момент поступления шок различной степени тяжести был зарегистрирован в 67 (77,9%) случаях, из них при колото-резаных ранениях в 27 (31,3%) случаях, при огнестрельных ранениях — в 40 (46,5%). Из представленных данных видно, что в группе пациентов с огнестрельными ранениями отмечалось

статистически достоверное ($p < 0,05$) преобладание пациентов с шоком. Распределение пациентов по степени шока было следующим: шок I степени был зарегистрирован у 34 (39,5%) пациентов, шок II степени был отмечен у 26 (30,2%) пациентов и шок III степени у 7 (8,1%). Таким образом, у большинства пациентов в момент поступления был отмечен шок I или II степени.

Оценку тяжести пациентов в баллах в момент поступления проводили по шкале AIS: 1 — незначительная; 2 — средняя; 3 — значительная, но не угрожающая жизни; 4 — выраженная, с угрозой для жизни; 5 — критическая, выживание сомнительно; повреждения с показателем 6 баллов являются несовместимыми с жизнью. В результате оценки по данной шкале были получены следующие результаты: в группе с колото-резаными ранениями 21 (24,4%) пациент получил оценку 2 балла; 12 (13,9%) — 3 балла, еще 8 (9,3%) — 4 балла. В группе с огнестрельными ранениями 18 (20,9%) пациентов получили 2 балла; 7 (8,1%) — 3 балла; 11 (12,7%) — 4 балла, еще 9 (10,4%) — 5 баллов. Таким образом, в группе с огнестрельными ранениями были наиболее тяжелые пациенты.

При оценке локализации ранения использовали термин «сердечная зона», которая ограничена вторым ребром сверху, подреберной линией снизу, среднеключичной линией справа и передней подмышечной линией слева. В наших наблюдениях ранения в данной зоне были отмечены в 50 (58,1%) случаях, из них при колото-резаных ранениях — в 38 (92,6%) случаях, при огнестрельных ранениях — в 12 (26,6%) случаях.

Из общего количества поступивших, у 84 пациентов выполнили передне-боковую торакотомия, у одного пациента — стернотомия, еще у одного — лапаротомия. Узловыми швами рана сердца была ушита 96,7% пострадавшим, П-образными швами — 3,3% больных. Всем пациентам перикард ушит отдельными наводящими швами, плевральная полость дренирована во II и VII межреберьях.

Необходимо подчеркнуть, что больница скорой медицинской помощи является травмацентром II уровня, в котором возможно выполнение УЗИ круглосуточно, однако в наших наблюдениях данное исследование не было выполнено, что, несомненно, повлияло на результаты, так как применение УЗИ облегчило бы диагностику и уменьшило количество диагностических ошибок.

Данные были обработаны с использованием персонального компьютера и программы для обработки и анализа статистической информации «Excel 2007», входящей в пакет «Microsoft Office 2007». Статистически достоверным считали различие между сравниваемыми величинами при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Симптоматика проникающих ранений сердца включает признаки быстро нарастающего внутреннего кровотечения, тампонады сердца и шока. Основные симптомы, выявленные у пациентов с ранениями сердца, представлены в таблице.

У больных с колото-резаными ранениями сердца выявлено больше клинических симптомов. Наиболее частыми были локализация раны в области сердца — 38 (92,6%) случаев и тахикардия (более 90 уд./мин) — 38 (92,6%) случаев, а также расширение перкуторных границ сердечной тупости — 31 (75,6%) случай. Возникшую тахикардию можно объяснить компенсаторной реакцией организма на острую кровопотерю. Затем по частоте

следовали такие симптомы, как боли в области сердца — у 28 (68,2%), венозная гипертензия — у 27 (65,8%), артериальная гипотония, обусловленная геморрагическим шоком, — у 25 (60,9%), одышка — у 23 (24,3%), отсутствие пульса на периферических артериях — у 23 (56%) пациентов.

На последнем месте по частоте встречаемости были следующие симптомы: ощущение нехватки воздуха — 16 (39%), набухание вен шеи — 10 (11,6%), цианоз лица и шеи — 9 (21,9%) случаев. Таким образом, колото-резаные ранения сердца имеют довольно выраженную клиническую картину, при этом на первый план выходят признаки геморрагического шока и тампонады сердца. Стертая клиническая картина при этих ранениях была отмечена только в 6 (14,6%) наблюдениях. Данные больные были доставлены в относительно удовлетворительном состоянии, без признаков шока и тампонады сердца. Все это способствовало тому, что диагноз ранения сердца был поставлен в момент поступления, и большинство пациентов, минуя приемный покой, доставили в операционную, где было начато выполнение оперативного вмешательства. В данной группе больных первичная хирургическая обработка (ПХО) была выполнена только в 10 (24,3%) случаях, в остальных 13 (31,7%) выполняли торакотомии. Дополнительные методы исследования использовали у 17 (41,4%) пациентов, в большинстве случаев для этого использовали рентгенографию органов грудной клетки в прямой проекции и электрокардиографии (ЭКГ), в подавляющем большинстве эти исследования проводили в условиях операционной. Наличие выраженной клинической картины при колото-резаных ранениях сердца привело к тому, что количество диагностических ошибок в этом случае было минимальным; задержка с оперативным вмешательством в этой группе больных произошла у 4 (9,7%) пациентов. Диагностические ошибки в этих случаях были вызваны стертостью картины ранения, при этом всем больным выполнили диагностические исследования (рентгенографию органов грудной клетки, ЭКГ) на которых не было выявлено признаков ранения и тампонады сердца, а также ПХО раны. Торакотомия была выполнена через 3–4 ч от момента поступления больных в стационар в связи с признаками геморрагического шока.

Несколько другая клиническая картина отмечалась в случаях огнестрельных ранений груди, сопровождающихся ранениями сердца. Так, локализация раны в области сердца была отмечена у 12 (26,6%) пациентов, у остальных 33

(73,3%) локализация раны не совпадала с анатомической областью сердца, что вызывало определенные трудности в диагностике. Наиболее часто в этой группе больных были отмечены следующие клинические симптомы: одышка — 10 (24,4%), боли в области сердца — 10 (22,2%), набухание вен шеи — 10 (24,4%), цианоз лица и шеи — 9 (20%), тахикардия — 8 (17,7%) случаев. При этом признаки расширения перкуторных границ сердечной тупости, свидетельствующих о тампонаде сердца, были отмечены только у 7 (15,5%) пациентов, у 6 (13,3%) огнестрельное ранение сердца сопровождалось ощущением нехватки воздуха. В этой группе больных, по сравнению с группой с колото-резаными ранениями сердца, реже отмечены признаки геморрагического шока, проявлявшиеся артериальной гипотонией — 5 (11,1%) случаев и отсутствием пульса на периферических артериях — 3 (6,6%) случая. Отсутствие ярких клинических признаков ранения сердца, признаков геморрагического шока, несомненно, привело к тому, что диагностика при таких ранениях была затруднена. Так, в момент поступления на основании только клинических данных ранения сердца были диагностированы лишь в 12 (26,6%) случаях, эти пациенты были доставлены в операционную, минуя приемный покой. В остальных 33 (73,3%) случаях диагностические исследования были проведены в условиях приемного покоя, что привело к задержке с оперативным вмешательством. Поступившим в приемный покой была выполнена рентгенография органов грудной клетки в 38 (84,4%) случаях. Следует отметить, что выполнение этого исследования у 30 пациентов позволило заподозрить ранение сердца. ЭКГ выполняли в 29 (64,4%) случаях, кроме того, в 18 (40%) выполняли плевральную пункцию. В 40 случаях в условиях операционной была проведена ПХО раны. Задержка с оперативным вмешательством от 2 до 3 ч среди пациентов этой группы была отмечена в 8 (17,7%) случаях наблюдениях. Все они были связаны с отсутствием выраженной клинической картины, больные были оперированы после ухудшения состояния и нарастания признаков геморрагического шока.

При анализе ближайшего послеоперационного периода было установлено, что осложнения в группе с колото-резаными ранениями отмечены в 21 (24,4%) случае, а летальность в 12 (13,9%) случаях. В группе с огнестрельными ранениями осложнения развились у 34 (39,5%), а летальность — у 23 (26,7%) пациентов.

Таблица. Частота основных симптомов при ранениях сердца ($M \pm m$)

Симптомы	Частота симптомов в группах	
	Колото-резаные ранения ($n = 41$)	Огнестрельные ранения ($n = 45$)
Боли в области сердца	$28 \pm 2^*$	10 ± 1
Ощущение нехватки воздуха	$16 \pm 2^*$	6 ± 1
Локализация раны в области сердца	$38 \pm 2^*$	12 ± 1
Цианоз лица и шеи	9 ± 1	9 ± 2
Набухание вен шеи	10 ± 1	10 ± 1
Одышка (более 25–30 в мин)	$23 \pm 2^*$	11 ± 1
Расширение перкуторных границ сердечной тупости	$31 \pm 5^*$	7 ± 2
Тахикардия (более 90 уд./мин)	$38 \pm 4^*$	8 ± 1
Отсутствие пульса на периферических артериях	$23 \pm 4^*$	3 ± 2
Артериальная гипотония (систолическое АД менее 100 мм рт. ст.)	$25 \pm 2^*$	$5 \pm 0,3$
Венозная гипертензия (ЦВД более 140 мм водн. ст.)	$27 \pm 4^*$	7 ± 1

Примечание: * — статистически достоверно ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показывает, что различные ранения сердца имеют неодинаковую клиническую картину: она более выражена при колото-резаных ранах и менее выражена при огнестрельных, что необходимо учитывать при поступлении таких пациентов. Тяжесть состояния в группе с огнестрельными ранениями была обусловлена наличием шока, который был зарегистрирован в момент поступления в 31,3% случаях при колото-резаных ранениях, и в 46,5% при огнестрельных ранениях. Следующим, немаловажным фактором, повлиявшим на клиническую картину, был характер ранения. Так, в группе с колото-резаными ранениями преобладали проникающие ранения, что способствовало появлению более выраженных клинических симптомов. Полученные данные не противоречат результатам, представленным в литературе [16]. Вместе с тем, необходимо отметить тот факт, что результаты лечения в группе пациентов с огнестрельными ранениями оказались хуже: осложнения в ближайшем послеоперационном периоде в этой группе развились в 39,5% случаев, а летальность составила 26,7%, тогда как в группе с колото-резаными ранениями осложнения

развились в 24,4% случаев, а летальность составила 13,9%; увеличение количества летальных случаев и осложнений в группе с огнестрельными ранениями сердца требует дальнейшего изучения и не входило в задачи данного исследования. Однако, можно отметить, что по литературным данным, большее количество осложнений и летальных исходов в группе больных с огнестрельными ранениями сердца может быть обусловлено ушибом сердца, возникающим за счет гидродинамического удара ранящего снаряда, и именно это оказывает большее влияние на течение послеоперационного периода при таких ранениях [17].

ВЫВОДЫ

Диагностические ошибки при колото-резаных ранениях сердца встречаются в 9,7% случаев, при огнестрельных ранениях — в 17,7%. Наиболее выражены клинические симптомы при колото-резаных ранениях сердца. С целью уменьшения количества диагностических ошибок необходимо более широко применять понятие «сердечной зоны» при диагностике ранений груди, а также применять УЗИ сердца, плевральных полостей и т. д.

Литература

1. Винокуров М. М., Гоголев Н. М. Ранение сердца и перикарда. *Acta Biomedica Scientifica*. 2005; (3): 160.
2. Волков В. Е., Ванюков В. П., Волков С. В., Жамков Д. Г. Непосредственные результаты хирургического лечения ранений сердца. *Здравоохранение Чувашии*. 2017; 3 (52): 32–4.
3. Волков В. Е., Волков С. В. Ранения сердца: состояние проблемы и перспективы. *Acta Medica Eurasica*. 2017; (1): 17–21.
4. Ивченко Д. Р., Колтович А. П. Факторы танатогенеза при огнестрельных ранениях груди. *Медицинский вестник МВД*. 2013; 2 (63): 31–5.
5. Ковальчук В. И. Открытые ранения сердца у детей. *Здравоохранение (Минск)*. 2015; (4): 62–5.
6. Новоселов В. П., Савченко С. В., Грицингер В. А. Оценка реактивных изменений миокарда при проникающих колото-резаных ранениях груди с повреждением сердца. *Медицинская экспертиза и право*. 2013; (2): 8–10.
7. Тарасенко В. С., Аркушенко В. А., Мхоян С. А. Хирургическая тактика при ранениях груди. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2014; (3): 40–3.
8. Топольницкий Е. Б., Сиволап М. П. Анализ повреждений и летальности у пострадавших с ранениями сердца в мирное время. *Acta Biomedica Scientifica*. 2007; (1): 199–200.
9. Масляков В. В., Барсуков В. Г., Куркин К. Г. Непосредственные результаты лечения огнестрельных ранений груди гражданского населения в условиях локальных военных конфликтов. *Новости хирургии*. 2016; (4): 379–84.
10. Масляков В. В., Доржиев П. С. Непосредственные и отдаленные результаты лечения открытых травм сердца. *Хирург*. 2013; (5): 42–7.
11. Новоселов В. П., Савченко С. В., Федоров С. А., Кирьянова К. С. Морфология поврежденных сердца при проникающих колото-резаных ранениях груди. *Сибирский медицинский журнал (Томск)*. 2009; 24 (4–2): 49–51.
12. Селезов Е. А., Жиго П. Т., Белобородов А. А., Поликарпов Л. С. Диагностика и лечение ранений сердца и перикарда. *Сибирское медицинское обозрение*. 2005; 4 (37): 41–2.
13. Топольницкий Е. Б. Результаты и основные принципы хирургического лечения ранений сердца. *Вестник хирургии им. И. И. Грекова*. 2010; 2 (169): 85–9.
14. Фомин В. Н., Фомина Р. В. Успешное лечение ранения сердца в условиях центральной районной больницы. *Вестник хирургии им. И. И. Грекова*. 2015; 6 (174): 89–90.
15. Шаймарданов Р. Ш., Губаев Р. Ф., Коробков В. Н., Филиппов В. А. Диагностика и хирургическая тактика при ранениях сердца. *Вестник современной клинической медицины*. 2014; (7): 205–8.
16. Розанов В. Е., Болотников А. И., Лебедев В. Н., Бондаренко А. В., Кильдяшов А. В. Особенности диагностики и лечения сочетанных ранений сердца. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2012; (3): 15–30.
17. Самохвалов И. М., Гаврилов С. В., Кузьмин А. М., Мешаков Д. П., Недомолкин С. В., Денисов В. А., Супрун Т. В., Жирнова Н. А. Ушиб сердца при огнестрельных ранениях. *Военно-медицинский журнал*. 2018; (9): 21–8.

References

1. Vinokurov MM, Gogolev NM. Ranenie serdca i perikarda. *Acta Biomedica Scientifica*. 2005; (3): 160. Russian.
2. Volkov VE, Vanyukov VP, Volkov SV, Zhamkov DG. Neposredstvennye rezul'taty hirurgicheskogo lechenija ranenij serdca. *Zdravoohranenie Chuvashii*. 2017; 3 (52): 32–4. Russian.
3. Volkov VE, Volkov SV. Ranenija serdca: sostojanie problemy i perspektivy. *Acta Medica Eurasica*. 2017; (1): 17–21. Russian.
4. Ivchenko DR, Koltovich AP. Faktory tanatogeneza pri ognestrel'nyh ranenijah grudi. *Medicinskij vestnik MVD*. 2013; 2 (63): 31–5. Russian.
5. Kovalchuk VI. Otkrytye ranenija serdca u detej. *Zdravoohranenie (Minsk)*. 2015; (4): 62–5. Russian.
6. Novoselov VP, Savchenko SV, Gricinger VA. Ocenka reaktivnyh izmenenij miokarda pri pronikajushhij koloto-rezanyh ranenijah grudi s povrezhdeniem serdca. *Medicinskaja jekspertiza i pravo*. 2013; (2): 8–10. Russian.

7. Tarasenko VS, Arkushenko VA, Mhoyan SA. Hirurgicheskaja taktika pri ranenijah grudi. Medicinskij vestnik Bashkortostana. 2014; (3): 40–3. Russian.
8. Topolnickij EB, Sivolap MP. Analiz povrezhdenij i letal'nosti u postradavshih s ranenijami serdca v mirnoe vremja. Acta Biomedica Scientifica. 2007; (1): 199–200. Russian.
9. Maslyakov VV, Barsukov VG, Kurkin KG. Neposredstvennye rezul'taty lechenija ognestrel'nyh ranenij grudi grazhdanskogo naselenija v uslovijah lokal'nyh voennyh konfliktov. Novosti hirurgii. 2016; (4): 379–84. Russian.
10. Maslyakov VV, Dorzhiev PS. Neposredstvennye i otdalennye rezul'taty lechenija otkrytyh travm serdca. Hirurg. 2013; (5): 42–7. Russian.
11. Novoselov VP, Savchenko SV, Fedorov SA, Kiryanova KS. Morfologija povrezhdenij serdca pri pronikajushhij koloto-rezanyh ranenijah grudi. Sibirskij medicinskij zhurnal (Tomsk). 2009; 24 (4–2): 49–51. Russian.
12. Selezov EA, Zhigo PT, Beloborodov AA, Polikarpov LS. Diagnostika i lechenie ranenij serdca i perikarda. Sibirskoe medicinskoje obozrenie. 2005; 4 (37): 41–2. Russian.
13. Topolnickij EB. Rezul'taty i osnovnye principy hirurgicheskogo lechenija ranenij serdca. Vestnik hirurgii im. I. I. Grekova. 2010; 2 (169): 85–9. Russian.
14. Fomin VN, Fomina RV. Uspeshnoe lechenie ranenija serdca v uslovijah central'noj rajonnoj bol'nicy. Vestnik hirurgii im. I. I. Grekova. 2015; 6 (174): 89–90. Russian.
15. Shajmardanov RSh, Gubaev RF, Korobkov VN, Filippov VA. Diagnostika i hirurgicheskaja taktika pri ranenijah serdca. Vestnik sovremennoj klinicheskoj mediciny. 2014; (7): 205–8. Russian.
16. Rozanov VE, Bolotnikov AI, Lebedev VN, Bondarenko AV, Kil'djashov AV. Osobennosti diagnostiki i lechenija sochetannyh ranenij serdca. Medicina jekstremal'nyh situacij. 2012; (3): 15–30. Russian.
17. Samohvalov IM, Gavrilov SV, Kuzmin AM, Meshakov DP, Nedomolkin SV, Denisov VA, Suprun TV, Zhirnova NA. Ushib serdca pri ognestrel'nyh ranenijah. Voенно-medicinskij zhurnal. 2018; (9): 21–8. Russian.

ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ НА ВИРУС ЭПШТЕЙНА–БАРР ПРИ АЛЛЕРГИИ

Е. В. Свирицкая¹✉, М. А. Симонова¹, Е. В. Матушевская², Г. В. Фаттахова¹, С. В. Хлгатян³, Д. Ю. Рязанцев¹, Д. Б. Чудаков¹, С. К. Завриев¹¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия² Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия³ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва, Россия

Аллергия I типа опосредована формированием IgE-антител к безвредным веществам. Механизмы возникновения аллергии остаются дискуссионными. Одним из факторов риска может быть снижение защитных функций барьерных тканей. Целью работы было проанализировать гуморальный иммунный ответ на вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) у больных с аллергией на грибок *A. alternata* и клещей домашней пыли *D. farinae* (КДП) и у здоровых людей. Известно, что до 90% населения инфицированы ВЭБ. Инфицирование происходит в раннем возрасте параллельно с формированием аллергических реакций. Анализ антител проводили методом иммуно-ПЦР с использованием рекомбинантного белка ВЭБ rEBNA1. Показали, что инфицирование как у больных, так и у доноров происходит в детстве; доля сероположительных по ВЭБ индивидов была сравнимой в группах (75 и 74%). Доля пациентов с высокими титрами IgG₁ среди больных с аллергией была ниже (7%) по сравнению с донорами (18%), что соответствует меньшей вирусной нагрузке. У больных с аллергией, но не у здоровых людей, наблюдали снижение титров IgG₁ с возрастом ($p = 0,037$). Кроме того, при аллергии повышены титры IgA₁ по сравнению с донорами, однако IgA₁-ответы при аллергии на грибок *A. alternata* и на КДП различались. При аллергии также раньше формировались IgM к ВЭБ. Таким образом, при аллергии быстрее формируется IgM и IgA₁ гуморальный ответ, что приводит к снижению с возрастом IgG₁-титров.

Ключевые слова: аллергия, клещи домашней пыли, грибки *A. alternata*, рекомбинантные аллергены, вирус Эпштейна–Барр, иммуно-ПЦР

Информация о вкладе авторов: Е. В. Свирицкая — определение IgE титров на аллергены в сыворотках больных с аллергией и доноров, обработка данных, написание статьи; С. В. Хлгатян — подбор сывороток больных с аллергией и доноров различного возраста, титрование методом RIDA; Г. В. Фаттахова, Д. Б. Чудаков — определение IgE титров на аллергены в сыворотках больных с аллергией и доноров; Е. В. Матушевская — сбор сывороток больных с аллергией, обсуждение результатов и написание статьи; М. А. Симонова, Д. Ю. Рязанцев — постановка ПЦР; Д. Ю. Рязанцев — экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков ВЭБ, *A. alternata* и *D. Farinae*; Д. Ю. Чудаков — наработка, очистка и характеристика рекомбинантных белков; С. К. Завриев — оптимизация ПЦР, участие в обсуждении результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Института вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (протокол № 35 от 12 сентября 2018 г.).

✉ Для корреспонденции: Елена Викторовна Свирицкая
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997; esvir@mail.ibch.ru

Статья получена: 12.09.2018 Статья принята к печати: 15.02.2019 Опубликована онлайн: 01.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.004

HUMORAL RESPONSE TO EPSTEIN-BARR VIRAL INFECTION IN PATIENTS WITH ALLERGIES

Svirshchevskaya EV¹ ✉, Simonova MA¹, Matushevskaya EV², Fattakhova GV¹, Khlgatian SV³, Ryazantsev DYU¹, Chudakov DB¹, Zavriev SK¹¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia² Institute of Continuing Vocational Education, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia³ Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Type I hypersensitivity is mediated by the production of IgE antibodies in response to normally harmless substances. Debate still continues about the mechanisms underlying allergic reactions. Reduced barrier tissue function can be one of the risk factors for allergies. The aim of the present work was to compare the humoral immune response to Epstein-Barr virus in patients allergic to the *A. alternata* fungus or *D. farinae* house dust mites and healthy donors. It is known that up to 90% of the world population are infected with EBV. This infection occurs at early age when a child develops allergy. The antibodies were analyzed using immuno-PCR and the recombinant EBV protein rEBNA. We were able to demonstrate that infection occurs at early age in both allergic patients and healthy donors. The proportion of EBP-seropositive individuals was comparable between the groups (75 and 74%). The proportion of patients with high IgG₁ titers among patients with allergies was lower (7%) than in healthy donors (18%), suggesting a lower viral load. In patients with allergies (but not in healthy donors) IgG₁ titers declined as children grew older ($p = 0.037$). Besides, IgA₁ titers were increased in patients with allergies in comparison with healthy donors, but differed between patients allergic to *A. alternata* and house dust mites. In allergic individuals, production of IgM against EBV was triggered earlier than in healthy donors. We conclude that IgM production and the IgA₁-mediated humoral response occur earlier in patients with allergies, causing a decline in IgG₁ titers over time.

Keywords: allergy, house dust mites, *A. alternata*, recombinant allergens, Epstein–Barr virus, immuno-PCR

Author contribution: Svirshchevskaya EV measured IgE titers against allergens in the sera of allergic individuals and healthy donors, processed the obtained data and participated in the writing of this article; Khlgatian SV selected sera samples for the study and conducted RIDA assays; Fattakhova GV and Chudakov DB measured IgE titers against allergens in the sera of patients with allergies and healthy donors; Matushevskaya EV collected sera samples from patients with allergies, participated in the discussion of the study results and in the writing of this article; Simonova MA and Ryazantsev DYU performed iPCR; Ryazantsev DYU expressed recombinant proteins of EBV, *A. alternata* and *D. farinae*; Chudakov DB synthesized, purified and characterized the sufficient amount of recombinant proteins for the study; Zavriev SK optimized PCR and participated in the discussion of the study results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Protocol 35 dated September 12, 2018).

✉ Correspondence should be addressed: Elena V. Svirshchevskaya
Miklouho-Maclay 16/10, Moscow, 117997; esvir@mail.ibch.ru

Received: 12.09.2018 Accepted: 15.02.2019 Published online: 01.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.004

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) относится к ДНК-содержащим вирусам, входящим в семейство *Herpesviridae* и вызывающим у человека различные заболевания — от респираторных до онкологических. Известно 8 типов герпесвирусов, поражающих человека. Вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов, варицелла-зостер (тип 3), ВЭБ (тип 4) и цитомегаловирус (тип 5) широко распространены в человеческой популяции. Инфицирование герпесвирусами типов 6 и 7 и ассоциированным с саркомой Капоши вирусом типа 8 встречается реже. Каждый взрослый человек инфицирован хотя бы одним типом герпесвируса, что диагностируют по наличию специфических антител в сыворотке крови. Так, 80–95% людей — латентные носители ВЭБ и цитомегаловируса [1]. Латентная ВЭБ-инфекция ассоциирована с некоторыми онкологическими заболеваниями [1–3], рассеянным склерозом [4–5], системной красной волчанкой [6], отягощает течение вирусного иммунодефицита человека [7], провоцирует формирование аутоантител к ДНК и белкам человека [8–9]. Основные антигены ВЭБ — вирусный капсидный антиген, ранний антиген и ядерный антиген 1 (EBNA1) [10–11]. Белок EBNA1 необходим для латентной стадии персистенции вируса. Антитела G-класса вырабатываются против этого антигена каждый раз при реактивации вируса и отражают суммарную латентную вирусную нагрузку.

Инфицирование ВЭБ происходит контактным путем через поцелуи, общую посуду, предметы личной гигиены. Заражение воздушно-капельным путем также возможно, но встречается реже. Передача вируса может происходить от матери к ребенку во время вынашивания и родов, а также при грудном вскармливании. По данным различных исследований, у 50% детей в возрасте до 3 лет выявляют антитела к ВЭБ [12–13]. Передача осуществляется, по-видимому, через общую посуду и поцелуи.

Аллергия I типа характеризуется формированием гуморального IgE-опосредованного ответа на белки, входящие в состав безвредных микрочастиц — пыльцы, мертвых клещей домашней пыли, эпидермис домашних животных и др. [14–15]. Показано, что в коже и бронхиальном эпителии больных с аллергией имеются значительные отличия от здоровых барьерных тканей [16–17]. Целью данной работы была оценка гуморального ответа на ВЭБ у больных с аллергией на *A. alternata* и *D. farinae*.

Ранее нами был разработан метод анализа антител IgG₁ к ВЭБ и IgE к различным аллергенам с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [18–19]. Иммуно-ПЦР (иПЦР) является чувствительным методом, используемым для детекции антител в биологических жидкостях [20–21]. Среди преимуществ иПЦР — линейность дозовых кривых в широком диапазоне концентраций, что позволяет определять титры специфичных антител с помощью меньшего количества разведения сывороток [18–19].

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Сыворотки

В работе использовали сыворотки детей и взрослых с гиперчувствительностью к клещам домашней пыли и грибу *Alternaria alternata*. Все сыворотки получены из КПО ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (Москва, РФ) с информированного добровольного согласия участников и собраны за период с 2009 по 2017 г. Пациенты проходили аллергодиагностику с

использованием коммерческих наборов RIDA (Германия). Критерии включения в исследование сывороток больных с аллергией: наличие в них IgE к *A. alternata* или КДП *D. farinae* по анализу RIDA с классом 3 и более (максимум 6). Критерии исключения: пациенты, прошедшие аллергоспецифическую иммунотерапию; наличие перекрестной аллергии на *A. alternata* или КДП *D. farinae*. Донорами считали людей разных возрастов, у которых не были выявлены IgE к пыльцевой, бытовой или грибной панелям аллергенов.

Материалы

Для иПЦР использовали планшеты с высокой сорбирующей способностью (Costar; США), стрипованные планшеты для qPCR Top Yield strips (ThermoFisher Scientific; США), твин-20, готовый раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидаина (Sigma; США), козью сыворотку (Bovogen Biologicals; Австралия), биотинилированные моноклональные антитела к человеческим IgG₁-IgG₄ и IgE (Southern Biotech; США), мышиные антитела к IgA₁, IgA₂ человека, конъюгат козых антител против IgG мыши с биотином и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (BD Pharmigen; США), биотинилированный олигодезоксирибонуклеотид (ОДН) (Lumiprobe; Москва), стрептавидин (Sigma; США). В работе использовали рекомбинантные белки rEBNA1, Der f 2 и Alt a 1, полученные ранее в нашей лаборатории [18, 22–23]. Остальные реактивы — фирмы Fluka (Швейцария).

Постановка иПЦР

Раствор рекомбинантного антигена rEBNA1 (10 мкг/мл) в карбонат-бикарбонатном буфере (0,05 М, pH 9,6) вносили в лунки стрипованного планшета для иПЦР в объеме 50 мкл на лунку и инкубировали в течение ночи при 4 °С. По окончании инкубации лунки промывали трижды буфером TETBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА, 0,1% твин-20, pH 7,5). Образцы сывороток разбавляли в 10 раз буфером TETBS с 20%-й козьей сывороткой, делали пятикратные серии разведений и вносили в лунки планшета в объеме 25 мкл на лунку. Каждый образец вносили в трех повторах. В качестве отрицательного контроля использовали фетальную коровью сыворотку (FBS) в 6 повторах. Планшет инкубировали на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации с образцами сывороток планшет отмывали три раза буфером TETBS и вносили в его лунки раствор биотинилированных антител к человеческим иммуноглобулинам IgG₁-IgG₄ или мышиных антител к человеческим IgA₁, IgA₂ или IgM в TETBS с 20%-й козьей сывороткой (1 : 1000) в объеме 50 мкл на лунку. Планшеты инкубировали на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре и далее промывали три раза буфером TETBS. Для анализа IgA₁, IgA₂ или IgM планшеты далее инкубировали с конъюгатом козых антител против IgG мыши с биотином. После отмывки в лунки планшетов вносили 50 мкл стрептавидина (1 мкг/мл), инкубировали 10 мин, отмывали и вносили 5 пМ раствора ОДН в буфере TETBS с 20%-й козьей сывороткой в объеме 50 мкл на лунку и инкубировали на шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации лунки планшета промывали 3 раза буфером TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). В лунки планшета вносили смесь для ПЦР в объеме 35 мкл на лунку, сверху вносили минеральное масло в объеме 30 мкл на лунку. ПЦР в реальном времени проводили на

амплификаторе DTprime (ДНК-Технология; Россия) по следующему протоколу: начальная денатурация в течение 5 мин при 94 °С и далее 40 циклов: 15 с отжиг и элонгация при 60 °С, 5 с денатурация при 94 °С. На каждом цикле проводили измерение величины флуоресцентного сигнала от зонда при длине волны 520 нм. Результаты ПЦР анализировали с использованием программного обеспечения амплификатора. Для каждого образца вычисляли среднюю величину порогового цикла (Cq) и стандартное отклонение. Порог детекции рассчитывали как три стандартных отклонения для (Cq-), где (Cq-) — величина порогового цикла в отрицательных образцах. Титр сыворотки оценивали как максимальное разведение сыворотки, при котором соответствующий образец считали положительным.

Статистический анализ

Среднее и стандартное отклонения рассчитывали с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft Office, 2003). Корреляцию между титрами IgG1-антител и группами пациентов оценивали с помощью параметрического χ^2 -теста Пирсона и *t*-теста Стьюдента. Результат считали статистически значимым при значении $p < 0,05$ в двустороннем анализе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особенности иммуно-ПЦР

Все исследования проведены методом иПЦР (таблица). Стадии 0–3 аналогичны стадиям метода ИФА: нанесение антигена на подложку (стадия 0), инкубация с сывороткой крови (стадия 1), инкубация с биотинилированными антителами против IgG1 человека (стадия 2), инкубация со стрептавидином (ПЦР) или комплексом стрептавидин — пероксидаза хрена (ИФА) (стадия 3). Стадия 3 в иПЦР разделена на две и включает инкубацию со стрептавидином, а затем дополнительную инкубацию с ОДН, что позволяет увеличить чувствительность иПЦР. На стадии 4 проводили ПЦР или добавляли субстрат для пероксидазы хрена.

Стадия детекции в ИФА с помощью субстрата не является стандартизированной и варьирует от дня постановки и времени остановки реакции блоком. При анализе иПЦР сокращается примерно на 1 ч время постановки реакции; достигается стандартное проведение анализа, не зависящее от оператора; увеличивается чувствительность за счет получения более линейных данных [18–19].

Характеристика IgE-ответа на аллергены

Для работы отобрали сыворотки больных с диагностированным с помощью коммерческой системы RIDA IgE-ответом на клещей *Dermatophagoides farinae* и грибок *Alternaria alternata*. Среди имеющейся коллекции

сывороток отобрали образцы с классом выше 3. На рис. 1 представлено распределение больных по классам RIDA. В части образцов сывороток IgE-антитела не были выявлены ни к одному из 15 аллергенов трех групп (пыльцевая, бытовая и грибная). Такие сыворотки использовали в качестве донорских. Далее из имеющейся коллекции отобрали по 30 сывороток больных и доноров в возрасте 0–15 лет.

Характеристика общего гуморального ответа на ВЭБ

Для анализа профиля антител к ВЭБ у больных с респираторной аллергией на КДП и грибок *A. alternata* использовали пул 10 сывороток с классом 5–6, полученных от больных в возрасте 3–15 лет. В качестве контроля использовали пул сывороток 10 доноров такого же возраста. Титры антител в rEBNA1 падали в ряду $IgM > IgG_1 > IgA_1 > IgA_2 > gG_2$ (рис. 2) у доноров и в ряду $IgM > IgA_1 > IgG_1 > IgA_2 > IgG_2$ у больных. Титры IgG_3 и IgG_4 были низкими в обеих группах. Достоверные различия между больными и донорами наблюдали только по уровням IgG_1 и IgA_1 . Отношение титров IgG_1 к IgA_1 для доноров и больных составило 9 и 0,4 соответственно, что показывает доминирование IgA ответа у больных с аллергией и IgG_1 — у здоровых доноров.

Анализ IgG₁ ответа на ВЭБ

При вирусных инфекциях в основном вырабатываются антитела класса IgG_1 . На рис. 3А представлено распределение титров IgG_1 к ВЭБ в сыворотках больных с аллергией (сыворотки с аллергией на КДП и/или *A. alternata*) и доноров в зависимости от возраста. Показано, что инфицирование возникает в раннем возрасте в обеих группах. У некоторых 4–6-летних детей в обеих группах выявлялись титры $IgG_1 > 1000$. Средний титр IgG_1 в группе пациентов в возрасте 3–10 лет у больных и доноров составил 330 и 1500 соответственно, в возрасте 11–20 лет — 720 и 490, что показывает тенденцию к более ранней инфицированности/реактивности доноров. Из-за значительного разброса данных достоверных различий между группами не было. Не было также различий по уровню антител к ВЭБ между больными с аллергией на КДП, грибок *A. alternata* и донорами (рис. 3Б).

Анализ доли индивидов, не имеющих антител к ВЭБ, имеющих низкие (< 100), средние (100–1000) и высокие (>1000) титры IgG_1 , показал, что в обеих группах 75% детей в возрасте 3–15 лет являются латентными носителями ВЭБ (рис. 4А); у 45% индивидов в обеих группах выявлялись антитела с низкими титрами. Различия наблюдались между группами по продукции антител с высокими титрами: 20% доноров имели титры антител больше 1000 (2000–8000); у больных с аллергией таких детей было только 7% (рис. 4А), что показывает большую резистентность к инфекции при аллергии. При этом титры антител к ВЭБ в соответствующих группах были близкими (рис 4Б).

Таблица. Схема постановки и ПЦР в сравнении с иммуноферментным анализом (ИФА)

Стадии	0	1	2	3	4	
ПЦР	Антиген	Сыворотка	algG1-bio*	Стрептавидин/ОДН	ПЦР	Время
	Ночь	30 мин	30 мин	10/10 мин	1 ч	
ИФА	Антиген	Сыворотка	algG1-bio	Стрептавидин-ПХ**	Субстрат	
	Ночь	1 ч	1 ч	1 ч	20 мин	4–5 ч

Примечание: * — algG1-bio — битинилированное антитело к любому классу или субклассу антител (G, A, E); **ПХ — пероксидаза хрена.

Анализ IgA₁- и IgM-ответов на ВЭБ

Выше было показано, что у больных с аллергией незначительно, но достоверно повышены антитела класса A₁ ($p = 0,03$). Более детальный анализ показал, что основное различие наблюдается на ранней стадии инфицирования (рис. 5А). Средние титры IgA₁ к ВЭБ у больных и доноров в возрасте 3–10 лет составили 425 и 265, в возрасте 11–30 лет — 690 и 370 соответственно. В обеих группах наблюдали рост титров антител с возрастом (рис. 5А). Интересно, что по титрам IgA₁ к ВЭБ наблюдали разницу между больными с разным типом сенсибилизирующего аллергена. Титры IgA₁ к ВЭБ были достоверно выше при аллергии на КДП (рис. 5Б), чем у больных с IgE к *A. alternata* и доноров.

Средние титры IgM к ВЭБ на порядок превышали титры иммуноглобулинов классов G и A в сыворотках как доноров, так и больных. Индивидуальные данные разбивали на низкие (< 5000) и высокие (> 15 000) титры (рис. 5В, Г). Доля высокотитровых по IgM индивидуумов в

обеих группах составила 60%. В этой группе не наблюдали различий в изменении титров IgM в зависимости от возраста и среднего титра (рис. 5В). В группе с низкими титрами IgM у больных с аллергией антитела появлялись раньше, чем у доноров (рис. 5В) и средние титры были выше (рис. 5Г). Повышение титров IgM в этой группе наблюдали при аллергии как на КДП, так и на гриб *A. alternata* (рис. 5Г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе естественного инфицирования ВЭБ формируются антитела разных классов и субклассов. У человека имеются антитела классов M, A, G и E, включающие субклассы IgG₁-IgG₄ и IgA₁-IgA₂. Основной пул антител M-класса относится к врожденному иммунитету и их титры повышаются при первичном инфицировании; IgA обеспечивают защиту слизистых оболочек; IgE повышаются при паразитарных инфекциях и аллергии. В настоящее время считается, что IgA и IgE

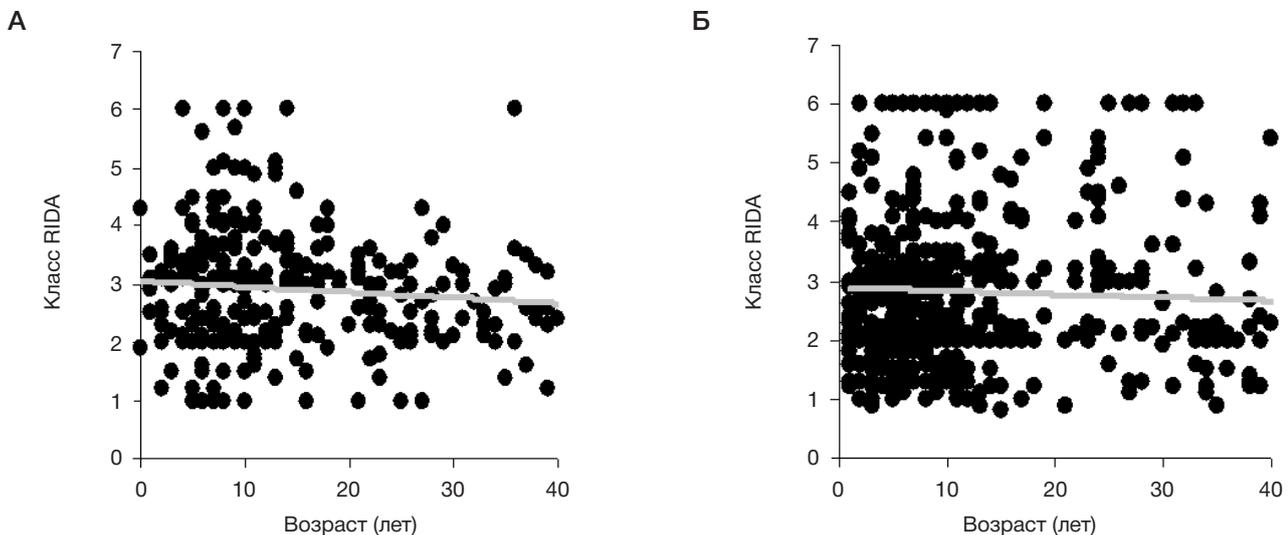


Рис. 1. Характеристика IgE ответа у больных с аллергией методом RIDA. Уровень IgE в сыворотках пациентов с аллергией на клещей домашней пыли (А) и гриб *A. alternata* (Б) оценивается в классах от 0 до 6, что пропорционально титрам IgE

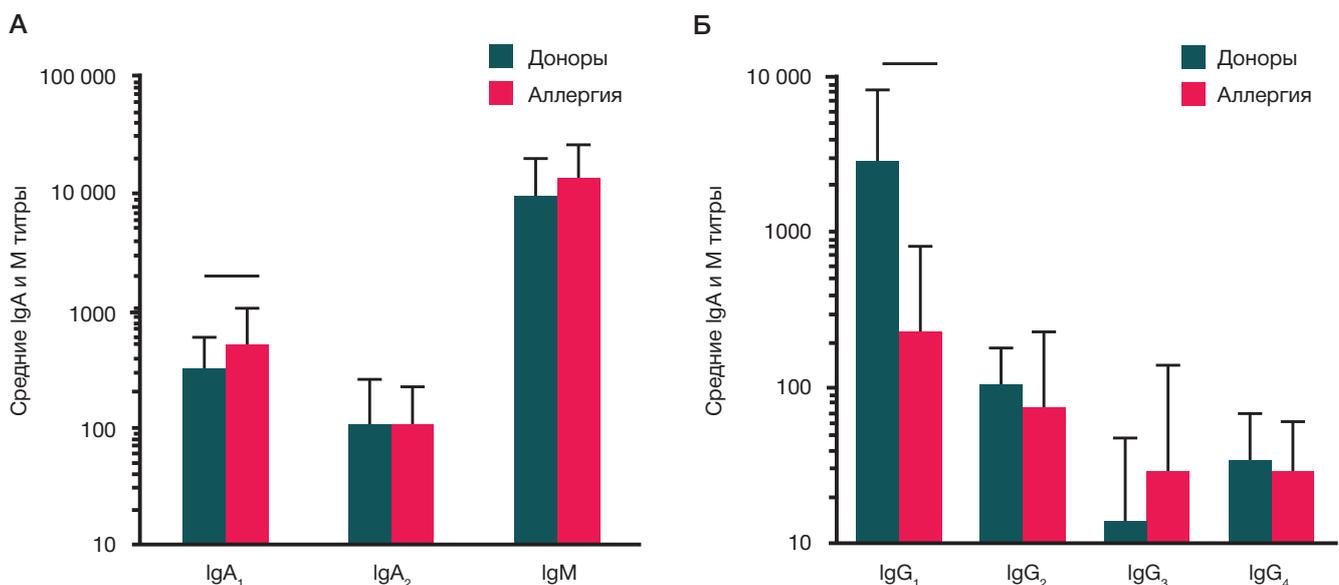


Рис. 2. Анализ иммуноглобулинов, распознающих гЕВНА1, в сыворотках здоровых доноров и пациентов с аллергией. Анализ IgA₁, IgA₂, IgM (А), IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄ (Б) в пулированных сыворотках 10 доноров и 10 пациентов. Приведены средние значения ± стандартное отклонение. Планками отмечены достоверные ($p < 0,05$) различия

относятся к адаптивному иммунитету, поскольку для этого требуется переключение В-клеток с IgM на другие субклассы. Однако в последнее время ставится вопрос локального переключения В-клеток на синтез IgA- и IgE-антител без участия Т-клеток [23, 24], что соответствует функционированию врожденного иммунитета. Антитела А-класса обычно относят к ранним антигенам VCA и EA [25]. Антитела классов М и А к ранним антигенам служат маркерами реактивации вируса или вторичного заражения. Антитела А-класса к позднему антигену ВЭБ EBNA1 также выявляются и значительно повышаются, например, при раке носоглотки [26].

Полученные нами данные показывают, что у больных с аллергическими реакциями в более ранний срок и в более высоких титрах повышаются титры IgA₁- и IgM-антител. При этом титры IgA₂ были ниже, чем титры IgA₁ и не различались между группами (данные не показаны). При аллергической реакции наблюдается воспалительная реакция в слизистых оболочках, повышается продукция

цитокинов и хемокинов [17, 24], что способствует активации В-клеток. В случае высокотитровых сывороток продукция IgM в группах доноров и больных была сравнимой, что показывает равную эффективность иммунного ответа при реактивации вирусом В-клеток, синтезирующих IgM.

Основным протективным звеном адаптивного гуморального ответа являются IgG. Переключение В-клеток на синтез IgG происходит только при формировании антиген-специфичного Т-зависимого ответа на ВЭБ. Известно, что при противовирусном ответе доминирует IgG₁-ответ [27–28]. По литературным данным, при ответе на вирус гепатита В титры антител падают в ряду IgG₁ > IgG₄ > IgG₃ > IgG₂ [27], при ответе на ВЭБ IgG₁ >> IgG₂, IgG₃, IgG₄ [28]. Полученные нами данные для доноров характерны для ответа на ВЭБ с доминированием IgG₁. Для больных с аллергией средний уровень IgG₁ был ниже, чем в группе доноров, и сравним с уровнем IgG₂ (p = 0,14). Статистический анализ данных

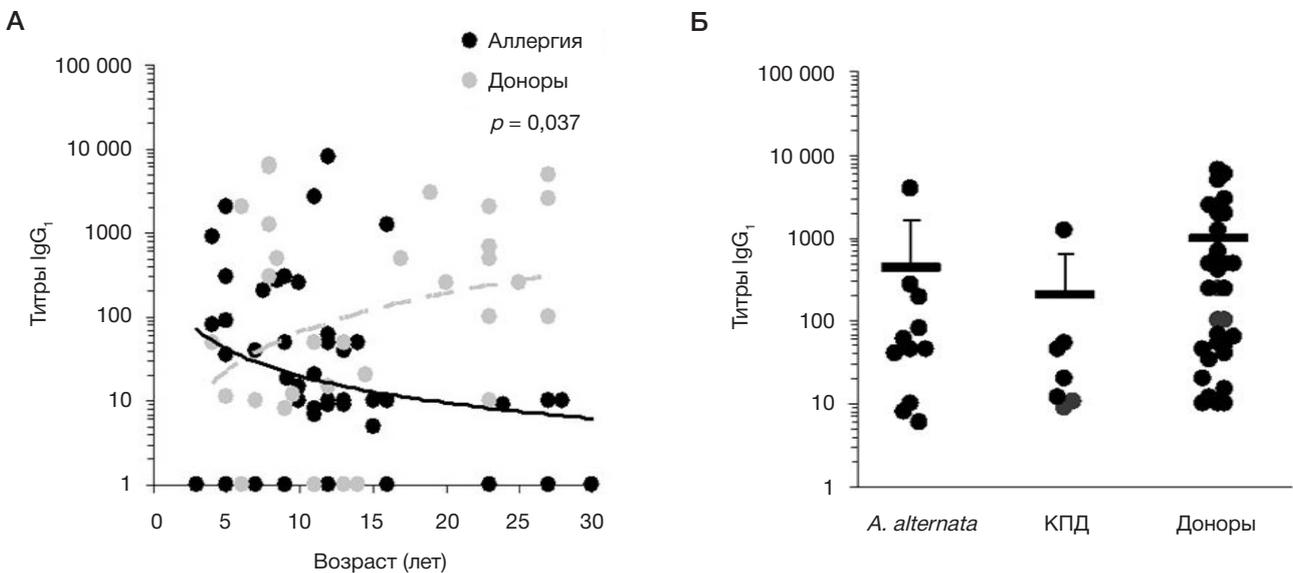


Рис. 3. Анализ гEBNA1 специфических IgG₁ в сыворотках здоровых доноров и пациентов с аллергией. **А.** Анализ титров IgG₁ в индивидуальных сыворотках пациентов с аллергией на грибок *A. alternata* ($n = 15$), клещей домашней пыли ($n = 9$) и доноров ($n = 38$). Планками показаны средние значения \pm стандартное отклонение. **Б.** Зависимость титров гEBNA1 специфических IgG₁ от возраста в индивидуальных сыворотках пациентов с аллергией ($n = 53$) и доноров ($n = 34$). Аппроксимация степенной функцией показана линиями

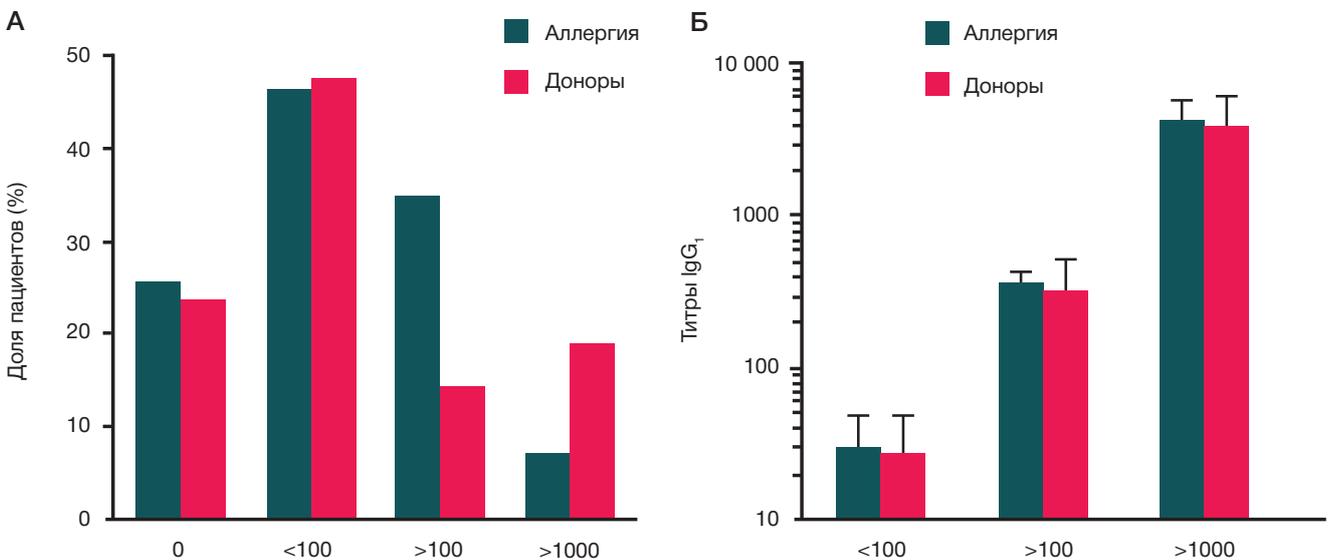


Рис. 4. Анализ репертуара гEBNA1 специфических IgG₁ в сыворотках здоровых доноров и пациентов с аллергией. Доля (%) пациентов и доноров, у которых выявлены IgG₁ с различными титрами (**А**), и средние титры в этих группах (**Б**)

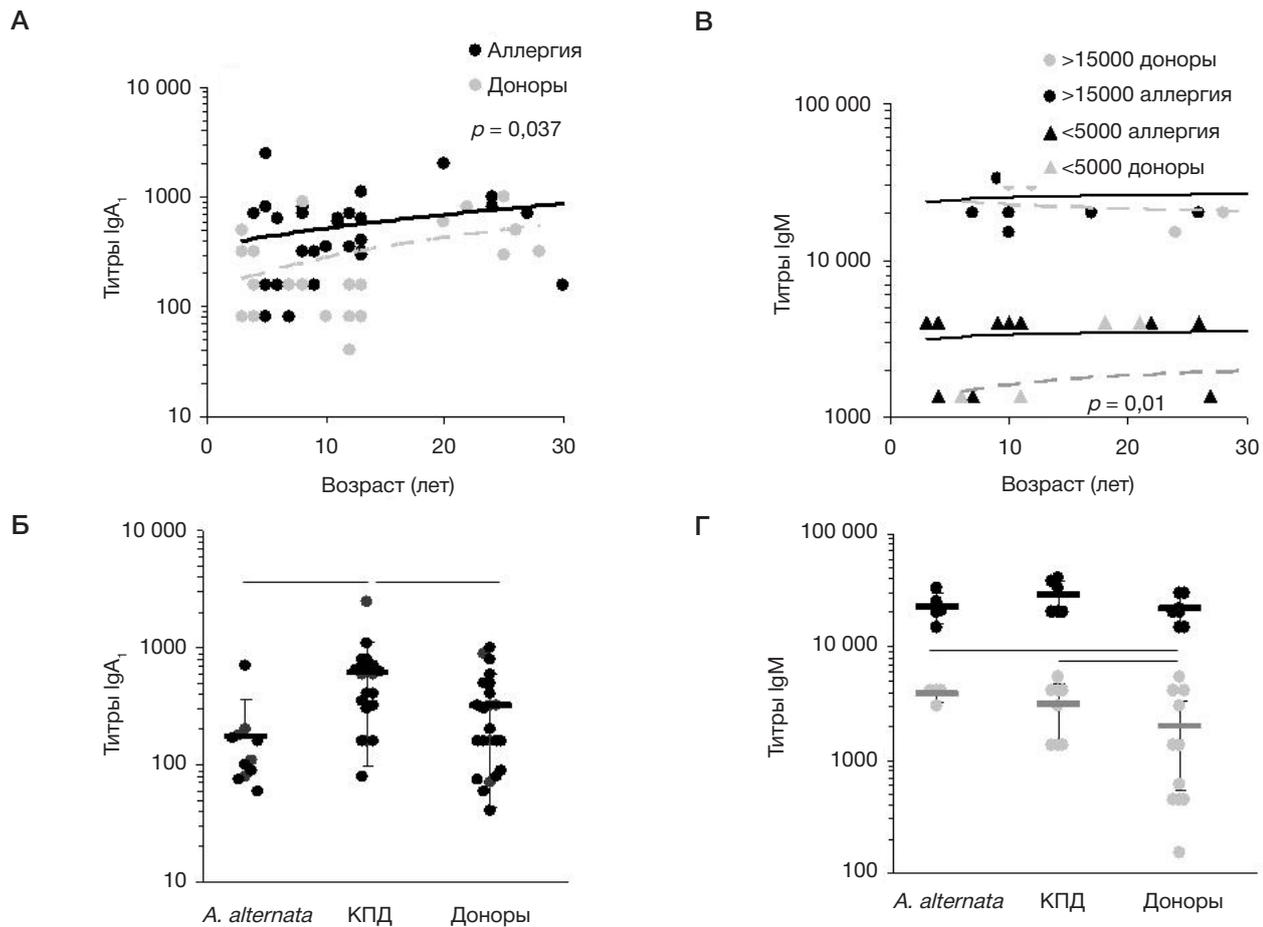


Рис. 5. Анализ гEBNA1 специфических IgA₁ и IgM в сыворотках здоровых доноров и пациентов с аллергией. Анализ титров IgA₁ (А) и IgM (В) в индивидуальных сыворотках пациентов с аллергией на грибок *A. alternata* ($n = 11$), клещей домашней пыли ($n = 21$) и доноров ($n = 23$) в зависимости от возраста. Распределение титров гEBNA1 специфических IgA₁ (Б) и IgM (Г) в сыворотках пациентов с аллергией и здоровых доноров. Данные по IgM представлены для сывороток с низкими (серые кружки) и высокими (черные кружки) титрами антител IgM. Планками показаны средние значения \pm стандартное отклонение. Верхними планками показаны достоверные отличия ($p < 0,05$)

показал, что достоверные различия между больными с аллергией и донорами по титрам IgG₁ возрастают с возрастом. Ранее противовирусный ответ у больных с аллергией не изучали. В целом, полученные данные позволяют предположить, что при респираторной аллергии можно наблюдать повышение количества IgA₁- и IgM-антител к ВЭБ, что снижает его проникновение через эпителиальные барьеры и уменьшает общую вирусную нагрузку.

ВЫВОДЫ

Аллергия характеризуется повышенной реактивностью эпителиальных барьеров, что вызвано взаимодействием IgE с аллергенами. Повышение реактивности врожденной системы иммунитета, по-видимому, приводит к повышению противовирусного ответа на вирус Эпштейна–Барр, повышению титров IgA₁ и IgM, снижению титров IgG₁, коррелирующих с латентной вирусной нагрузкой.

Литература

- Kayamba V, Monze M, Asombang AW, Zyambo K, Kelly P. Serological response to Epstein–Barr virus early antigen is associated with gastric cancer and human immunodeficiency virus infection in Zambian adults: a case-control study. *Pan Afr Med J.* 2016; (23): 45. DOI: 10.11604/pamj.2016.23.45.8503.
- Banko AV, Lazarevic IB, Folic MM, Djukic VB, Cirakovic AM, Karalic DZ, Cupic MD, Jovanovic TP. Characterization of the Variability of Epstein–Barr Virus Genes in Nasopharyngeal Biopsies: Potential Predictors for Carcinoma Progression. *PLoS One.* 2016; 11 (4): e0153498. DOI: 10.1371/journal.pone.0153498.
- Frappier L. EBNA1. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015; (391): 3–34. DOI: 10.1007/978-3-319-22834-1_1.
- Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E, Myrnes H, Vedeler C, Grønning M, Kalvenes MB, Nyland H. Altered antibody pattern to Epstein–Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998; 64 (4): 539–42.
- Lomakin Y, Arapidi GP, Chernov A, Ziganshin R, Tsyganov E, Lyadova I, Butenko IO, Osetrova M, Ponomarenko N, Telegin G, Govorun VM, Gabibov A, Belogurov A Jr. Exposure to the Epstein–Barr Viral Antigen Latent Membrane Protein 1 Induces Myelin-Reactive Antibodies In Vivo. *Front Immunol.* 2017; (8): 777. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00777.
- Piroozmand A, Haddad Kashani H, Zamani B. Correlation between Epstein–Barr Virus Infection and Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus: a Cross-Sectional Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017; (18): 523–7.
- Pan R, Liu X, Zhou S, Ning Z, Zheng H, Gao M, Ding Y, Yao W, Liao X, He N. Differential prevalence and correlates of whole blood Epstein–Barr virus DNA between HIV-positive and HIV-negative

- men who have sex with men in Shanghai, China. *Epidemiol Infect.* 2017; 145 (11): 2330–40. DOI: 10.1017/S0950268817001054.
8. Lindsey JW, deGannes SL, Pate KA, Zhao X. Antibodies specific for Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 cross-react with human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *Mol Immunol.* 2016 Jan; (69): 7–12. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.11.007.
 9. Lindsey JW. Antibodies to the Epstein–Barr virus proteins BFRF3 and BRRF2 cross-react with human proteins. *Neuroimmunol.* 2017; (310): 131–4.
 10. Al Sidairi H, Binkhamis K, Jackson C, Roberts C, Heinstejn C, MacDonald J, Needle R, Hatchette TF, LeBlanc JJ. Comparison of two automated instruments for Epstein–Barr virus serology in a large adult hospital and implementation of an Epstein–Barr virus nuclear antigen-based testing algorithm. *J Med Microbiol.* 2017; 66 (11): 1628–34. DOI: 10.1099/jmm.0.000616.
 11. Maylin S, Feghoul L, Salmona M, Herda A, Mercier-Delarue S, Simon F, Legoff J. Evaluation the Architect EBV VCA IgM, VCA IgG, and EBNA-1 IgG chemiluminescent immunoassays to assess EBV serostatus prior transplantation. *J Med Virol.* 2017; 89 (11): 2003–10. DOI: 10.1002/jmv.24889.
 12. Simon KC, Saghaffian-Hedengren S, Sverremark-Ekström E, Nilsson C, Ascherio A. Age at Epstein–Barr virus infection and Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 antibodies in Swedish children. *Mult Scler Relat Disord.* 2012; 1 (3): 136–8. DOI: 10.1016/j.msard.2012.03.002.
 13. Xiong G, Zhang B, Huang MY, Zhou H, Chen LZ, Feng QS, Luo X, Lin HJ, Zeng YX. Epstein–Barr virus (EBV) infection in Chinese children: a retrospective study of age-specific prevalence. *PLoS One.* 2014; 9 (6): e99857. DOI: 10.1371/journal.pone.0099857.
 14. Feng C, Kim JH. Beyond Avoidance: the Psychosocial Impact of Food Allergies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018. DOI: 10.1007/s12016-018-8708-x.
 15. Licari A, Castagnoli R, Brambilla I, Marseglia A, Tosca MA, Marseglia GL, Ciprandi G. Asthma Endotyping and Biomarkers in Childhood Asthma. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol.* 2018; 31 (2): 44–55. DOI: 10.1089/ped.2018.0886.
 16. Tsakok T, Woolf R, Smith CH, Weidinger S, Flohr C. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *Br J Dermatol.* 2018. DOI: 10.1111/bjd.16934.
 17. Carsin A, Mazenq J, Iltstad A, Dubus JC, Chanez P, Gras D. Bronchial epithelium in children: a key player in asthma. *Eur Respir Rev.* 2016; 25 (140): 158–69. DOI: 10.1183/16000617.0101-2015.
 18. Пивоваров В. Д., Рязанцев Д. Ю., Симонова М. А., Димитриева Т. В., Хлгатын С. В., Завриев С. К., Свирищевская Е. В. Разработка тест-системы для анализа антител к вирусу Эпштейна–Барр методом иммуно-ПЦР. *Молекулярная биология.* 2018; 52 (4): 727–34.
 19. Simonova MA, Pivovarov VD, Ryazantsev DY, Dolgova AS, Berzhets VM, Zavriev SK, Svirshchevskaya EV. Comparative diagnostics of allergy using quantitative immuno-PCR and ELISA. *Bioanalysis.* 2018. DOI: 10.4155/bio-2017-0194.
 20. Chang L, Li J, Wang L. Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Anal Chim Acta.* 2016; (910): 12–24. DOI:10.1016/j.aca.2015.12.039.
 21. Jani D, Savino E, Goyal J. Feasibility of immuno-PCR technology platforms as an ultrasensitive tool for the detection of anti-drug antibodies. *Bioanalysis.* 2015; (7): 285–94.
 22. Рязанцев Д. Ю., Дробязина П. Е., Хлгатын С. В., Завриев С. К., Свирищевская Е. В. Экспрессия аллергенов клещей домашней пыли Der f 1 и Der f 2 в листьях *Nicotiana benthamiana*. *Биоорганическая химия.* 2014; 40 (4): 468–78.
 23. Svirshchevskaya E, Fattakhova G, Khlgatian S, Chudakov D, Kashirina E, Ryazantsev D, Kotsareva O, Zavriev S. Direct versus sequential immunoglobulin switch in allergy and antiviral responses. *Clin Immunol.* 2016; (170): 31–8. DOI: 10.1016/j.clim.2016.07.022.
 24. Takaki H, Ichimiya S, Matsumoto M, Seya T. Mucosal Immune Response in Nasal-Associated Lymphoid Tissue upon Intranasal Administration by Adjuvants. *J Innate Immun.* 2018; (10): 515–21. DOI: 10.1159/000489405.
 25. Bhaduri-Mclntosh S, Landry ML, Nikiforow S, Rotenberg M, El-Guindy A, Miller G. Serum IgA antibodies to Epstein–Barr virus (EBV) early lytic antigens are present in primary EBV infection. *J Infect Dis.* 2007; 195 (4): 483–92.
 26. Cai YL, Li J, Lu AY, Zheng YM, Zhong WM, Wang W, Gao JQ, Zeng H, Cheng JR, Tang MZ. Diagnostic significance of combined detection of Epstein–Barr virus antibodies, VCA/IgA, EA/IgA, Rta/IgG and EBNA1/IgA for nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15 (5): 2001–6.
 27. Wang L, Tsai TH, Huang CF, Ho MS, Lin DB, Ho YC, Lin SS, Wei JC, Chou MC, Yang CC. Utilizing self-prepared ELISA plates for a cross-population study of different anti-HBe IgG subclass profiles. *J Med Virol.* 2007; 79 (5): 495–2.
 28. Wakiguchi H, Hisakawa H, Hosokawa T, Kubota H, Kurashige T. Analysis of IgG subclasses in chronic active Epstein–Barr virus infection. *Pediatr Int.* 2000; 42 (1): 21–5.

References

1. Kayamba V, Monze M, Asombang AW, Zyambo K, Kelly P. Serological response to Epstein–Barr virus early antigen is associated with gastric cancer and human immunodeficiency virus infection in Zambian adults: a case-control study. *Pan Afr Med J.* 2016; (23): 45. DOI: 10.11604/pamj.2016.23.45.8503.
2. Banko AV, Lazarevic IB, Folic MM, Djukic VB, Cirkovic AM, Karalic DZ, Cupic MD, Jovanovic TP. Characterization of the Variability of Epstein–Barr Virus Genes in Nasopharyngeal Biopsies: Potential Predictors for Carcinoma Progression. *PLoS One.* 2016; 11 (4): e0153498. DOI: 10.1371/journal.pone.0153498.
3. Frappier L. EBNA1. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015; (391): 3–34. DOI: 10.1007/978-3-319-22834-1_1.
4. Myhr KM, Riise T, Barrett-Connor E, Myrmet H, Vedeler C, Grønning M, Kalvenes MB, Nyland H. Altered antibody pattern to Epstein–Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998; 64 (4): 539–42.
5. Lomakin Y, Arapidi GP, Chernov A, Ziganshin R, Tcyganov E, Lyadova I, Butenko IO, Osetrova M, Ponomarenko N, Telegin G, Govorun VM, Gabibov A, Belogurov A Jr. Exposure to the Epstein–Barr Viral Antigen Latent Membrane Protein 1 Induces Myelin-Reactive Antibodies In Vivo. *Front Immunol.* 2017; (8): 777. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00777.
6. Piroozmand A, Haddad Kashani H, Zamani B. Correlation between Epstein–Barr Virus Infection and Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus: a Cross-Sectional Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017; (18): 523–7.
7. Pan R, Liu X, Zhou S, Ning Z, Zheng H, Gao M, Ding Y, Yao W, Liao X, He N. Differential prevalence and correlates of whole blood Epstein–Barr virus DNA between HIV-positive and HIV-negative men who have sex with men in Shanghai, China. *Epidemiol Infect.* 2017; 145 (11): 2330–40. DOI: 10.1017/S0950268817001054.
8. Lindsey JW, deGannes SL, Pate KA, Zhao X. Antibodies specific for Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 cross-react with human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *Mol Immunol.* 2016 Jan; (69): 7–12. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.11.007.
9. Lindsey JW. Antibodies to the Epstein–Barr virus proteins BFRF3 and BRRF2 cross-react with human proteins. *Neuroimmunol.* 2017; (310): 131–4.
10. Al Sidairi H, Binkhamis K, Jackson C, Roberts C, Heinstejn C, MacDonald J, Needle R, Hatchette TF, LeBlanc JJ. Comparison of two automated instruments for Epstein–Barr virus serology in a large adult hospital and implementation of an Epstein–Barr virus nuclear antigen-based testing algorithm. *J Med Microbiol.* 2017; 66 (11): 1628–34. DOI: 10.1099/jmm.0.000616.
11. Maylin S, Feghoul L, Salmona M, Herda A, Mercier-Delarue S, Simon F, Legoff J. Evaluation the Architect EBV VCA IgM, VCA IgG, and EBNA-1 IgG chemiluminescent immunoassays to

- assess EBV serostatus prior transplantation. *J Med Virol.* 2017; 89 (11): 2003–10. DOI: 10.1002/jmv.24889.
12. Simon KC, Saghaian-Hedengren S, Sverre-remark-Ekström E, Nilsson C, Ascherio A. Age at Epstein–Barr virus infection and Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 antibodies in Swedish children. *Mult Scler Relat Disord.* 2012; 1 (3): 136–8. DOI: 10.1016/j.msard.2012.03.002.
 13. Xiong G, Zhang B, Huang MY, Zhou H, Chen LZ, Feng QS, Luo X, Lin HJ, Zeng YX. Epstein–Barr virus (EBV) infection in Chinese children: a retrospective study of age-specific prevalence. *PLoS One.* 2014; 9 (6): e99857. DOI: 10.1371/journal.pone.0099857.
 14. Feng C, Kim JH. Beyond Avoidance: the Psychosocial Impact of Food Allergies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018. DOI: 10.1007/s12016-018-8708-x.
 15. Licari A, Castagnoli R, Brambilla I, Marseglia A, Tosca MA, Marseglia GL, Ciprandi G. Asthma Endotyping and Biomarkers in Childhood Asthma. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol.* 2018; 31 (2): 44–55. DOI: 10.1089/ped.2018.0886.
 16. Tsakok T, Woolf R, Smith CH, Weidinger S, Flohr C. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *Br J Dermatol.* 2018. DOI: 10.1111/bjd.16934.
 17. Carsin A, Mazonq J, Ilstad A, Dubus JC, Chanez P, Gras D. Bronchial epithelium in children: a key player in asthma. *Eur Respir Rev.* 2016; 25 (140): 158–69. DOI: 10.1183/16000617.0101-2015.
 18. Pivovarov VD, Ryazantsev DYu, Simonova MA, Dimitrieva TV, Khlgatian SV, Zavriev SK, Svirshchevskaya EV. Razrabotka test-sistemy dlja analiza antitel k virusu Jepshtejna–Barr metodom immuno-PCR. *Molekuljarnaja biologija.* 2018; 52 (4): 727–34.
 19. Simonova MA, Pivovarov VD, Ryazantsev DY, Dolgova AS, Berzhets VM, Zavriev SK, Svirshchevskaya EV. Comparative diagnostics of allergy using quantitative immuno-PCR and ELISA. *Bioanalysis.* 2018. DOI: 10.4155/bio-2017-0194.
 20. Chang L, Li J, Wang L. Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Anal Chim Acta.* 2016; (910): 12–24. DOI:10.1016/j.aca.2015.12.039.
 21. Jani D, Savino E, Goyal J. Feasibility of immuno-PCR technology platforms as an ultrasensitive tool for the detection of anti-drug antibodies. *Bioanalysis.* 2015; (7): 285–94.
 22. Ryazantsev DYu, Drobyazina PE, Khlgatian SV, Zavriev SK, Svirshchevskaya EV. Jekspressija allergenov kleshhej domashnej pyli Der f 1 i Der f 2 v list'jah Nicotiana benthamiana. *Bioorganicheskaja himija.* 2014; 40 (4): 468–78.
 23. Svirshchevskaya E, Fattakhova G, Khlgatian S, Chudakov D, Kashirina E, Ryazantsev D, Kotsareva O, Zavriev S. Direct versus sequential immunoglobulin switch in allergy and antiviral responses. *Clin Immunol.* 2016; (170): 31–8. DOI: 10.1016/j.clim.2016.07.022.
 24. Takaki H, Ichimiya S, Matsumoto M, Seya T. Mucosal Immune Response in Nasal-Associated Lymphoid Tissue upon Intranasal Administration by Adjuvants. *J Innate Immun.* 2018; (10): 515–21. DOI: 10.1159/000489405.
 25. Bhaduri-McIntosh S, Landry ML, Nikiforow S, Rotenberg M, El-Guindy A, Miller G. Serum IgA antibodies to Epstein–Barr virus (EBV) early lytic antigens are present in primary EBV infection. *J Infect Dis.* 2007; 195 (4): 483–92.
 26. Cai YL, Li J, Lu AY, Zheng YM, Zhong WM, Wang W, Gao JQ, Zeng H, Cheng JR, Tang MZ. Diagnostic significance of combined detection of Epstein–Barr virus antibodies, VCA/IgA, EA/IgA, Rta/IgG and EBNA1/IgA for nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15 (5): 2001–6.
 27. Wang L, Tsai TH, Huang CF, Ho MS, Lin DB, Ho YC, Lin SS, Wei JC, Chou MC, Yang CC. Utilizing self-prepared ELISA plates for a cross-population study of different anti-HBe IgG subclass profiles. *J Med Virol.* 2007; 79 (5): 495–2.
 28. Wakiguchi H, Hisakawa H, Hosokawa T, Kubota H, Kurashige T. Analysis of IgG subclasses in chronic active Epstein–Barr virus infection. *Pediatr Int.* 2000; 42 (1): 21–5.

СВЯЗЬ СУТОЧНЫХ КОЛЕБАНИЙ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ С ИЗМЕНЕНИЕМ РИТМОВ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ ПРИ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ВТОРОЙ СТАДИИ

О. А. Радаева¹✉, А. С. Симбирцев², А. В. Ховряков³

¹ Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева, Саранск, Россия

² Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБУЗ РМ «Республиканская клиническая больница № 4», Саранск, Россия

Все больше внимания уделяется исследованию роли суточных ритмов в патологических процессах в организме. Безусловно, существуют суточные иммунные маркеры, позволяющие судить о прогрессировании ряда заболеваний. Целью исследования было изучить содержание цитокинов (интерлейкинов, молекул адгезии, факторов некроза опухоли, роста и др.) в сыворотке периферической крови больных эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ) II стадии в утреннее/вечернее время и его корреляцию со степенью снижения артериального давления (АД) в ночное время. У 90 пациентов с ЭАГ II стадии проводили забор крови в 7.00 и 20.00 ч, определяли иммуноферментным методом в сыворотке периферической крови цитокины и проводили анализ данных суточного мониторинга АД с выделением групп: «Dipper», «Non-dipper», «Night-peaker». Обнаружено изменение отношения утренних и вечерних концентраций при сравнении со здоровыми, за счет повышения степени роста в вечернее время как цитокинов из группы «somnogenic» (IL1 β , IL1 α), так и мало изученных в аспекте суточных закономерностей LIF, sLIFr, M-CSF. Динамика и уровни исследуемых показателей у пациентов с ЭАГ II стадией и анамнезом заболевания 10–14 лет без гипотензивной терапии отличались от таковых в группе здоровых добровольцев (контроля). Повышение концентраций IL1 α , LIF, sLIFr, M-CSF, эритропоэтина в 20.00 ч на 20% и более является значимым компонентом формирования патологических околосуточных ритмов АД («Non-dipper» и «Night-peaker») у больных ЭАГ II стадии при длительности заболевания 10–14 лет (без приема гипотензивных препаратов). Понимание патофизиологической роли изменения не только количественных характеристик цитокинов сыворотки периферической крови у больных ЭАГ II стадии, но и особенностей их суточной динамики может стать основой создания новых систем профилактики прогрессирования ЭАГ и снизить частоту повреждения органов-мишеней.

Ключевые слова: цитокины, эссенциальная артериальная гипертензия, «Dipper», «Non-dipper», «Night-peaker»

Информация о вкладе авторов: О. А. Радаева: набор группы пациентов, забор материала для исследования, интерпретация результатов исследования и литературных данных, подготовка первоначального варианта текста статьи, компьютерная работа с текстом; А. С. Симбирцев: научное руководство, определение цели и задач, методологии исследования, критический анализ полученных результатов и доработка текста; А. В. Ховряков: набор группы пациентов, забор материала для исследования, компьютерная работа с текстом.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ «МГУ им. Н. П. Огарева» (протоколы № 12 от 14 декабря 2008 г.); отбор биологического материала для исследования (кровь) произвели с учетом положений Хельсинкской Декларации ВМА (2000) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999); все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на участие в эксперименте.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Александровна Радаева
ул. Ульянова, д. 26а, г. Саранск, 430030; vtlbwbyf_79@mail.ru

Статья получена: 16.07.2018 **Статья принята к печати:** 01.03.2019 **Опубликована онлайн:** 12.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.011

A CORRELATION BETWEEN THE FLUCTUATIONS OF CYTOKINE CONCENTRATIONS MEASURED IN THE MORNING AND EVENING AND THE CIRCADIAN BLOOD PRESSURE RHYTHM IN PATIENTS WITH STAGE II ESSENTIAL HYPERTENSION

Radaeva OA¹✉, Simbirtsev AS², Khovryakov AV³

¹ National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

² State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA, St. Petersburg, Russia

³ Mordovian Republican Clinical Hospital No.4, Saransk, Russia

Today, increasing attention is being paid to the role of circadian rhythms in pathology. There are time-of-day-dependent immune markers that provide valuable information about disease progression. The aim of this study was to measure evening and morning concentrations of a few cytokines (interleukins, adhesion molecules, tumor necrosis/growth factors, etc.) in the peripheral blood of patients with stage II essential hypertension and to investigate how they correlate with a nocturnal blood pressure decline. Blood samples were collected from 90 patients with stage II EH at 7:00 a.m. and 8:00 p.m. Cytokine concentrations were measured using immunoassays. Based on 24-h blood pressure monitoring, the patients were distributed into 3 groups: dippers, non-dippers and night-peakers. The morning to evening ratios of cytokine concentrations in patients with EH differed from those in healthy controls due to an increase in the evening concentrations of somnogenic cytokines (IL1 β , IL1 α) and LIF, sLIFr, and M-CSF whose daily fluctuations patterns remain understudied. On the whole, the fluctuation patterns of the measured cytokines in patients with stage II EH who had had the condition for 10 to 14 years and were receiving no antihypertensive treatment at the time of our study differed from those displayed by healthy controls. A twenty percent rise in the evening concentrations of IL1 α , LIF, sLIFr, M-CSF, and erythropoietin contributes significantly to pathological blood pressure rhythms (as demonstrated by the groups of non-dippers and night-peakers) in patients with stage II EH receiving no antihypertensive therapy. Understanding the pathophysiological role of cytokine levels and their fluctuations over a 24-h cycle could inspire new methods for EH prevention and reduce end-organ damage.

Keywords: cytokines, essential hypertension, Dipper, Non-dipper, Night-peaker

Author contribution: Radaeva OA recruited the study participants, collected blood samples, interpreted the results, analyzed the literature, and helped to write a draft of the manuscript. Simbirtsev AS supervised the research group, identified the aims and objectives of the study, proposed a methodology, and provided critical feedback. Khovryakov AV recruited the study participants, collected blood samples and wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ogariov Mordovian State University (Protocol 12 dated December 14, 2008). All patients gave their informed consent to participate. Blood samples were collected in full compliance with the Declaration of Helsinki (2000) and the Protocol of the Convention on Human Rights and Biomedicine of the Council of Europe (1999).

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Radaeva
Ulianova 26/a, Saransk, 430030; vtlbwbyf_79@mail.ru

Received: 16.07.2018 **Accepted:** 01.03.2019 **Published online:** 12.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.011

Циркадианные ритмы — это околосуточные колебания в поведении и физиологии, которые подготавливают организм к тому, чтобы лучше реагировать на изменения окружающей среды, происходящие вследствие вращения Земли [1]. Клеточные часы берут начало от цианобактерий, соответствующие механизмы найдены у всех многоклеточных организмов и сохраняются у млекопитающих. Лауреатами Нобелевской премии в 2017 г. по направлению: «Физиология и медицина» стали Джеффри Холл (Jeffrey C. Hall), Майкл Росбаш (Michael Rosbash) и Майкл Янг (Michael W. Young), «за открытие и исследование молекулярных механизмов, управляющих циркадианными ритмами». Это подчеркивает значимость изучения роли суточных ритмов в рамках как физиологических, так и патологических процессов. В 1960 г. Halberg и соавторы озвучили базовые принципы исследований суточных ритмов в иммунологии на примере циркадианного характера восприимчивости мышей после введения бактериального эндотоксина. Цикл сна–бодрствования — одно из наиболее изученных проявлений циркадианного ритма и соотносится как с иммунным ответом, так и с динамикой артериального давления (АД) [2]. По данным современных научных исследований, провоспалительные цитокины относятся к группе «*somnogenic*» (повышение синтеза во время фазы покоя), противовоспалительные цитокины, такие как IL10, активизируются после пробуждения и подавляют сон. Наибольшее количество научных статей посвящено суточным колебаниям IL1 β , TNF α , IFN γ , IL6 и IL4 и IL10 [1, 3, 4, 5]. В соответствии с классическими принципами контроля уровня АД значимыми являются нейроэндокринные механизмы: моноаминергические системы (изменение физиологической активности автономной нервной системы и секреции биогенных аминов), гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая, гипоталамо-гипофизарно-щитовидная, опиоидная, ренин-ангиотензин-альдостероновая и эндотелиальная системы и вазоактивные пептиды [6, 7]. В последнее время возрос интерес к суточным ритмам и их влиянию на иммунную систему, но, несмотря на значительный прогресс в понимании этих механизмов, многие суточные фенотипы еще предстоит понять. В ряде экспериментальных исследований доказывается связь поражения органов-мишеней при ЭАГ в зависимости от времени суток [8] и процента снижения АД в ночное время [9]. Безусловно, прогрессивное течение эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) с закреплением высоких значений АД и снижением вариаций в вечернее время соотносится с уровнями некоторых цитокинов, что дает возможность предположить наличие суточных иммунных маркеров, определяющих прогрессирование сердечно-сосудистых заболеваний и обосновывает цель нашего исследования — изучить связь содержания цитокинов (интерлейкинов, молекул адгезии, факторов некроза опухоли, роста и др.), эритропоэтина в сыворотке периферической крови больных ЭАГ II стадии в утреннее и вечернее время (7.00 и 20.00 ч) со степенью снижения АД в вечернее время у данной категории пациентов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполняли на базе Регионального сосудистого центра ГБУЗ РМ «КБ № 4», ГБУЗ РМ «РКБ № 3» и кафедре иммунологии, микробиологии, вирусологии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева. В исследовании участвовали 90 пациентов (40 мужчин и 50 женщин).

Группу контроля составили 50 здоровых добровольцев (сопоставимых по полу и возрасту, без признаков ЭАГ). Критерии включения пациентов в исследование: возраст 57,5 \pm 1,17 лет; ЭАГ II стадии; длительность заболевания 10–14 лет; отсутствие гипотензивной терапии. Критерии исключения: ассоциированные клинические состояния, сахарный диабет I и II типов, метаболический синдром, аутоиммунные, аллергические заболевания, симптоматическая артериальная гипертензия, перенесенные за месяц до начала исследования инфекционные заболевания, психические заболевания, алкогольная/наркотическая зависимость, отказ пациента от долгосрочного участия в исследовании. У участников исследования и членов группы контроля провели забор крови в 7.00 и 20.00 ч (интервал без приема пищи не менее 6 ч) с определением в сыворотке периферической крови IL1 β , IL1 α , IL1ra, IL18, IL18BP, IL37, IL6, sIL6r, LIF, sLIFr, TNF α , sTNF-RI, IL2, IL10, TGF- β 1, IL8, CX3CL1, CXCL10, INF γ , M-CSF, эритропоэтина и вазоактивных пептидов: NO, iNOS, eNOS, ADMA, SDMA, Nt-proCNP, Nt-proBNP (у 20% с целью проверки воспроизводимости результатов применяли метод парных сывороток, повторный забор крови через месяц: вариации в интервале 3–6%). Временные точки измерений выбрали на основе данных литературы [1, 8, 10] и собственных пилотных исследований (у 5 здоровых и 24 больных ЭАГ II стадии с разными типами суточного ритма АД определяли уровень 6 цитокинов (IL1 α , LIF, sLIFr, M-CSF, эритропоэтина) в 6.00, 8.00, 12.00, 16.00, 20.00, 00.00 ч.

Уровень цитокинов сыворотки периферической крови и вазоактивных веществ определяли иммуноферментным методом на базе лаборатории кафедры иммунологии МГУ им. Н. П. Огарева (лицензия РФ № 13.01.04.0001.Л.000005.06.11 от 23 июня 2011 г., бессрочная) на иммуноферментном анализаторе «Personal Lab TM» (Adaltis; Италия).

Всем участникам исследования специалисты Регионального сосудистого центра ГБУЗ РМ «РКБ № 4», ГБУЗ РМ «РКБ № 3» проводили суточное мониторирование АД с помощью системы Space Labs Medical 90702 (Spacelabs Medical, Inc.; США) согласно рекомендациям IV Международной согласительной конференции по проблемам СМАД в амбулаторных условиях (Бельгия, 1994 г.); данные заносили в истории болезни или амбулаторные карты пациентов. Пациенты были разделены на группы в соответствии со степенью изменения АД в ночное время (снижение на 10–20% — «Dipper»; < 10% — «Non-dipper»; повышение — «Night-peaker»).

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica версии 8.0. (StatSoft Inc.; США) Нормальность распределения показателей определяли с помощью одновыборочного критерия Колмогорова–Смирнова. При подтверждении нормального распределения данные представляли в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD), для признаков с отличным от нормального распределения указывали медиану (Me) и межквартильный размах — 25-й и 75-й процентиля (C25%–C75%). В зависимости от нормальности и объема выборки использовали: для сравнения несвязанных групп — двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента и критерий Манна–Уитни; для связанных групп — парный критерий Стьюдента и критерий Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У пациентов с ЭАГ II стадией и анамнезом заболевания 10–14 лет без гипотензивной терапии в утренние часы

наблюдали в сыворотке периферической крови более высокие концентрации IL1 β , IL1 α , IL18, IL18BP, IL6, sIL6r, LIF, TNF α , sTNF-RI, IL10, TGF- β 1, IL8, CX3CL1, CXCL10, INF γ , M-CSF, эритропоэтина ($p < 0,001$) на фоне меньших концентраций IL1ra ($p < 0,001$) по сравнению со здоровыми добровольцами (табл. 1). Анализ динамики показал увеличение уровня IL1 β на 14,1% (0,37), $p < 0,05$; IL1 α — на 14,8% (0,33), $p < 0,05$; IL6 — на 29,2% (0,98), $p < 0,001$; TNF α — на 12,3% (0,78), $p < 0,01$; sTNF-RI — на 12,6% (0,65), $p < 0,05$; на фоне снижения IL1ra на 14,6% (0,32), $p < 0,01$; IL10 — на 23% (0,58), $p < 0,01$ и sIL6r — на 30,4% (1,54), $p < 0,001$ в вечерние часы в группе здоровых. У пациентов с ЭАГ II стадии направление динамики изменений совпадало с группой контроля, но с достоверно большей степенью увеличения: IL1 β на 21,3% (0,92), $p < 0,001$; IL1 α — на 31,2% (1,12), $p < 0,001$. Наиболее выраженные патогенетически значимые отличия связаны с ростом в сыворотке периферической крови больных гипертензией содержания LIF на 16% (0,43), $p < 0,01$ и sLIFr — на 22% (0,63), $p < 0,001$; M-CSF — на 20,2% (0,42), $p < 0,001$ и эритропоэтина — на 36,5% (1,22), $p < 0,001$, а также снижением IL18BP на 11% (0,27), $p < 0,05$; IL37 на 21,7% (0,86), $p < 0,001$, что не определено в группе контроля. Данные в отношении процента роста IL6 и TNF α в вечернее время сопоставимы в двух группах (IL6 на 31% (1,02) и 29,2% (0,98), $p < 0,001$); TNF α на 12,3% (0,78) и на 12,2% (0,66), $p < 0,01$), но у здоровых на фоне снижения sIL6r ($p < 0,001$), что вторично уменьшает активность IL6 после 20.00 ч. У лиц на фоне повышенного АД данного протективного компонента не зарегистрировано.

Анализ изменения вечерних концентраций IL10 выявил в процентном отношении сопоставимое снижение ($p < 0,01$) провоспалительного цитокина в группе здоровых и на фоне гипертензии — на 17% (0,58) и 15% (0,63) соответственно.

При анализе утренних и вечерних концентраций цитокинов и вазоактивных веществ выявлено усиление прямых корреляционных связей вечерних концентраций: IL1 α и ADMA, $r = 0,76$, $p < 0,01$ (между дневными уровнями: $r = 0,58$, $p < 0,05$); sLIFr и SDMA, $r = 0,85$, $p < 0,001$ (между дневными уровнями: $r = 0,69$, $p < 0,05$); M-CSF и SDMA, $r = 0,81$, $p < 0,01$ (между дневными уровнями: $r = 0,51$, $p < 0,05$). Сила и направление связей между IL1 β , IL1ra, IL18, IL18BP, IL37, IL6, sIL6r, LIF, TNF α , sTNF-RI, IL2, IL10, TGF- β 1, IL8, CX3CL1, CXCL10, INF γ и сывороточными концентрациями вазоактивных веществ в вечернее время не отличались от данных, полученных в 7.00 ч.

Зарегистрированное в ходе исследования выраженное повышение у больных ЭАГ II стадии в вечернее время концентрации некоторых цитокинов, коррелирующих с вазопрессорными факторами, актуализирует сравнение утренних/вечерних уровней цитокинов в сыворотке периферической крови с типами суточного ритма АД («Dipper»; «Non-dipper» и «Night-peaker»).

Пациенты с адекватным снижением АД в ночное время (10–20%) — группа «Dipper» — как и другие группы больных ЭАГ II стадии характеризуются более высокими концентрациями провоспалительных цитокинов, но степень и направление их изменения в вечернее время (анализ временных точек в 7.00 и 20.00) по данным 16 цитокинов (IL1 β , IL18, IL18BP, IL37, LIF, sLIFr, TNF α , sTNF-RI, IL2, IL8,

Таблица 1. Утренние и вечерние уровни цитокинов (пг/мл) в сыворотках больных ЭАГ II стадии (анамнез от 10 до 14 лет) без приема гипотензивных препаратов

Цитокины	Здоровые (n = 50)		Больные ЭАГ II стадии (n = 90)	
	7.00 ч	20.00 ч	7.00 ч	20.00 ч
	1	2	3	4
IL1 β	5,2 (1,87)	5,95 (1,37) ¹¹	18,7 (5,8) ^{*1}	22,8 (6,12) ^{*2,3}
IL1 α	3,83 (1,17)	4,37 (0,98) ¹¹	13,2 (3) ^{*1}	17,2 (2,93) ^{*2,3}
IL1ra	691 (99)	598 (96) ^{^1}	575 (108) ^{*1}	582 (96,2)
IL18	197 (59)	201 (48)	371 (84) ^{*1}	382 (83) ^{*2}
IL18BP	4934 (1173)	4903 (1122)	6710(1980) ^{*1}	5970 (1783) ^{^2,3}
IL37	90 (25,6)	88 (17,3)	92 (24,5)	71,6 (18,2) ¹¹
IL6	3,12 (0,63)	4,03 (0,69) ^{*1}	23,7 (4,2) ^{*1}	27,2 (3,92) ^{*2,3}
sIL6r	681 (52)	478 (50) ^{*1}	1826 (263) ^{*1}	1902 (255) ^{*2}
LIF	1,41 (0,61)	1,47 (0,54)	7,54 (2,4) ^{*1}	9,08 (2,24) ^{*2,3}
sLIFr	3920 (1123)	4003 (1223)	4100 (1200)	5100 (1420) ^{*2,3}
TNF- α	7,56 (1,83)	8,49 (1,64) ^{^1}	21,4 (4) ^{*1}	23,2 (3,84) ^{*2,^3}
sTNF-RI	1620 (367)	1817 (367) ¹¹	2770 (670) ^{*1}	2810 (627) ^{*2}
IL2	10,1 (2,12)	10,7 (1,97)	10,8 (3,11)	10,4 (2,82)
IL8	8,75 (1,82)	9,21 (2,03)	29 (7,83) ^{*1}	31,2 (6,61) ^{*2}
IL10	18,2 (5,7)	15,9 (4,83) ^{^1}	26,2 (7,9) ^{*1}	22,3 (6,87) ^{*2,3}
INF γ	8,97 (2,23)	8,84 (2,14)	18,4 (4,3) ^{*1}	18,7 (3,96) ^{*2}
M-CSF	202 (51)	197 (47)	389 (92) ^{*1}	463 (87) ^{*2,3}
CX3CL1	422 (61,3)	436 (58,1)	520 (120) ^{*1}	503 (112) ^{^2}
CXCL10	8,83 (1,73)	8,97 (1,24)	18,2 (4,5) ^{*1}	17,9 (3,84) ^{*2}
TGF β 1	11,5 (3,23)	10,2 (2,84)	21,4 (4,64) ^{*1}	20,2 (4,24) ^{*2}
Эритропоэтин	3,93 (1,31)	4,27 (1,01)	12,6 (3,8) ^{*1}	17,2 (3,43) ^{*2,3}

Примечание: уровень достоверности: ¹ — $< 0,05$, [^] — $< 0,01$, ^{*} — $< 0,001$ при сравнении с указанной группой. Данные представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD).

IL10, IFN γ , CX3CL1, CXCL10, TGF β 1, M-CSF) совпадали с аналогичными показателями у здоровых лиц (табл. 2). В этой группе отличалась суточная динамика только шести показателей: системы IL6/sIL6r (менее выраженный рост в вечернее время IL6 на фоне сохранения высоких концентраций sIL6r), и в отличие от здоровых отсутствовало снижение IL1ra (является протективным элементом) и эритропоэтина при увеличении в сыворотке крови в 20.00 ч содержания IL1 α (более чем на 20% при сравнении с данными, полученными в 7.00 ч). По результатам нашего исследования суточных закономерностей изменения уровней 21 цитокина в вечернее время по сравнению с утренними данными, наибольшее патогенетическое значение в аспекте прогрессирования гипертензии имеет отклонение уровней от утренней концентрации более чем на 20%, что в группе «Dipper» определено только для IL1 α , который ассоциируется с увеличением ADMA в сыворотке крови больных ЭАГ II стадии.

В группе пациентов «Non-dipper» с недостаточным снижением АД в ночное время (< 10%) наблюдали более выраженное изменение содержания цитокинов в вечернее время в крови при сопоставлении со здоровыми и группой «Dipper» (табл. 2). Отношение утренних и вечерних уровней только 9 цитокинов (IL18, TNF α , sTNF-RI, IL2, IL8, IFN γ , TGF β 1, CX3CL1, CXCL10) сохраняет закономерности, схожие с группой здоровых лиц. Отклонение от утренних концентраций на 20% и более с достоверным отличием от группы здоровых определено при анализе отношения

между утренними и вечерними концентрациями IL1 β , IL1 α , IL37, LIF, sLIFr, IL10, M-CSF и эритропоэтина. Для IL37 и IL10 (по данным нашего исследования, они обладают протективными свойствами в аспекте прогрессирования гипертензии) у пациентов с недостаточным снижением АД характерно более выраженное падение в ночное время в сыворотке крови по сравнению со здоровыми, а для IL1 β , IL1 α , LIF, sLIFr, M-CSF, эритропоэтина — рост. Необходимо отметить, что в группе «Non-dipper» вечерние уровни IL1ra не отличаются от утренних (в группе здоровых обнаружено достоверное снижение), что также служит признаком протективности, как и в группе «Dipper», так как возникает буферный потенциал в отношении роста IL1 β и IL1 α .

В группе «Night-peaker» с повышением АД в ночное время тенденция суточной динамики 9 цитокинов схожа с таковой у группы здоровых (IL1ra, IL18, TNF α , sTNF-RI, IL2, IL8, CX3CL1, CXCL10, TGF β 1) (табл. 2). Отклонение от утренних концентраций на 20% и более с достоверным отличием от группы здоровых выявлено при анализе ритмов показателей IL1 β , IL1 α , IL37, LIF, sLIFr, M-CSF, неоптерина, эритропоэтина. Для IL37 (по данным нашего исследования, с условно протективными свойствами относительно прогрессирования гипертензии) у пациентов с повышением АД характерно более выраженное падение в вечернее время в сыворотке крови при сравнении со здоровыми, а для IL1 β , IL1 α , LIF, sLIFr, M-CSF, неоптерина, эритропоэтина — более выраженный рост. Необходимо отметить, что в группе «Night-peaker» вечерние уровни IL10

Таблица 2. Утренние и вечерние уровни цитокинов (пг/мл) в сыворотках периферической крови больных ЭАГ II стадии (анамнез заболевания от 10 до 14 лет) без приема гипотензивных препаратов в зависимости от типа суточного ритма артериального давления

Цитокины	«Dipper» (n = 36 человек)		«Non-dipper» (n = 30 человек)		«Night-peaker» (n = 24 человек)	
	7.00	20.00	7.00	20.00	7.00	20.00
	1	2	3	4	5	6
IL1 β	16,3 [3,24–25,1]	18,7 [10,3–29,4] ^{^1}	16,8 [3,32–26,4]	22,3 [15,6–32,8] ^{^2*3}	22,4 [10,4–32,2] ^{^1,3}	29,4 [18,9–36,3] ^{^2,5^4}
IL1 α	12,5 [5,72–17,3]	15,2 [10,4–21,3] ^{^1}	12,8 [5,23–17,9]	17,3 [13,8–23,1] ^{^2*3}	16,2 [10,1–20,2] ^{^1,3}	23,7 [17,2–24,8] ^{^2,5,4}
IL1ra	570 [493–670]	591 [517–691]	567 [488–691]	586 [504–652]	589 [468–702]	514 [387–601] ^{^2,4,5}
IL18	370 [311–432]	400 [322–465]	362 [291–421]	407 [319–467]	389 [298–444]	397 [263–450]
IL18BP	6740 [5370–8457]	5990 [4700–7100] ^{^1}	6940 [5128–8620]	6103 [4620–7130] ^{^3}	6630 [4970–8520]	5930 [4550–7310] ^{^5}
IL37	87,5 [70,2–110]	82,3 [59,3–109]	90,1 [67,5–106]	60,4 [32,2–83,3] ^{^2,3}	85,4 [68,7–114]	62,5 [33,4–80,9] ^{^2,5}
IL6	23,9 [20,8–26,7]	27,2 [24,5–29,9] ^{^1}	24,3 [20–26,9]	27,7 [24–29,3] ^{^3}	23,7 [21,2–26,5]	26,8 [24,8–30] ^{^5}
sIL6r	1826 [1648–2003]	1902 [1730–2073]	1793 [1615–2121]	1837 [1710–2113]	1804 [1583–2107]	1924 [1698–2107]
LIF	8,07 [4,68–10,3]	8,56 [6,86–9,93]	7,09 [4,92–9,12]	10,8 [9,92–12,1] ^{^2*3}	8,32 [5,13–9,3]	11,3 [8,43–12,9] ^{^2,5}
sLIFr	4140 [3120–4820]	4320 [3270–5240]	4060 [3230–4770]	5930 [4600–7720] ^{^2,3}	3980 [3040–4910]	6030 [4580–7810] ^{^2,5}
TNF- α	21,2 [18,3–24]	23,6 [20,9–26,1] ^{^1}	20,7 [18,9–23,5]	23,1 [20,2–25,7] ^{^5}	20,9 [17,9–24,3]	23,9 [21,6–26,7] ^{^5}
sTNF-RI	2790 [2320–3220]	3030 [2607–3450] ^{^1}	2810 [2280–3110]	3110 [2406–3640] ^{^3}	2720 [2120–3310]	3090 [2540–3620] ^{^5}
IL2	10,6 [8,92–12,9]	10,4 [8,5–12,2]	10,9 [8,83–12,4]	11,1 [8,69–12,5]	10 [8,63–11,7]	10,4 [8,57–12,1]
IL8	29,1 [23,7–34,3]	31,2 [26,8–35,6]	30,4 [23,9–34,8]	32,4 [27,7–36,2]	29,8 [22,9–33,8]	30,9 [25,9–35,3]
IL10	26,2 [20,9–31,5]	22,3 [17,7–27] ^{^1}	27,8 [19,7–32,6]	21,6 [16,9–26,3] ^{^3}	25,7 [19,1–30,3]	23,5 [18,5–28,1]
IFN γ	18,4 [15,5–21,3]	19,3 [16–21,8]	18,9 [16,7–22,3]	20,2 [17,3–22,4]	17,9 [14,7–21,8]	21,1 [17,4–24,3] ^{^2,5}
M-CSF	371 [320–448]	402 [345–484] ^{^1}	378 [314–452]	451 [391–540] ^{^2*3}	394 [322–440]	517 [410–614] ^{^2,4,5}
CX3CL1	520 [439–607]	503 [427–579]	553 [455–647]	544 [409–597]	546 [461–639]	519 [447–602]
CXCL10	18,6 [15,2–21,3]	17,7 [15,1–20,5]	19,5 [16,3–22,1]	18,2 [15,8–21,3]	17,9 [14,7–21,9]	18,9 [15,4–21,3]
TGF β 1	21,4 [18,3–24,9]	20,3 [17,2–23,1]	22,1 [18,1–24,3]	19,7 [16,8–22,9]	20,9 [17,9–24,5]	20,6 [17,7–23,3]
Эритропоэтин	15,5 [10,2–20,3]	15,7 [9,62–19,9]	12,5 [9,12–15,6] ^{^1}	17,2 [12,9–22,3] ^{^2*3}	12,7 [7,8–16,9] ^{^1}	20,3 [16,2–24,7] ^{^2,5^4}

Примечание: уровень достоверности: ^{^1} — < 0,05, ^{^2} — < 0,01, ^{^3} — < 0,001 при сравнении с указанной группой (1 — 7.00 «Dipper», 2 — 20.00 «Dipper», 3 — 7.00 «Non-Dipper», 4 — 20.00 «Non-Dipper», 5 — 7.00 «Night-peaker», 6 — 20.00 «Night-peaker»). Данные представлены в виде медианы (Me), 25-й и 75-й процентилей [C25%–C75%].

не отличаются от утренних (в группе здоровых достоверное снижение), и данная тенденция может быть протективной, так как они реализуют буферный потенциал в отношении роста провоспалительных цитокинов. Пациенты группы «Night-peaker» имеют схожие с пациентами группы «Non-dipper» закономерности изменения суточного синтеза цитокинов. Различия выражаются в «потере» протективного потенциала IL1ra в вечернее время в группе «Night-peaker» (определено достоверное снижение в 20.00 ч), но на фоне отмены снижения противовоспалительного цитокина IL10 (данная закономерность не регистрируется в группе «Non-dipper»), что условно выравнивает протективные линии групп «Night-peaker» и «Non-dipper». В группе «Night-peaker» определяется большая степень повышения в вечернее время уровней IL1 α , M-CSF и эритропоэтина при сохранении общей тенденции пациентов категории «Non-dipper» — рост более 35% в 20.00 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По литературным данным, влияние цитокинов (IL1 β , TNF α , IFN γ , IL6, IL4 и IL10) на биологическую активность нейромедиаторов/нейромодуляторов, а также прямое действие на нейроны в определенных областях головного мозга способствуют регуляции архитектоники сна (наиболее изученного циркадианного ритма) [2], а значит в той или иной степени связаны с процессами, косвенно совпадающими с ритмом сна и бодрствования, в частности с изменением уровня АД. По результатам нашего исследования, анализ содержания цитокинов в сыворотке периферической крови больных с ЭАГ II стадии и длительностью заболевания 10–14 лет демонстрирует искажение динамики эндогенных суточных колебаний при сравнении со здоровыми за счет повышения степени роста в вечернее время уровня как классических цитокинов из группы «somnogenic» (IL1 β , IL1 α), так и малоизученных в данном аспекте LIF, sLIFr, M-CSF. У лиц без ЭАГ изменение в вечернее время уровня указанных иммунорегуляторных пептидов составляет для LIF, sLIFr, M-CSF менее 10%, а для IL1 α и эритропоэтина — 10–15%. Важно отметить, что изменение по сравнению со здоровыми динамики синтеза цитокинов у больных ЭАГ II стадии при длительности заболевания 10–14 лет (без приема гипотензивных препаратов) выражается в повышении в 20.00 ч на 20% и более уровней IL1 α , LIF, sLIFr, M-CSF, эритропоэтина до значений, которые, по нашим результатам, коррелируют с ростом вазоактивных веществ с прессорным действием, наиболее выражено с уровнями ADMA и SDMA (ADMA конкурирует с L-аргинином в рамках взаимодействия с eNOS [11], SDMA — структурный изомер ADMA — влияет на этап связывания аргинина с трансмембранным переносчиком, ограничивая его доступность для eNOS и снижая последующее образование NO [12]). Данная тенденция значима в аспекте прогрессирования ЭАГ и находит подтверждение в данных последних экспериментальных международных исследований: IL1 α оказывает прямое стимулирующее действие на пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, активизирует процессы фиброобразования, а также способствует повышению экспрессии мРНК рецепторов классических вазопрессоров (ангиотензина II, эндотелина-1) на поверхности гладкомышечных клеток сосудистой стенки [13]. По нашим данным, IL1 α вторично повышает уровень LIF в крови больных ЭАГ [14], что может стимулировать LIF-опосредованный ток Ca²⁺

и ER β -зависимую активацию MAPK [15]; рост M-CSF подавляет активность eNOS [16], а также снижает уровень мРНК собственного рецептора IL34 (PTP- ζ) [17], что подтверждается нашими собственными данными. Снижение IL34 в сыворотке периферической крови у больных ЭАГ при росте M-CSF [18] блокирует его протективные эффекты в отношении головного мозга. Суммарно эти биологические эффекты могут запускать и закреплять изменение архитектоники сосудов со снижением вазодилатации и повышением чувствительности к вазопрессором. Данные патологические процессы реализуются на фоне снижения уровней цитокинов с протективными свойствами при ЭАГ (IL37) и без роста IL10, что наиболее выражено у лиц с патологическим искажением суточного ритма АД («Non-dipper» и «Night-peaker»).

В группе с сохранением физиологического снижения АД в ночное время более 10% («Dipper») суточные изменения уровней основных цитокинов (IL1 β , IL18, IL18BP, IL37, LIF, sLIFr, TNF α , sTNF-RI, IL2, IL8, IL10, IFN γ , CX3CL1, CXCL10, TGF β 1, M-CSF) сохраняют закономерности динамики показателей, наблюдаемые у здоровых, с количественными изменениями в 20.00 ч в интервале до 15%, исключая более выраженные физиологические колебания в системе IL6/sIL6r и эритропоэтина в группе без ЭАГ. Увеличение в сыворотке уровней IL1 β , IL1 α , LIF, sLIFr, M-CSF и эритропоэтина более чем на 20% в 20.00 ч потенциально является одним из факторов, изменяющих тонус сосудов и центральную регуляцию АД. При этом АД недостаточно снижается в ночное время, происходит повышение уровня данных цитокинов в 20.00 ч в виде роста более чем на 35%, что ассоциируется с ростом АД в указанный временной период. Эти изменения объясняются выявленными корреляциями с вазопрессорами и согласуются с данными экспериментальных исследований, упомянутых выше. Представляет интерес изменение протективных цитокиновых механизмов при переходе от лиц без ЭАГ к группам «Dipper», «Non-dipper» и «Night-peaker»; оно иллюстрирует различие противодействия активности провоспалительных цитокинов: в группе «Dipper» аналогично лицам без ЭАГ снижается концентрация IL10 в 20.00 ч, но блокируется вечернее падение IL1ra, демонстрируя компенсаторное антагонистическое действие в отношении роста IL1 β , IL1 α (без снижения sIL6r, характерного для здоровых), что дает дополнительную активность IL6; в группе «Non-dipper» дополнительно формируется отрицательная динамика концентрации IL37 в 20.00 ч, и только в группе «Night-peaker» не регистрируется в вечернее время падение IL10, что указывает на формирование линии противодействия провоспалительным цитокинам, но со снижением уровня IL1ra.

ВЫВОДЫ

В ходе исследования выявлены изменения суточной динамики содержания цитокинов в сыворотке периферической крови больных ЭАГ II стадии, которые ассоциированы с формированием патологических суточных ритмов АД («Non-dipper» и «Night-peaker»), в первую очередь, за счет роста в вечернее время уровней LIF, sLIFr, M-CSF, IL1 α и эритропоэтина более чем на 20%, а в группе «Night-peaker» — более чем на 35%. Пациенты с достаточным снижением АД в ночное время («Dipper») имеют более высокие уровни провоспалительных цитокинов, чем здоровые, но с сохранением суточной динамики, аналогичной таковой в

группе здоровых. Глубокое понимание патофизиологической роли изменений не только количественных характеристик цитокинов сыворотки периферической крови у больных ЭАГ II стадии, но и особенностей их суточной динамики, связей с формированием патологических суточных вариаций АД может стать основой создания новых систем

профилактики прогрессирования ЭАГ со снижением частоты повреждения органов-мишеней и разработкой персонализированных программ диспансеризации. Это доказывает актуальность исследований, направленных на изучение динамики физиологических показателей в связи с циркадианными ритмами.

Литература

1. Geiger SS, Fagundes CT, Siegel RM. Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology*. 2015; 146 (3): 349–58.
2. Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. Sleep and immune system. *Rev Alerg Mex*. 2018; 65 (2): 160–70.
3. Labrecque N, Cermakian N. Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms*. 2015; 30 (4): 277–90.
4. Bennardo M, Alibhai F, Tsimakouridze E, et al. Day-night dependence of gene expression and inflammatory responses in the remodeling murine heart post-myocardial. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016; 311 (6): 1243–54.
5. Paganelli R, Petrarca C, Gioacchino M. Biological clocks: their relevance to immune-allergic diseases. *Clin Mol Allerg*. 2018; 16 (1). PMID: 29344005. DOI: 10.1186/s12948-018-0080-0.
6. Portaluppi F. The circadian organization of the cardiovascular system in health and disease. *Indian J Exp Biol*. 2014; 52 (5): 395–8.
7. Xing CY, Tarumi T, Meijers RL, et al. Arterial Pressure, Heart Rate, and Cerebral Hemodynamics Across the Adult Life Span. *Hypertension*. 2017; 69 (4): 712–20.
8. Cuesta M, Boudreau P, Dubeau-Laramee G, et al. Simulated Night Shift Disrupts Circadian Rhythms of Immune Functions in Humans. *J Immunol*. 2016; 196 (6): 2466–75.
9. Su D, Song A, Yan B, et al. Circadian Blood Pressure Variations in Postmenopausal Females with Hypertension. *Int Heart J*. 2018; 59 (2): 361–6.
10. Sartini C, Whincup PH, Wannamethee SG, et al. Associations of time of day with cardiovascular disease risk factors measured in older men: results from the British Regional Heart Study. *BMJ Open*. 2017; 7 (11): e018264. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-018264.
11. Shin S, Thapa SK, Fung H-L. Cellular interactions between L-arginine and asymmetric dimethylarginine: Transport and metabolism. *PLoS ONE*. 2017; 12 (5): e0178710. DOI:10.1371/journal.pone.0178710.
12. Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *J Veterin Int Med*. 2017; 31 (3): 899–04.
13. Ahnstedt H, Stenman E, Cao L, et al. Cytokines and growth factors modify the upregulation of contractile endothelin ET(A) and ET(B) receptors in rat cerebral arteries after organ culture. *Acta Physiol*. 2012; 205 (2): 266–78.
14. Радаева О. А., Симбирцев А. С. Гендерные особенности системы интерлейкина-1 у женщин с эссенциальной артериальной гипертензией. Цитокины и воспаление. 2014; 3 (13): 31–8.
15. Dey D, Shepherd A, Pachua J, Martin M. Leukemia inhibitory factor regulates trafficking of T-type Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 300 (3): 576–87.
16. Hsu CP, Zhao JF, Lin SJ, et al. Asymmetric Dimethylarginine Limits the Efficacy of Simvastatin Activating Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5 (4): e003327. DOI: 10.1161/JAHA.116.003327.
17. Hawley CA, Rojo R, Raper A. Csf1r-mApple Transgene Expression and Ligand Binding In Vivo Reveal Dynamics of CSF1R Expression within the Mononuclear Phagocyte System. *J Immunol*. 2018 Mar 15; 200 (6): 2209–23. DOI: 10.4049/jimmunol.1701488.
18. Радаева О. А., Симбирцев А. С. М-CSF, IL-34, VEGF-A как факторы риска развития инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения у больных эссенциальной артериальной гипертензией. Российский иммунологический журнал. 2015; 9 (1): 93–101.

References

1. Geiger SS, Fagundes CT, Siegel RM. Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology*. 2015; 146 (3): 349–58.
2. Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. Sleep and immune system. *Rev Alerg Mex*. 2018; 65 (2): 160–70.
3. Labrecque N, Cermakian N. Circadian Clocks in the Immune System. *J Biol Rhythms*. 2015; 30 (4): 277–90.
4. Bennardo M, Alibhai F, Tsimakouridze E, et al. Day-night dependence of gene expression and inflammatory responses in the remodeling murine heart post-myocardial. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016; 311 (6): 1243–54.
5. Paganelli R, Petrarca C, Gioacchino M. Biological clocks: their relevance to immune-allergic diseases. *Clin Mol Allerg*. 2018; 16 (1). PMID: 29344005. DOI: 10.1186/s12948-018-0080-0.
6. Portaluppi F. The circadian organization of the cardiovascular system in health and disease. *Indian J Exp Biol*. 2014; 52 (5): 395–8.
7. Xing CY, Tarumi T, Meijers RL, et al. Arterial Pressure, Heart Rate, and Cerebral Hemodynamics Across the Adult Life Span. *Hypertension*. 2017; 69 (4): 712–20.
8. Cuesta M, Boudreau P, Dubeau-Laramee G, et al. Simulated Night Shift Disrupts Circadian Rhythms of Immune Functions in Humans. *J Immunol*. 2016; 196 (6): 2466–75.
9. Su D, Song A, Yan B, et al. Circadian Blood Pressure Variations in Postmenopausal Females with Hypertension. *Int Heart J*. 2018; 59 (2): 361–6.
10. Sartini C, Whincup PH, Wannamethee SG, et al. Associations of time of day with cardiovascular disease risk factors measured in older men: results from the British Regional Heart Study. *BMJ Open*. 2017; 7 (11): e018264. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-018264.
11. Shin S, Thapa SK, Fung H-L. Cellular interactions between L-arginine and asymmetric dimethylarginine: Transport and metabolism. *PLoS ONE*. 2017; 12 (5): e0178710. DOI:10.1371/journal.pone.0178710.
12. Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *J Veterin Int Med*. 2017; 31 (3): 899–04.
13. Ahnstedt H, Stenman E, Cao L, et al. Cytokines and growth factors modify the upregulation of contractile endothelin ET(A) and ET(B) receptors in rat cerebral arteries after organ culture. *Acta Physiol*. 2012; 205 (2): 266–78.
14. Radaeva OA, Simbircev AS. Gendernye osobennosti sistemy interlejkina-1 u zhenshchin s ehssencial'noj arterial'noj gipertenziej. *Citokiny i vospalenie*. 2014; 3 (13): 31–8. Russian.
15. Dey D, Shepherd A, Pachua J, Martin M. Leukemia inhibitory factor regulates trafficking of T-type Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 300 (3): 576–87.

- Cell Physiol. 2011; 300 (3): 576–87.
16. Hsu CP, Zhao JF, Lin SJ, et al. Asymmetric Dimethylarginine Limits the Efficacy of Simvastatin Activating Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5 (4): e003327. DOI: 10.1161/JAHA.116.003327.
 17. Hawley CA, Rojo R, Raper A. Csf1r-mApple Transgene Expression and Ligand Binding In Vivo Reveal Dynamics of CSF1R Expression within the Mononuclear Phagocyte System. *J Immunol.* 2018 Mar 15; 200 (6): 2209–23. DOI: 10.4049/jimmunol.1701488.
 18. Radaeva OA, Simbircev AS. M-CSF, IL-34, VEGF-A kak faktory riska razvitiya infarkta miokarda, ostrogo narusheniya mozgovogo krovoobrashcheniya u bol'nyh ehssencial'noj arterial'noj gipertenziej. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal.* 2015; 9 (1): 93–101. Russian.

ИНЪЕКЦИОННЫЙ КОЛЛАГЕН В КОРРЕКЦИИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ

Н. Е. Мантурова¹, А. Г. Стенько², Я. А. Петинати³, Е. А. Чайковская² ✉, А. А. Болгарина⁴

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² АО «Институт пластической хирургии и косметологии», Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н. Ф. Измерова, Москва, Россия

⁴ ООО «Ниармедик Плюс», Москва, Россия

Возрастные изменения лица в виде морщин, дряблости кожи во многом связаны со структурными изменениями дермы, в том числе с фрагментацией и дезорганизацией коллагеновых волокон. Различные методы косметологической коррекции направлены на активизацию неоколлагенеза и ремоделирование дермы. С этой точки зрения логичным видится проведение внутрикожных инъекций препаратов экзогенного коллагена. Целью исследования было изучить эффективность и безопасность применения коллагенового комплекса Коллост 7% в коррекции возрастных изменений кожи лица, а также уточнить возможные механизмы развития эффекта омоложения кожи после курса внутрикожных инъекций. В исследование были включены 34 участницы, завершили его 30 участниц. Оценка комплекса показателей возрастных изменений кожи с помощью клинических шкал продемонстрировала выраженное улучшение качества кожи и разглаживание ее рельефа, особенно в области локализации тонких морщин. После завершения курса лечения достоверно повысилась эластичность кожи лица, что вкупе с изменениями, выявленными при УЗ-сканировании (повышение толщины дермы и ее акустической плотности), косвенно свидетельствует о структурной перестройке кожи с накоплением белковых волокнистых структур. Полученные результаты позволяют проводить параллели с данными экспериментальных исследований, показывающими активизацию неоколлагенеза в коже лабораторных животных после курсового введения геля Коллост 7%. Серьезных нежелательных явлений при проведении исследования не выявлено. Курсовое внутрикожное введение коллагена можно рекомендовать как процедуру эстетической коррекции, а также в качестве профилактики развития атрофических процессов, которые существенно сказываются на внешнем виде и здоровье кожи.

Ключевые слова: старение кожи, омоложение кожи, инъекции коллагена

Благодарности: авторы благодарят компанию ООО «Ниармедик Плюс» (Москва) за поддержку клинического наблюдательного исследования, а также благодарят Наталью Индилову, Галину Софинскую, Евгению Иконникову — врачей-исследователей АО «Институт пластической хирургии и косметологии»; Ольгу Бондареву, Олесю Сидорову — врачей НПЦ «Космопродтест» за помощь в проведении исследования.

Информация о вкладе авторов: Н. Е. Мантурова — планирование исследования и интерпретация данных; А. Г. Стенько, Я. А. Петинати — подбор участников, проведение исследования, интерпретация данных; Е. А. Чайковская — планирование исследования, сбор и интерпретация данных, подготовка рукописи; А. А. Болгарина — анализ литературы, планирование исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Общества эстетической медицины (протокол № 2 от 7 сентября 2017 г.). Регистрационный номер на портале www.ClinicalTrials.gov — NCT03677258.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Александровна Чайковская
ул. Ольховская, д. 27, г. Москва, 105066; ktchaikovskaya@yandex.ru

Статья получена: 27.09.2018 **Статья принята к печати:** 25.02.2019 **Опубликована онлайн:** 09.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.010

INJECTABLE COLLAGEN IN CORRECTION OF AGE-RELATED SKIN CHANGES: EXPERIMENTAL AND CLINICAL PARALLELS

Manturova NE¹, Stenko AG², Petinati YaA³, Chaikovskaya EA² ✉, Bolgarina AA⁴

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Institute of plastic surgery and cosmetology, Moscow, Russia

³ Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia

⁴ LLC Nearmedic PLUS, Moscow, Russia

To a large extent, age-related facial skin changes, wrinkles and flabbiness, are attributed to the structural alterations in dermis, including of collagen fibers fragmentation and disorganization. There are various cosmetological correction methods that aim to activate neocollagenesis and dermal remodeling. From this perspective, intradermal injections of exogenous collagen preparations seem logical. This study aimed to investigate the efficacy and safety of Collost 7% collagen complex applied to correct the age-related facial skin changes, as well as clarify the possible mechanisms of skin rejuvenation resulting from a course of intradermal injections. 35 participants entered the study, 30 of them finished it. A set of indicators describing age-related skin changes was assessed with the help of clinical scales; the assessment revealed a pronounced improvement in the quality of the patients' skin, including smoothed relief in the area of localization of fine wrinkles. The therapy resulted in a statistically significant improvement of the skin's elasticity, which, combined with the changes discovered through US scanning (greater dermis thickness and echodensity), is an indirect indication of skin restructuring associated with accumulation of fibrous protein structures. These results allow parallels with the experimental data that shows activation of neocollagenesis in the skin of laboratory animals after a course of Collost 7% gel. The research revealed no serious adverse events. A course of collagen administered intradermally can be recommended as an aesthetic correction procedure, as well as means of prevention of atrophy that has a significant effect on skin's appearance and health status.

Keywords: skin ageing, skin rejuvenation, collagen injection

Acknowledgements: the authors would like to thank "Nearmedic Plus" (Moscow) for the support of the clinical observational study, as well as Natalya Indilova, Galina Sofinskaya, Evgenia Ikonnikova, medical researchers of the Institute of Plastic Surgery and Cosmetology, and Olga Bondareva and Olesya Sidorova, doctors with Cosmoprodtest SPC, for the assistance they provided in the context of this study.

Author contribution: Manturova NE — research planning and data interpretation; Stenko AG, Petinati YaA — selection of participants, conducting research, data interpretation; Chaikovskaya EA — research planning, data collection and interpretation, manuscript preparation; Bolgarina AA — literature analysis, research planning.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Society of Aesthetic Medicine ethical committee (Protocol №2 of September 07, 2017). Registration number at www.ClinicalTrials.gov: NCT03677258.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Chaikovskaya
Olkhovskaya, 27, Moscow, 105066; ktchaikovskaya@yandex.ru

Received: 27.09.2018 **Accepted:** 25.02.2019 **Published online:** 09.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.010

Кожа как орган тела человека выполняет целый ряд функций: барьерную, терморегуляторную, иммунной защиты; продуцирует обширный спектр гормонов. В последние годы самое пристальное внимание уделяется ее социальной функции, ведь «внешний» возраст человека во многом определяется именно внешним видом лица — эстетической картиной, наличием симптомов или следов каких-либо заболеваний. Моложавость и привлекательность лица способствуют установлению и поддержанию социальных контактов, коммуникации, что тем или иным способом сказывается на успешности профессиональной и личной жизни человека, качестве его жизни [1]. Поэтому все аспекты коррекции возрастных изменений кожи лица остаются предметом клинических исследований, в том числе с точки зрения эффективности и безопасности используемых средств и методов.

При определении внешнего возраста прежде всего ориентируются на выраженность на лице морщин и складок [2, 3], напрямую связанных с биомеханическими свойствами кожи [4, 5], которые, в свою очередь, определяются состоянием внеклеточного матрикса дермы — соединительнотканного слоя кожи.

Коллаген является базовым белком любой соединительной ткани, причем половина его общего количества находится именно в поверхностных тканях, составляя около 70% белков в составе кожи [6]. Основными структурными компонентами дермы являются волокнообразующие коллагены I и III типов, сложная архитектура волокон которых обеспечивает такие показатели, как прочность, упругость, эластичность кожи, способность к репарации [1, 5, 7, 8]. С возрастом коллагеновый матрикс дермы претерпевает существенные изменения, связанные как с запрограммированными процессами хроностарения, так и с ускоренным старением на фоне заболеваний, изменения гормонального фона, действия агрессивных факторов окружающей среды — УФ-излучения, поллютантов, курения, погрешностей питания [1, 9–12]. В проведенных исследованиях показано, что с возрастом количество коллагена в дерме прогрессивно уменьшается — примерно на 20% каждое десятилетие после достижения женщинами 40 лет [7]. Конкретные данные в разных исследованиях отличаются [13–16]. Но тенденция остается неизменной и связана она с угнетением пролиферативной и синтетической функций фибробластов: по мере старения снижается их общий пул, клетки приобретают «спящий» неактивный фенотип [17]. Параллельно с количественными изменениями меняется и качество коллагеновых волокон: они подвергаются уплотнению за счет формирования дополнительных ковалентных сшивок полипептидных цепей. Подобные структуры становятся более устойчивыми к действию матриксных металлопротеиназ, катаболизирующих белки и обеспечивающих таким образом их обновление. Во внеклеточном матриксе накапливаются хаотично расположенные фрагментированные волокна коллагена, теряющие фокальные контакты с фибробластами. Клетки утрачивают структурно-функциональный контакт с матриксом и приобретают неактивный фенотип [9, 12, 17–19]. Так формируется порочный круг, закрепляющий структурные изменения кожи, которые и обуславливают формирование характерной клинической картины «возрастного лица». Одним из подтверждений этого тезиса служит тот факт, что у больных системной склеродермией, чья кожа толще и содержит большее количество коллагена, возрастные изменения лица в

виде морщин, складок и расширенных пор формируются гораздо позже [20].

Изложенное выше актуализирует необходимость дальнейшего изучения возможностей различных косметологических методик по восстановлению коллагенового каркаса дермы. Наряду с эстетическим аспектом очень важным является восстановление репаративного ресурса кожи: коллаген в форме организованной волокнистой сети участвует в регуляции миграции, пролиферации, дифференциации клеток, их взаимодействии [8, 21].

Доказано, что достоверно стимулируют неоколлагенез топические препараты ретиноидов, лазерное воздействие на кожу, а также внутрикожное введение филлеров — гелей на основе стабилизированной гиалуроновой кислоты, полимолочной кислоты, частиц гидроксиапатита кальция [22–26]. Во всех случаях задействованы разные механизмы, однако приводят они к единому результату — в областях воздействия формируется плотная волокнистая коллагеновая сеть. С этой же целью активно изучаются такие методы, как внутрикожное введение микрогранул и нитей на основе поликапролактона, активных пептидов, радиочастотное воздействие на кожу, воздействие микрофокусированным ультразвуком, механическая микроперфорация кожи и др. Этиологически обоснованным выглядит и введение непосредственно в дерму инъекционных форм коллагена. История эстетической коллагенотерапии насчитывает уже около 40 лет: в 1981 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) зарегистрировало первый инъекционный материал на базе этого вещества. Медицинские изделия на основе коллагена кожи коров являются безопасными и показывают хорошую биосовместимость [27]. Предполагаемые механизмы действия коллагеновых материалов при внутрикожном введении включают в себя как временную гидратацию дермы и оптимизацию свойств внеклеточного матрикса, так и стимулирующие эффекты коротких пептидов (матрикинов), образующихся при биодеградации экзогенного коллагена [8, 28, 29]. Накопление фрагментов белка уже само по себе — по механизму обратной биологической связи — становится стимулятором синтеза белка *de novo* [30].

В нашей стране разработан, производится и активно применяется в разных областях медицины, включая косметологию, коллагеновый материал в виде стерильного геля — Коллост 7% и 15% (ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ»; Россия). В процессе производства коллаген выделяют из шкур крупного рогатого скота и подвергают глубокой очистке от примесей с сохранением нативной волокнистой структуры и свойств белка. Материал зарегистрирован в качестве инъекционного медицинского изделия (ФСР 2008/02112 от 26 февраля 2016 г.). Среди показаний к применению в косметологии — возрастные и атрофические изменения кожи. Внутрикожные инъекции материала способствуют моментальному восстановлению дефицита объема мягких тканей; курс инъекций обеспечивает пролонгированный результат [31, 32]. Перед проведением процедур обязательно выполняется аллергопроба для выявления гиперчувствительности к животному коллагену.

Метаболизм и биохимические эффекты имплантированного в кожу геля Коллост 7% были детализированы в недавно проведенных экспериментальных исследованиях [21]. После двух внутрикожных инъекций материала лабораторным животным (крысам) в их

коже в течение всего времени наблюдения (37 дней) отмечалось повышение уровня суммарного коллагена и его растворимой фракции. По мнению исследователей, в течение нескольких следующих за инъекциями дней (2-е и 4-е сут.) повышение уровня коллагена связано с присутствием экзогенного белка, в отдаленные же сроки (21-е и 37-е сут.) наблюдаемая тенденция отражает активизацию неоколлагенеза в коже. Подтверждением данной гипотезы служит и то, что в эти же сроки отмечалось значительное усиление включения в белок кожи меченных радиоизотопом C^{14} аминокислот. На протяжении семи дней наблюдения фиксировалось повышение коллагенолитической активности кожи, что, по-видимому, было связано с процессом биодegradации чужеродного белка. Выявленные процессы позволяют говорить о том, что экзогенный коллаген с сохраненной нативной структурой, подвергаясь биодegradации, стимулирует синтез собственного белка.

Одной из целей проведенного проспективного наблюдательного исследования «Изучение эффективности и безопасности восстановительного коллагенового комплекса Коллост 7% в коррекции возрастных изменений кожи лица» было уточнение с использованием неинвазивных методов диагностики возможных механизмов развития эффекта омоложения кожи в течение и после завершения курса внутрикожных инъекций.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в период с октября 2017 г. по июнь 2018 г. на базе АО «Институт пластической хирургии и косметологии» и ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н. Ф. Измерова». Были скринированы 34 участницы для последующего проведения курса инъекций материала Коллост; согласно критериям включения/исключения в исследование было включено 30 пациенток.

Критерии включения: женский пол; возраст 35–65 лет; I–III фототипы кожи; признаки возрастных изменений кожи лица; отсутствие хронических заболеваний в стадии декомпенсации; отказ от проведения каких-либо косметологических процедур во время исследования. Критерии исключения: беременность; период лактации; инфекционный процесс; дерматозы; злокачественные новообразования на коже в области предполагаемой коррекции; системные заболевания соединительной ткани с поражением кожи и подкожной клетчатки (системная красная волчанка, гранулема кольцевидная, дискоидная красная волчанка, склеродермия, дерматомиозит и др.); обострение или декомпенсация хронических соматических заболеваний; инфекционные, онкологические заболевания; нарушения свертывания крови, в том числе ятрогенного характера на фоне текущей фармакотерапии; прием изотретиноина в течение предшествующих 6 месяцев; склонность к формированию гипертрофических и келоидных рубцов; прием антигистаминных препаратов, глюкокортикоидов, НПВС, иммунодепрессантов и других лекарственных средств, влияющих на реактивность кожи; гиперчувствительность к компонентам изучаемого медицинского изделия.

Возраст участниц составил 36–64 года (медиана 48,50 лет; 25-й и 75-й процентиля — 43,00 и 57,00 лет). Все они были представительницами европеоидной расы с массой тела 52–80 кг и индексом массы тела не более 30. На протяжении всего времени наблюдения участницы

поддерживали стабильную массу тела (колебания не более 2 кг) во избежание искажения клинической картины старения лица. У 93,33% аллергологический анамнез не отягощен; аллергические реакции на местные анестетики отсутствовали у 100% участниц. Большинство пациенток (24 человека, 80,00%) было некурящими, все придерживались смешанного режима питания. У подавляющего числа участниц кожа имела нормальную толщину и нормальную чувствительность (повышенная чувствительность отмечалась у 16,67% участниц). В итоге «усредненный портрет» участницы исследования выглядел следующим образом: женщина около 50 лет со светлой кожей; картиной фотостарения, соответствующей возрасту; с наличием признаков возрастных деформационных изменений лица, что в значительной степени связано с развитием дряблости кожи, т. е. с изменением ее биомеханических свойств.

Программа исследования подразумевала после детального обследования описание общей картины состояния кожи лица по восьми показателям (оцененным при помощи 5-балльной шкалы по Гейниц — Alexiades-Armenakas [33, 34]) с подсчетом интегрального показателя состояния кожи лица, а также оценку степени выраженности морщин в семи областях по 5-балльной валидированной фотошкале MAS (Merz Aesthetic Scale) [35].

С помощью инструментальных методов диагностики проводили:

- измерение эластичности кожи — методом кутометрии (лоб, параорбитальная область, щека); на аппаратах Multi Skin Test Center MC-900 и Cutometer Dual MPA-580 (Courage + Khazaka electronic GmbH; Германия);

- оценку толщины эпидермиса и дермы, акустической плотности дермы — УЗ-сканированием кожи в аналогичных областях лица контрлатерально на аппаратах DUB SkinScanner (Taberna pro medicum; Германия) и DermaScan C-System (Cortex Technology; Дания) с датчиками 20–22 МГц.

Эффективность курса косметологической коррекции оценивали как врачи-исследователи, так и сами участницы с использованием универсальной эстетической шкалы GAIS (Global Aesthetic Improvement Scale) [35].

Документирование результатов проводили с помощью фотосистемы LifeViz (QuantifiCare; Франция), позволяющей получать и анализировать трехмерные изображения лица.

Для оценки безопасности внутрикожных инъекций материала Коллост после каждой процедуры описывали нежелательные явления (немедленные и отсроченные), гипотетически связанные как с индивидуальной реакцией на коллагеновый материал, так и с инъекцией как таковой.

Дизайн исследования подразумевал пять визитов с включением в исследование и скринингом по показателям включения/невключения, а также результатам аллергопробы, проведенной согласно Инструкции к материалу Коллост гель. Аллергоанамнез участниц и результат аллергопроб оценивал врач-иммунолог.

Процедуры внутрикожных инъекций Коллоста 7% выполняли три раза с интервалом 3 недели. С целью обеспечения комфортности на кожу лица предварительно наносили анестезирующий крем Акриол Про с экспозицией 1 ч. Для инъекций использовали 2 мл материала в преднаполненных шприцах, которые предварительно нагревали в термостате при 40 °С. Очистление и дезинфекцию кожи проводили с помощью 0,05%-го раствора хлоргексидина биглюконата, в завершении процедуры на кожу лица наносили гель Траумель. Полное обследование назначали до начала инъекций, перед

каждой процедурой (оценивая результат предыдущих) и через 3 недели после завершения курса инъекций.

Статистический анализ выполняли с помощью программы Statistica 6.0 (Statsoft; США), использовали непараметрические методы анализа. Данные представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей. Сравнение двух групп зависимых признаков проводили с использованием критерия Вилкоксона, статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ профиля безопасности

В ходе исследования у всех участниц на протяжении нескольких часов или дней после процедуры наблюдались прогнозируемые местные реакции в виде покраснения кожи, незначительного отека, пальпируемых бугорков в местах инъекций. Кровоизлияния после достаточно травматичной процедуры носили в большинстве случаев характер петехий (точечных кровоизлияний), что, вероятно, связано с наличием у коллагена гемостатических свойств.

Анализ эффективности

Проведенный статистический анализ показал существенное улучшение общей клинико-эстетической картины лица,

оцененной с помощью интегрального показателя, который статистически значимо снизился ($p < 0,05$; сравнение показателей после третьей процедуры с данными скрининга) (табл. 1): медиана снижения показателя составила 24,26%. Поясним, что значение интегрального показателя тем выше, чем больший вклад в картину «возрастного лица» вносят конкретные признаки (морщины, складки, грубый рисунок кожи, телеангиэктазии и др.). Снижение показателя означает клиническое омоложение лица.

Отмечена достоверная положительная динамика в отношении глубины морщин ($p < 0,05$; сравнение показателей после третьей процедуры с данными скрининга) (табл. 1): медиана снижения суммарного показателя степени выраженности морщин по шкале MAS составила 28,57%. Детальный анализ глубины морщин в отдельных зонах показал, что наиболее выраженная динамика выравнивания рельефа кожи отмечалась в области лба, параорбитальных областях (морщины «гусиные лапки»), нижнего века и верхней губы (рис. 1).

Отмечено существенное улучшение показателя эластичности кожи лица у 77% участниц (табл. 2): медиана увеличения показателя в области лба составила 30,90%, в параорбитальной — 19,10%, в области щек — 15,75%. Все изменения достоверны ($p < 0,05$; сравнение показателей после третьей процедуры с данными скрининга).

По данным УЗ-сканирования кожи, после завершения курса процедур у всех участниц исследования наблюдалось

Таблица 1. Показатели качества кожи на этапе скрининга и после завершения курса инъекций ($p < 0,05$)

Показатель	Значение на этапе скрининга	Значение после завершения курса
Интегральный показатель состояния кожи лица, баллы	14 (10; 17)*	11,5 (8; 13)
Степень выраженности морщин (суммарный показатель по семи зонам), баллы	12 (11; 16)	8 (7; 11)

Примечание: * — здесь и в табл. 2 указаны значения медианы, в скобках — значения 25-го и 75-го перцентилей.

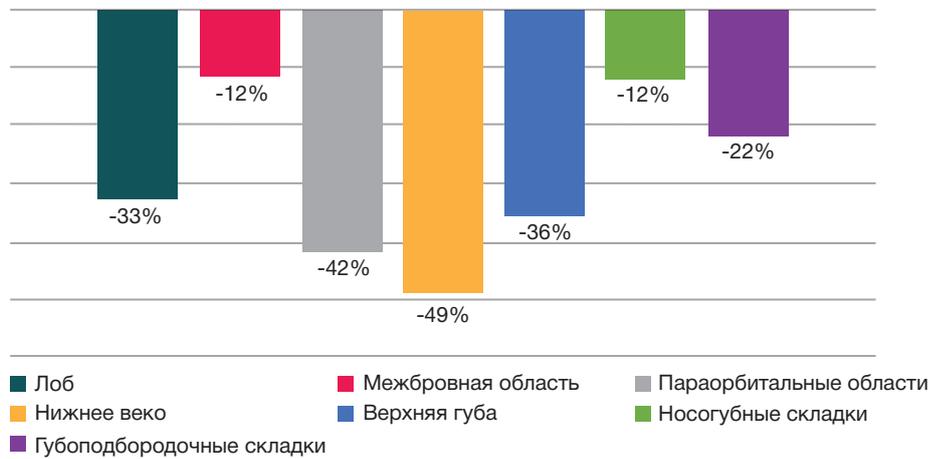


Рис. 1. Динамика изменения степени выраженности морщин по зонам лица (после курса лечения по сравнению с этапом скрининга)

Таблица 2. Структурно-функциональные показатели кожи на этапе скрининга и после завершения курса инъекций ($p < 0,05$)

Показатели	Значение на этапе скрининга			Значение после завершения курса		
	Зоны			Зоны		
	Лоб	Параорбитальная область	Щека	Лоб	Параорбитальная область	Щека
Толщина эпидермиса (УЗИ), мм	0,128 (0,105; 0,158)	0,110 (0,105; 0,133)	0,132 (0,108; 0,158)	0,177 (0,151; 0,192)	0,163 (0,150; 0,184)	0,186 (0,162; 0,199)
Толщина дермы (УЗИ), мм	1,330 (1,195; 1,531)	1,206 (1,086; 1,376)	1,592 (1,256; 1,869)	1,628 (1,411; 1,790)	1,496 (1,344; 1,672)	1,855 (1,685; 2,094)
Акустическая плотность дермы (УЗИ), у. е.	5,102 (3,741; 13,190)	5,738 (3,778; 13,470)	5,794 (2,877; 11,906)	7,236 (5,672; 13,540)	9,071 (6,026; 17,010)	6,611 (4,739; 13,230)
Эластичность кожи (кутометрия), у. е.	52,63 (46,00; 61,45)	55,08 (49,85; 62,65)	55,06 (49,30; 62,00)	66,75 (56,03; 93,39)	65,65 (58,00; 74,16)	63,25 (55,50; 61,50)

статистически значимое увеличение толщины эпидермиса (на 30,7–39,3%), дермы (на 18,7–22,3%), повышение акустической плотности дермы (на 28,7–44,5%) во всех или нескольких областях лица (табл. 2, рис. 2 и 3) ($p < 0,05$; сравнение показателей после третьей процедуры с данными скрининга).

Эффективность проведенного курса инъекций материала Коллост 7% положительно оценили 100% участниц. По шкале GAIS половина исследуемых оценила результат как удовлетворительный с пожеланием его улучшить, при этом вторая половина была полностью удовлетворена результатом (рис. 4). С точки зрения врача, оптимальный результат достигнут у трети пациенток, у подавляющего большинства наблюдалось значительное улучшение, но не полная коррекция. У двух участниц отмечалось незначительное улучшение — как по мнению самих пациенток, так и врача-исследователя.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное клиническое исследование подтвердило эффективность применения материала Коллост 7% в коррекции инволюционных изменений кожи. В исследовании для оценки эффективности использовали исключительно неинвазивные методы диагностики, которые позволили провести максимально полное обследование всех участниц.

Оценку общего состояния кожи, в том числе симптомов фотоповреждения/фотостарения, проводили по модифицированной схеме, основанной на критериях, предложенных Гейниц с соавт. и Alexiades-Armenakas [33, 34]. Объединенный показатель включал оценку в баллах микро- и макрорельефа кожи, ее цвета, текстуры, пигментации, сосудистого рисунка, эластоза и кератоза. После проведенного курса суммарный показатель достоверно уменьшился, при детализации стоит отметить выраженные изменения на уровне рельефа кожи (разглаживание морщин и складок) и ее цвета. У двух пациенток с тонкой кожей в области век исчезли синяки под глазами, что было воспринято крайне позитивно как самими пациентками, так и окружающими. В целом же у большинства участниц кожа приобрела розовый оттенок и более здоровый вид.

Наиболее выраженная положительная динамика глубины морщин отмечалась в области лба, параорбитальной и в области верхней губы. В этих зонах формируются поверхностные морщины, генез которых связан с атрофией/

альтерацией дермального слоя кожи [36]. Восстановление коллагенового каркаса дермы позволяет обеспечить эффективную коррекцию рельефа этих областей. В то же время для максимально эффективной коррекции глубоких складок (например, носогубных) требуется вмешательство уже на уровне подкожной жировой клетчатки.

Биомеханические свойства кожи большинство исследователей связывает с качеством волокнистого коллагенового каркаса дермы. Логично предположить, что достоверное повышение эластичности кожи участниц исследования может быть обусловлено неоколлагенезом — увеличением количества зрелых волокон с неповрежденной структурой и достаточной гидрофильностью. Еще одним косвенным подтверждением реструктуризации кожи служат увеличение толщины дермы и повышение ее акустической плотности, выявленные при УЗ-сканировании. Согласно проведенным ранее исследованиям [37, 38], уменьшение толщины дермы и ее акустической плотности описывается как возрастная, ассоциированная с заболеваниями или стероидиндуцированная атрофия на фоне снижения содержания структурных фибриллярных белков. Соответственно, увеличение толщины и особенно повышение акустической плотности дермы отражают процесс накопления волокнистых структур, реструктуризацию кожи [39, 40]. По данным проведенного нами исследования, в максимальной степени эти изменения были выражены спустя 3 недели после заключительной процедуры, что позволяет провести параллель с обсужденными выше

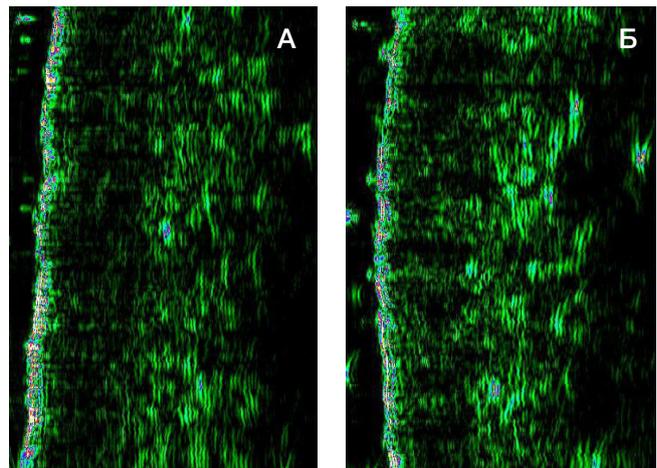


Рис. 3. УЗ-сканогаммы кожи в области лба: на этапе скрининга (А), после завершения курса инъекций (Б)



Рис. 2. Динамика структурных показателей кожи по данным УЗ-сканирования (медиана изменения после курса лечения по сравнению с этапом скрининга)

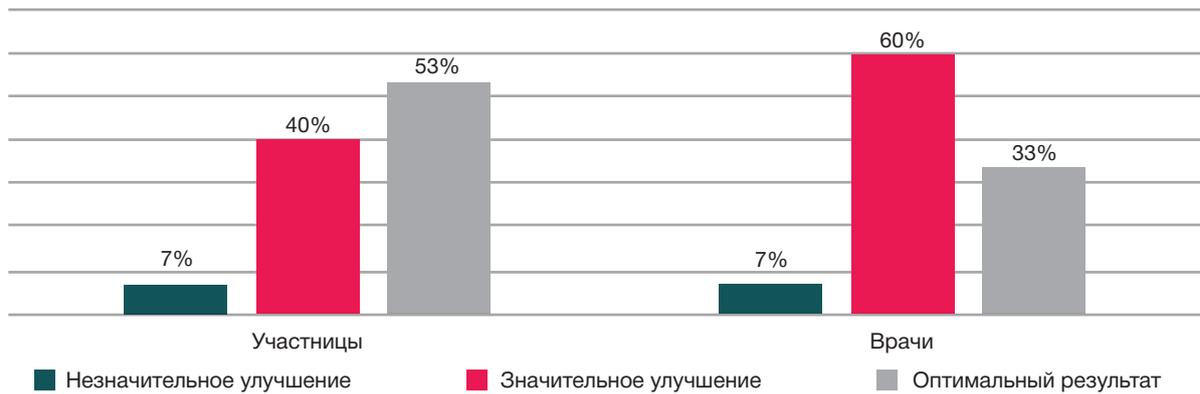


Рис. 4. Оценка эффективности курса инъекций по шкале GAIS участниками и врачами-исследователями

экспериментальными исследованиями, показавшими максимальное повышение уровня суммарного коллагена в коже через 3–4 недели после завершения инъекций Коллоста 7% в кожу экспериментальных животных.

Следует отметить, что положительная динамика изменения биомеханических свойств кожи, ее структурные изменения, наблюдаемые после курса инъекций Коллоста 7%, обеспечивают не только улучшение внешнего вида, но и закладывают основы профилактики развития возрастных изменений, связанных с атрофией, а также способствуют оздоровлению кожи.

ВЫВОДЫ

По данным проведенного исследования, курс внутрикожных инъекций материала Коллост 7% позволяет улучшить

эстетическую картину кожи лица с достоверной нормализацией ее цвета, уменьшением степени выраженности морщин. Положительная клиническая динамика отмечается на фоне улучшения биомеханических свойств кожи (повышение эластичности) и структурных изменений, выявленных при УЗИ, косвенно свидетельствующих о процессе ремоделирования коллагенового каркаса дермы. Таким образом, внутрикожные инъекции материала Коллост 7% можно признать эффективным и безопасным методом эстетической коррекции. Результаты проведенного исследования, возможно, станут основой для формирования этиологически и патогенетически обоснованных протоколов комбинированной коррекции возрастных изменений кожи, включающих в себя также введение гиалуроновой и полимолочной кислот, воздействие высокоэнергетическими методами.

Литература

- Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5 (1): a015370.
- Gunn DA, Rexbye H, Griffiths CE, Murray PG, Fereday A, Catt SD, et al. Why Some Women Look Young for Their Age. *Tregenza T*, ed. *PLoS ONE*. 2009; 4 (12): e8021.
- Nkengne A, Bertin C, Stamatas GN, Giron A, Rossi A, Issachar N, et al. Influence of facial skin attributes on the perceived age of Caucasian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22 (8): 982–91.
- Hussain SH, Limthongkul B, Humphreys TR. The biomechanical properties of the skin. *Dermatol Surg*. 2013; 39 (2): 193–203.
- Aziz J, Shezali H, Radzi Z, Yahya NA, Abu Kassim NH, Czernuszka J, et al. Molecular Mechanisms of Stress Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2016; 29 (4): 190–203.
- Czekalla C, Schönborn KH, Döge N, Jung S, Darvin ME, Lademann J, et al. Impact of Body Site, Age, and Gender on the Collagen/Elastin Index by Noninvasive in vivo Vertical Two-Photon Microscopy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2017; 30 (5): 260–7.
- Baroni Edo R, Biondo-Simões Mde L, Auersvald A, Auersvald LA, Montemor Netto MR, Ortolan MC, et al. Influence of aging on the quality of the skin of white women: the role of collagen. *Acta Cir Bras*. 2012; 27 (10): 736–40.
- Капулер О., Сельская Б., Галеева А., Камиллов Ф. Метаболизм коллагеновых волокон на фоне возрастных изменений. *Врач*. 2015; (8): 64–9.
- Quan T, Fisher GJ. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015; 61 (5): 427–34.
- Calleja-Agius J, Brincat M, Borg M. Skin connective tissue and ageing. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2013; 27 (5): 727–40.
- Danby FW. Nutrition and aging skin: sugar and glycation. *Clin Dermatol*. 2010; 28 (4): 409–11.
- Ahmed T, Nash A, Clark KE, Ghibaud M, de Leeuw NH, Potter A, et al. Combining nano-physical and computational investigations to understand the nature of "aging" in dermal collagen. *Int J Nanomedicine*. 2017; (12): 3303–14.
- Moragas A, Garcia-Bonafé M, Sans M, Torán N, Huguet P, Martin-Plata C. Image analysis of dermal collagen changes during skin aging. *Analyt Quant Cytol Histol*. 1998; (20): 493–9.
- El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. Intrinsic aging VS photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol*. 2002; (11): 398–405.
- Yaar M, Eller MS, Gilchrist BA. Fifty years of skin aging. *J Invest Dermatol*. 2002; (7): 51–8.
- Cheng W, Yan-hua R, Fang-gang N, Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *African J Biotechnol*. 2011; 10 (13): 2524–9.
- Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol*. 2008; 144 (5): 666–72.
- Cole MA, Quan T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J Cell Commun Signal*. 2018; 12 (1): 35–43.
- Varani J, Spearman D, Perone P, Fligel SE, Datta SC, Wang ZQ, et al. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol*. 2001; 158 (3): 931–42.
- Sawamura S, Jinnin M, Kajihara I, Makino K, Aoi J, Ichihara A, et al. Do scleroderma patients look young? Evaluation by using facial imaging system. *Drug Discov Ther*. 2017; 11 (6): 342–5.
- Камиллов Ф. Х., Сельская Б. Н., Данилова О. В., Капулер О. М. Метаболизм коллагена в коже экспериментальных животных

- при интрадермальной инъекции немодифицированного бычьего коллагена типа I. Вестник Удмуртского университета. 2017; 27 (3): 356–61.
22. Kruglikov I, Neocollagenesis in Non-Invasive Aesthetic Treatments. *J Cosmet Dermatol Sci Appl*. 2013; 3 (1A): 1–5.
 23. Shao Y, He T, Fisher GJ, Voorhees JJ, Quan T. Molecular basis of retinol anti-ageing properties in naturally aged human skin in vivo. *Int J Cosmet Sci*. 2017; 39 (1): 56–65.
 24. Wang F, Garza LA, Kang S, Varani J, Orringer JS, Fisher GJ, et al. In vivo stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. *Arch Dermatol*. 2007; 143 (2): 155–63.
 25. Yutskovskaya Y, Kogan E, Leshunov E. A randomized, split-face, histomorphologic study comparing a volumetric calcium hydroxylapatite and a hyaluronic acid-based dermal filler. *J Drugs Dermatol*. 2014; 13 (9): 1047–52.
 26. Stein P, Vitavska O, Kind P, Hoppe W, Wieczorek H, Schürer NY. The biological basis for poly-L-lactic acid-induced augmentation. *J Dermatol Sci*. 2015; 78 (1): 26–33.
 27. Rao KP. Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems. *J Biomater Sci Polymer Ed*. 1995; 7 (7): 623–45.
 28. Katayama K, Amendariz-Borunda J, Raghow R, Kang AH, Seyer JM. A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production. *J Biol Chem*. 1993; 268 (14): 9941–4.
 29. Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC. An introduction to matrilines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 49 (3): 199–202.
 30. Абянц Р. К., Истранов Л. П., Истранова Е. В., Руденко Т. Г. Пластические материалы направленного действия на основе коллагена. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2011; (4): 184.
 31. Кубанова А. А., Смольяникова В. А., Служаева Н. Г. Старение кожи и возможности коррекции препаратом коллагена. Вестник дерматологии и венерологии. 2007; (5): 70–3.
 32. Капулер О. М., Курамшина Е. Р. Прикладные аспекты коллагенотерапии в эстетической медицине. Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. 2013; (5): 40–3.
 33. Гейниц А. В., Киани А., Окушко С. С. Новые возможности применения глубокой и поверхностной фракционной абляции в anti-age терапии. Пластическая хирургия и косметология. 2013; (4): 625–32.
 34. Alexiades-Armenakas M, Newman J, Willey A, Kilmer S, Goldberg D, Garden J, et al. Prospective multicenter clinical trial of a minimally invasive temperature-controlled bipolar fractional radiofrequency system for rhytid and laxity treatment. *Dermatol Surg*. 2013; 39 (2): 263–73.
 35. Carruthers A, Carruthers J. A validated facial grading scale: the future of facial ageing measurement tools? *J Cosmet Laser Ther*. 2010; 12 (5): 235–41.
 36. Tsukahara K, Tamatsu Y, Sugawara Y, Shimada K. The relationship between wrinkle depth and dermal thickness in the forehead and lateral canthal region. *Arch Dermatol*. 2011; 147 (7): 822–8.
 37. Waller JM, Maibach HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res Technol*. 2005; (11): 221–35.
 38. Jasaitiene D, Valiukeviciene S, Linkeviciute G, et al. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011; (25): 375–82.
 39. Kozarova A, Kozar M, Minarikova E, Pappova T. Identification of the age related skin changes using high-frequency ultrasound. *Acta Medica Martiniana*. 2017; 17 (1): 15–20.
 40. Lacarrubba F, Tedeschi A, Nardone B, Micali G. Mesotherapy for skin rejuvenation: assessment of the subepidermal low-echogenic band by ultrasound evaluation with cross-sectional B-mode scanning. *Dermatol Ther*. 2008; 21 (Suppl 3): 1–5.

References

1. Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5 (1): a015370.
2. Gunn DA, Rexbye H, Griffiths CE, Murray PG, Fereday A, Catt SD, et al. Why Some Women Look Young for Their Age. *Tregenza T*, ed. *PLoS ONE*. 2009; 4 (12): e8021.
3. Nkengne A, Bertin C, Stamatias GN, Giron A, Rossi A, Issachar N, et al. Influence of facial skin attributes on the perceived age of Caucasian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22 (8): 982–91.
4. Hussain SH, Limthongkul B, Humphreys TR. The biomechanical properties of the skin. *Dermatol Surg*. 2013; 39 (2): 193–203.
5. Aziz J, Shezali H, Radzi Z, Yahya NA, Abu Kassim NH, Czernuszka J, et al. Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2016; 29 (4): 190–203.
6. Czekalla C, Schönborn KH, Döge N, Jung S, Darvin ME, Lademann J, et al. Impact of Body Site, Age, and Gender on the Collagen/Elastin Index by Noninvasive in vivo Vertical Two-Photon Microscopy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2017; 30 (5): 260–7.
7. Baroni Edo R, Biondo-Simões Mde L, Auersvald A, Auersvald LA, Montemor Netto MR, Ortolan MC, et al. Influence of aging on the quality of the skin of white women: the role of collagen. *Acta Cir Bras*. 2012; 27 (10): 736–40.
8. Kapuler O, Selskaja B, Galeeva A, Kamilov F. Metabolizm kollagenovyh volokon na fone vozrastnyh izmenenij. *Vrach*. 2015; (8): 64–9.
9. Quan T, Fisher GJ. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015; 61 (5): 427–34.
10. Calleja-Agius J, Brincat M, Borg M. Skin connective tissue and ageing. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2013; 27 (5): 727–40.
11. Danby FW. Nutrition and aging skin: sugar and glycation. *Clin Dermatol*. 2010; 28 (4): 409–11.
12. Ahmed T, Nash A, Clark KE, Ghibaud M, de Leeuw NH, Potter A, et al. Combining nano-physical and computational investigations to understand the nature of "aging" in dermal collagen. *Int J Nanomedicine*. 2017; (12): 3303–14.
13. Moragas A, Garcia-Bonafé M, Sans M, Torán N, Huguet P, Martin-Plata C. Image analysis of dermal collagen changes during skin aging. *Analyt Quant Cytol Histol*. 1998; (20): 493–9.
14. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparo F, et al. Intrinsic aging VS photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol*. 2002; (11): 398–405.
15. Yaar M, Eller MS, Gilchrist BA. Fifty years of skin aging. *J Invest Dermatol*. 2002; (7): 51–8.
16. Cheng W, Yan-hua R, Fang-gang N, Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *African J Biotechnol*. 2011; 10 (13): 2524–9.
17. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol*. 2008; 144 (5): 666–72.
18. Cole MA, Quan T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J Cell Commun Signal*. 2018; 12 (1): 35–43.
19. Varani J, Spearman D, Perone P, Figiel SE, Datta SC, Wang ZQ, et al. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol*. 2001; 158 (3): 931–42.
20. Sawamura S, Jinnin M, Kajihara I, Makino K, Aoi J, Ichihara A, et al. Do scleroderma patients look young? Evaluation by using facial imaging system. *Drug Discov Ther*. 2017; 11 (6): 342–5.
21. Kamilov FH, Selskaja BN, Danilova OV, Kapuler OM. Metabolizm kollagena v kozhe jeksperimental'nyh zhivotnyh pri intradermal'noj in'ekcii nemodificirovannogo bych'ego kollagena tipa I. Вестник Удмуртского университета. 2017; 27 (3): 356–61.

22. Kruglikov I. Neocollagenesis in Non-Invasive Aesthetic Treatments. *J Cosmet Dermatol Sci Appl.* 2013; 3 (1A): 1–5.
23. Shao Y, He T, Fisher GJ, Voorhees JJ, Quan T. Molecular basis of retinol anti-ageing properties in naturally aged human skin in vivo. *Int J Cosmet Sci.* 2017; 39 (1): 56–65.
24. Wang F, Garza LA, Kang S, Varani J, Orringer JS, Fisher GJ, et al. In vivo stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. *Arch Dermatol.* 2007; 143 (2): 155–63.
25. Yutskovskaya Y, Kogan E, Leshunov E. A randomized, split-face, histomorphologic study comparing a volumetric calcium hydroxylapatite and a hyaluronic acid-based dermal filler. *J Drugs Dermatol.* 2014; 13 (9): 1047–52.
26. Stein P, Vitavska O, Kind P, Hoppe W, Wiczorek H, Schürer NY. The biological basis for poly-L-lactic acid-induced augmentation. *J Dermatol Sci.* 2015; 78 (1): 26–33.
27. Rao KP. Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems. *J Biomater Sci Polymer Ed.* 1995; 7 (7): 623–45.
28. Katayama K, Armendariz-Borunda J, Raghov R, Kang AH, Seyer JM. A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production. *J Biol Chem.* 1993; 268 (14): 9941–4.
29. Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004; 49 (3): 199–202.
30. Abojanc RK, Istranov LP, Istranova EV, Rudenko TG. Plasticheskie materialy napravlenogo dejstvija na osnove kollagena. *Jelektronnyj sbornik nauchnyh trudov "Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke".* 2011; (4): 184.
31. Kubanova AA, Smoljannikova VA, Sluzhaeva NG. Starenie kozhi i vozmozhnosti korekcii preparatom kollagena. *Vestnik dermatologii i venerologii.* 2007; (5): 70–3.
32. Kapuler OM, Kuramshina ER. Prikladnye aspekty kollagenoterapii v jesteticheskoj medicine. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja dermatokosmetologija.* 2013; (5): 40–3.
33. Gejnic AV, Kiani A, Okushko SS. Novye vozmozhnosti primenenija glubokoj i poverhnostnoj frakcionnoj abljacii v anti-age terapii. *Plasticheskaja hirurgija i kosmetologija.* 2013; (4): 625–32.
34. Alexiades-Armenakas M, Newman J, Willey A, Kilmer S, Goldberg D, Garden J, et al. Prospective multicenter clinical trial of a minimally invasive temperature-controlled bipolar fractional radiofrequency system for rhytid and laxity treatment. *Dermatol Surg.* 2013; 39 (2): 263–73.
35. Carruthers A, Carruthers J. A validated facial grading scale: the future of facial ageing measurement tools? *J Cosmet Laser Ther.* 2010; 12 (5): 235–41.
36. Tsukahara K, Tamatsu Y, Sugawara Y, Shimada K. The relationship between wrinkle depth and dermal thickness in the forehead and lateral canthal region. *Arch Dermatol.* 2011; 147 (7): 822–8.
37. Waller JM, Maibach HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res Technol.* 2005; (11): 221–35.
38. Jasaitiene D, Valiukeviciene S, Linkeviciute G, et al. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011; (25): 375–82.
39. Kozarova A, Kozar M, Minarikova E, Pappova T. Identification of the age related skin changes using high-frequency ultrasound. *Acta Medica Martiniana.* 2017; 17 (1): 15–20.
40. Lacarrubba F, Tedeschi A, Nardone B, Micali G. Mesotherapy for skin rejuvenation: assessment of the subepidermal low-echogenic band by ultrasound evaluation with cross-sectional B-mode scanning. *Dermatol Ther.* 2008; 21 (Suppl 3): 1–5.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНА GP ДЛЯ СОЗДАНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА

И. В. Должикова[✉], А. И. Тухватулин, А. С. Громова, Д. М. Гроусова, Н. М. Тухватулина, Е. А. Токарская, Д. Ю. Логунов, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ) — одно из самых высоколетальных вирусных заболеваний, поражающих человека и приматов. Возбудителем БВВЭ является вирус Эбола. В настоящее время известно шесть видов этого вируса, три из них патогенны для человека — это виды Заир (ZEBOV), Судан (SUDV) и Бундибугио (BDBV), вызывающие острые вирусные высоконтагиозные лихорадки у людей и приматов с летальностью до 90%. В большинстве случаев БВВЭ вызвана видом ZEBOV. Разработка вакцин против БВВЭ началась сразу после идентификации возбудителя в 1976 г. На сегодняшний день в мире зарегистрировано четыре вакцинных препарата для профилактики БВВЭ. Все они основаны на протективном антигене — гликопротеине (GP) вируса Эбола вида ZEBOV. В силу того что виды SUDV и BDBV также могут быть причиной вспышек и эпидемий БВВЭ, очевидна необходимость разработки вакцин, способных обеспечить защиту от всех известных патогенных для человека видов вируса Эбола. В статье систематизированы данные относительно структуры, иммуногенных и протективных свойств GP вируса Эбола, проведен анализ иммунодоминантных эпитопов гликопротеина вирусов ZEBOV, SUDV и BDBV, необходимых для формирования протективного иммунитета, а также предложен рациональный, на наш взгляд, подход создания возможных вариантов вакцин против БВВЭ, вызванной разными видами вируса Эбола, состоящий в использовании векторных конструкций, экспрессирующих как минимум два варианта гликопротеина — GP вируса Эбола вида ZEBOV и вида SUDV.

Ключевые слова: болезнь, вызванная вирусом Эбола; БВВЭ; вакцины; кросс-реактивный иммунитет; кросс-протективный иммунитет

Информация о вкладе авторов: И. В. Должикова — анализ литературы, планирование исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи; А. И. Тухватулин — анализ литературы, планирование исследования, сбор, анализ, интерпретация данных; А. С. Громова, Д. М. Гроусова, Н. М. Тухватулина, Е. А. Токарская — сбор и анализ данных; Д. Ю. Логунов — анализ литературы, планирование исследования, анализ и интерпретация данных; Б. С. Народицкий — интерпретация данных; А. Л. Гинцбург — интерпретация данных.

✉ **Для корреспонденции:** Инна Вадимовна Должикова
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; i.dolzhikova@gmail.com

Статья получена: 06.12.2018 **Статья принята к печати:** 20.02.2019 **Опубликована онлайн:** 03.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.005

GLYCOPROTEIN GP AS A BASIS FOR THE UNIVERSAL VACCINE AGAINST EBOLA VIRUS DISEASE

Dolzhikova IV[✉], Tukhvatulin AI, Gromova AS, Grousova DM, Tukhvatulina NM, Tokarskaya EA, Logunov DY, Naroditskiy BS, Gintsburg AL

N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Ebola virus disease (EVD) is one of the deadliest viral infections affecting humans and nonhuman primates. Of 6 known representatives of the *Ebolavirus* genus responsible for the disease, 3 can infect humans, causing acute highly contagious fever characterized by up to 90% fatality. These include Bundibugyo ebolavirus (BDBV), Zaire ebolavirus (ZEBOV) and Sudan ebolavirus (SUDV). The majority of the reported EVD cases are caused by ZEBOV. Vaccine development against the virus started in 1976, immediately after the causative agent of the infection was identified. So far, 4 vaccines have been approved. All of them are based on the protective epitope of the ZEBOV glycoprotein GP. Because SUDV and BDBV can also cause outbreaks and epidemics, it is vital to design a vaccine capable of conferring protection against all known ebolaviruses posing a threat to the human population. This article presents systematized data on the structure, immunogenicity and protective properties of ebolavirus glycoprotein GP, looks closely at the immunodominant epitopes of ZEBOV, SUDV and BDBV glycoprotein GP required to elicit a protective immune response, and offers a rational perspective on the development of a universal vaccine against EVD that relies on the use of vectors expressing two variants of GP represented by ZEBOV and SUDV.

Keywords: Ebola virus disease, EVD, vaccines, cross-reactive immunity, cross-protective immunity

Author contribution: Dolzhikova IV, Tukhvatulin AI and Logunov DY conceived and planned the study, analyzed the literature, collected, analyzed and interpreted the data; Gromova AS, Grousova DM, Tukhvatulina NM, and Tokarskaya EA helped to collect and analyze the data; Naroditskiy BS and Gintsburg AL contributed to data interpretation; Dolzhikova IV wrote this manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Inna V. Dolzhikova
Gamalei 18, Moscow, 123098; i.dolzhikova@gmail.com

Received: 06.12.2018 **Accepted:** 20.02.2019 **Published online:** 03.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.005

Первая вспышка болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), была зафиксирована в 1976 г. в Ямбуку (Демократическая Республика Конго, в то время — Заир) и в Нзаре (Судан). В том же году от больного, проживавшего в долине реки Эбола, был впервые выделен возбудитель БВВЭ — вирус Эбола (*Ebolaviruses*), относящийся к семейству Филовирусов (*Filoviridae*) [1]. В настоящее время известно шесть видов вируса Эбола: *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV), *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), *Reston ebolavirus* (RESTV), *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Tai forest ebolavirus* (TAFV), *Bombali ebolavirus* (BOMV), из которых наиболее патогенны для человека ZEBOV, SUDV и BDBV [2–3]. С момента первой вспышки в 1976 г. было зарегистрировано более 20 случаев БВВЭ, вызванных видами ZEBOV, SUDV и BDBV; самая

крупная вспышка 2014–2016 гг. в Западной Африке переросла в эпидемию и унесла жизни более 12 000 человек. Наибольшее количество зафиксированных случаев БВВЭ было связано с заражением ZEBOV (табл. 1) [4].

ZEBOV, SUDV и BDBV патогенны для человека, вызывают острые вирусные высоконтагиозные лихорадки у людей и приматов. RESTV не вызывает заболевания у человека, однако у людей, работающих с обезьянами, зараженными RESTV, в сыворотке крови детектируют специфичные антитела к RESTV [4]. Причины, лежащие в основе столь разной патогенности между RESTV и патогенных видов вируса Эбола, пока остаются неизученными.

Масштаб эпидемии 2014–2016 гг. заставил мировое сообщество значительно интенсифицировать разработки

вакцинных препаратов против БВВЭ. В настоящее время насчитывается более 10 вакцинных препаратов, четыре из них зарегистрированы для клинического применения [5]. Разработанные кандидатные и зарегистрированные вакцинные препараты обеспечивают 100%-ю защиту приматов от БВВЭ, вызываемой ZEBOV, их эффективность в отношении других видов вируса Эбола варьирует. Так как виды SUDV и BDBV тоже могут служить причиной вспышек и эпидемий БВВЭ, и вследствие выявления новых штаммов ZEBOV, необходима разработка вакцины/вакцин, способных обеспечить защиту от всех известных патогенных для человека видов вируса Эбола.

Структура вируса Эбола

Вирионы вируса Эбола представлены нитями различной формы, состоят из оболочки, нуклеокапсида, полимеразного комплекса и матрикса [6] (рис. 1). В центре вириона находится нуклеокапсид, состоящий из оцРНК, связанной с белками NP, VP35, VP30 и L. Снаружи вирус Эбола покрыт липидной оболочкой, на поверхности которой расположены шиповидные структуры, образованные гликопротеином GP. В пространстве между оболочкой и нуклеокапсидом находятся белки VP40 и VP24, формирующие белковый матрикс [6].

Вирусный геном представлен оцРНК отрицательной полярности (рис. 2) [6], содержит семь генов, кодирующих девять белков: нуклеопротеин (NP), кофактор вирусной полимеразы (VP35), основной белок матрикса (VP40), три гликопротеина (секретируемый sGP, полноразмерный GP и малый секретируемый ssGP), минорный нуклеопротеин (VP30), мембраноассоциированный белок (VP24), вирусную полимеразу (L) [6–7].

Гликопротеин GP вируса Эбола — единственный белок, расположенный на поверхности вириона. Он играет ключевую роль на начальных этапах инфекционного процесса: связывании вириона с клеткой и последующей интернализации [7].

Особенности синтеза и процессинга гликопротеина вируса Эбола

Ген гликопротеина вируса Эбола кодирует три белковых продукта pre-sGP, pre-ssGP (оба предшественники секретируемых неструктурных гликопротеинов) и pre-GP (предшественник структурного трансмембранного гликопротеина). Нуклеотидная последовательность гена гликопротеина содержит семь последовательных урацилов в позициях 880–886, где образуется шпилька; шпилька является сложным участком для вирусной L-полимеразы [7–8], что приводит к редактированию РНК. В результате образуется три транскрипта:

- транскрипт, содержащий семь урацилов (~71%), кодирует sGP (364 а.о.);

- транскрипт, содержащий восемь урацилов (~25%), кодирует GP (676 а.о.);

- транскрипт, содержащий девять урацилов (~4%), кодирует ssGP (298 а.о.).

Первые 295 а.о. у гликопротеинов GP, sGP и ssGP одинаковые, однако все белки имеют разную С-концевую часть, что сказывается на их функциях. После синтеза pre-sGP подвергается процессингу клеточными протеазами, что приводит к образованию секретируемого sGP. Последний снижает эффективность гуморального ответа, оттитровывая на себя антитела, и Δ-пептида, который формирует поры в клеточной мембране (рис. 2) [8–9].

Pre-GP также подвергается процессингу клеточными протеазами, что приводит к образованию двух субъединиц: GP1 и GP2. Субъединицы формируют тримеризующиеся гетеродимеры, образующие шипы на поверхности вируса. GP1 содержит рецепторсвязывающий домен, гликановый кэп и муцинподобный домен для взаимодействия с рецепторами на поверхности клетки; GP2 — трансмембранный домен, заякоривающий комплекс в мембране (рис. 2). При этом субъединица GP2 имеет сайт связывания протеазы TACE, и в случае протеолитического расщепления происходит отщепление гликопротеина от мембраны и образование четвертого варианта GP — «сброшенного» гликопротеина shed GP [8].

Зрелый поверхностный гликопротеин GP выполняет одну из самых важных функций в жизненном цикле вируса — взаимодействует с клеточными рецепторами, благодаря чему происходит интернализация: вирус захватывается клеткой путем эндоцитоза/макропиноцитоза, затем в эндосомах под действием фурина и катепсинов клетки происходит отщепление муцинподобного домена и гликанового кэпа гликопротеина, в результате укороченный GP связывается с транспортером холестерина Ниманна-Пика (NCP1), что инициирует слияние эндосомной и вирусной мембран и происходит интернализация нуклеокапсида вируса в цитоплазму [10–11].

Структурные и иммунологические особенности различных форм гликопротеина вируса Эбола

Все секреторные формы белка (sGP, ssGP и «сброшенный» GP) выполняют функции защиты вируса от вирусонейтрализующих реакций протективного иммунитета хозяина. Зараженные вирусом Эбола клетки, секретируя данные гликопротеины, направляют формирование гуморального ответа против ограниченного числа эпитопов [12–13]. При этом превосходящие по количеству sGP, ssGP и «сброшенный» GP оттитровывают на себя основную массу IgG, снижая вирусонейтрализующее действие гуморального иммунитета хозяина [14]. Такие гликопротеины (особенно sGP, ssGP) способствуют формированию антител, которые обладают слабым

Таблица 1. Летальность при заражении вирусами Эбола разных видов. Данные обобщены по всем вспышкам БВВЭ по количеству заболевших и погибших [4]

Вид	Количество заболевших	Количество погибших	Летальность, %
ZEBOV	30154	12503	40–90
SUDV	792	426	36–65
BDBV	206	66	25–51
RESTV	0/13*	0	0
TAFV	1	0	0
BOMV	0	0	0

Примечание: * — без клинических признаков заболевания, в сыворотке детектированы специфические антитела к RESTV.

нейтрализующим потенциалом либо не обладают им вовсе, что приводит к развитию феномена антителозависимого усиления инфекции: такие антитела распознают вирус и взаимодействуют с Fc-рецепторами на фагоците, заставляя их интернализировать комплексы вирус-антитела с помощью FcγR-опосредованного фагоцитоза [15]. При этом необходимо отметить тот факт, что, несмотря на наличие в составе секретируемых форм GP сайтов связывания протективных антител, вакцинация редуцированными формами не позволяет сформировать протективный иммунитет у 100% животных. Для формирования полноценного протективного ответа, который позволял бы защищать всех иммунизированных животных от БВВЭ, необходимо наличие полноразмерного GP [16–18], по всей видимости, из-за того, что в структуре полноразмерного белка присутствуют дополнительные сайты нейтрализации и Т-клеточные эпитопы. На это указывают исследования, в которых было показано, что среди антител, выделенных от реконвалесцентов, протективным потенциалом, помимо антител, узнающих GP1 (гликановый кэп), обладают антитела, которые специфично связываются с надмембранной частью GP2 [18–21], а также

исследование CD8⁺-клеток памяти у реконвалесцентов, позволившее выявить эпитопы гликопротеина, важные для формирования протективного Т-клеточного ответа — области рецепторсвязывающего домена и гликанового кэпа гликопротеина [22].

Поскольку формирование полноценного протективного ответа происходит в ответ именно на иммунизацию полноразмерным гликопротеином или экспрессирующими ген *gp* конструкциями, большинство разрабатываемых и уже зарегистрированных вакцин создается на основе именно гликопротеина GP [23–24].

Анализ перекрестного иммунитета у вакцинированных и перенесших БВВЭ

Идеальная вакцина против БВВЭ должна обеспечивать протективный ответ на инфицирование всеми патогенными для человека вирусами рода Эбола, в связи с этим крайне важно понимать возможность формирования иммунного ответа не только против гомологичных, но и против филогенетически удаленных видов. Анализ последних работ показывает, что иммунизация приматов вакциной на

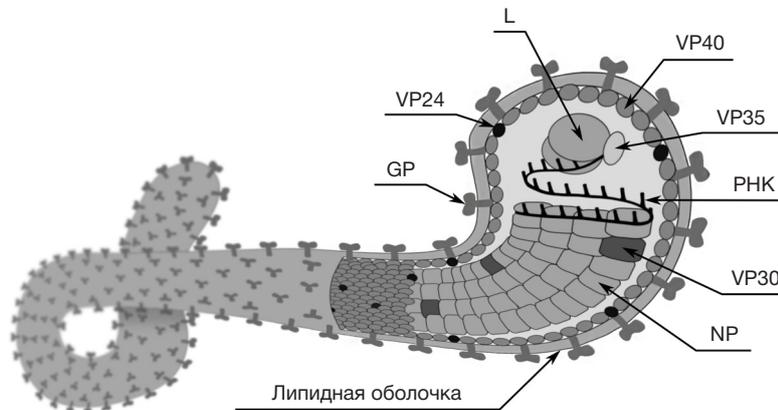


Рис. 1. Структура вируса Эбола. GP — гликопротеин; L — каталитическая субъединица вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы; NP — нуклеопротеин; VP24 — минорный белок матрикса; VP30 — минорный нуклеопротеин; VP35 — белок нуклеокапсида; VP40 — матриксный белок

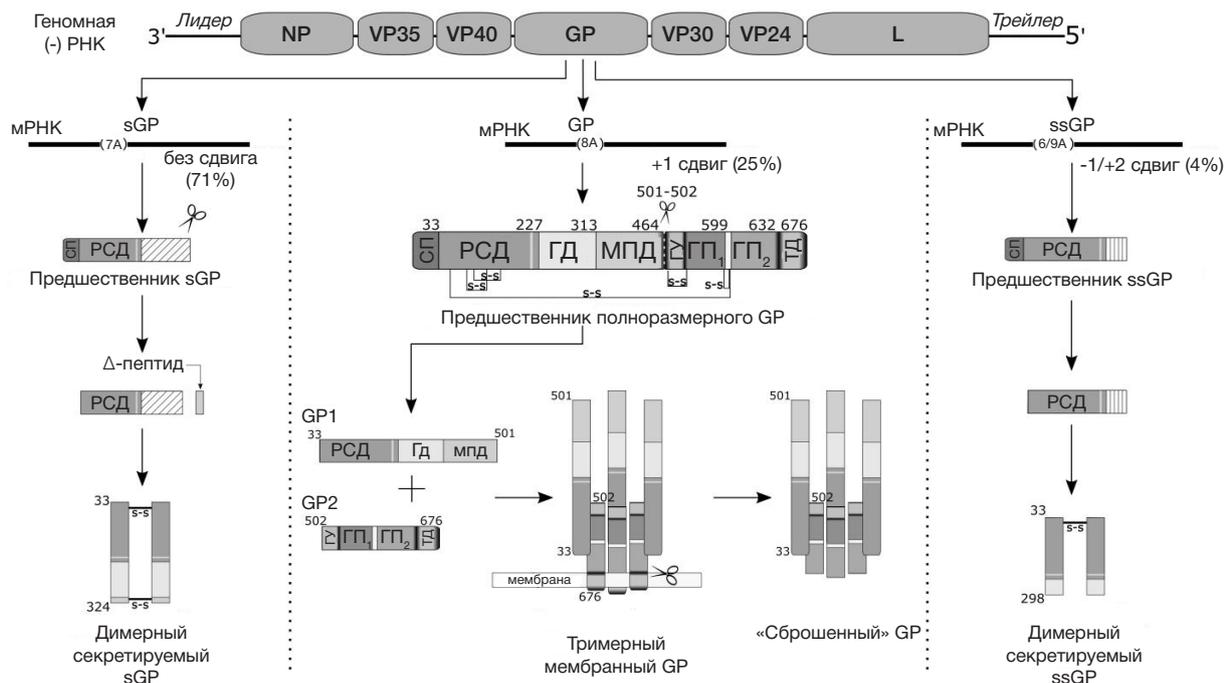


Рис. 2. Формы гликопротеина вируса Эбола в клетках эукариот. ГД — гликановый домен (гликановый кэп); ГП — гептадный повтор; ГУ — гидрофобный участок; МПД — муциноподобный домен (муциновый домен); РСД — рецепторсвязывающий домен; СП — сигнальный пептид; ТД — трансмембранный домен

основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (rVSV-ZEBOV), экспрессирующего гликопротеин GP вируса Эбола изолята 1995 г., приводит к формированию иммунитета против всех ZEBOV (изоляты 1976, 1995 и 2014 гг.) [25]. Об этом же свидетельствуют исследования сывороток реконвалесцентов, перенесших БВБЭ (ZEBOV). В этих исследованиях было показано наличие в сыворотках IgG, способных перекрестно реагировать с гликопротеинами гетерологичных видов (SUDV и BDBV) [26–27]. Исследование кросс-протективности на приматах показывает, что использование гликопротеина ZEBOV (в составе rVSV) позволяет защитить 100% животных от летальной инфекции, вызванной BDBV, при этом иммунизация животных rVSV, несущим гликопротеин SUDV, не обеспечивает защиты от ZEBOV и BDBV [28–30].

В результате исследований возникновения перекрестного иммунитета у животных выявлена одна закономерность: для видов ZEBOV и BDBV показана кросс-протективность поствакцинального иммунитета, в то время как между этими видами и SUDV она отсутствует.

Для объяснения разницы в способности гликопротеинов различных видов вируса Эбола формировать кросс-протективный иммунный ответ нами был проведен сравнительный анализ структуры белка GP. Для этого не только выравнивали аминокислотные последовательности

между вирусами видов ZEBOV, SUDV и BDBV, но и картировали иммунодоминантные эпитопы (ИЭ), т. е. обладающие наибольшей антигенностью, гликопротеинов у 1548 изолятов вируса Эбола (10 последовательностей BDBV, 23 последовательностей SUDV и 1515 последовательностей ZEBOV), взятых из открытой базы данных [31].

Детальный анализ иммунодоминантных регионов, проведенный в программе T Cell Epitope Prediction Tools в режиме деиммунизации [32], позволил идентифицировать 22 ИЭ (табл. 2 и 3). Наибольшее разнообразие было обнаружено в муциновом домене субъединицы GP1, наименьшее — в GP2. При попарном сравнении ИЭ гликопротеинов вирусов Эбола было выявлено, что гомология ИЭ гликопротеинов вирусов ZEBOV и BDBV составила 75,8%, в то время как гомология ИЭ гликопротеинов вирусов ZEBOV и SUDV, а также SUDV и BDBV составила 63,2% и 61,5% соответственно (табл. 2). Следует заметить, что гликопротеины разных изолятов вируса Эбола вида ZEBOV, выделенных в 1976, 1995, 2014 и 2018 гг., практически не отличаются друг от друга и имеют минорные различия в области гликанового кэпа и муцинового домена (табл. 3). Средняя гомология ИЭ составила 98,7–100%.

Полученные данные свидетельствуют о большей филогенетической близости видов ZEBOV и BDBV, по

Таблица 2. Гомология аминокислотных последовательностей ИЭ гликопротеинов вируса Эбола видов ZEBOV, SUDV и BDBV. Поиск ИЭ осуществляли в программе T Cell Epitope Prediction Tools [32], сравнение аминокислотных последовательностей было выполнено в программе Geneious® 10.2.3 (Biomatters; Auckland, New Zealand). На тепловой карте представлена гомология в %: темно-серый цвет — 100%, белый цвет — 0%

		Позиции аминокислот	Гомология аминокислотных последовательностей GP вируса Эбола видов ZEBOV, SUDV и BDBV, %			
			ZEBOV vs SUDV vs BDBV	ZEBOV vs SUDV	ZEBOV vs BDBV	SUDV vs BDBV
GP1	PCD	93–127*	82,9	91,4	88,6	82,9
		151–165	86,7	93,3	93,3	93,3
		156–170	86,7	93,3	93,3	86,7
		161–175	73,3	86,7	86,7	73,3
		171–185	66,7	80,0	86,7	66,7
		190–204**	40,0	53,3	73,3	53,3
	Гликановый кэп	211–225	26,7	26,7	40,0	53,3
		214–247*	26,5	29,4	58,8	35,3
		231–245	40,0	46,7	73,3	40,0
		236–250	40,0	46,7	86,7	40,0
		241–255	53,3	53,3	86,7	53,3
		246–260	66,7	66,7	80,0	66,7
		251–265	53,3	53,3	73,3	53,3
	Муцин	271–285**	26,7	40,0	66,7	26,7
		389–405**	0,0	17,6	5,9	11,8
401–417**		5,9	5,9	17,6	17,6	
GP2	476–490**	33,3	53,3	53,3	40,0	
	505–519**	66,7	73,3	73,3	66,7	
	566–580	100	100	100	100	
	571–585	86,7	86,7	100	86,7	
	576–590	86,7	86,7	100	86,7	
	581–595	80,0	80,0	100	80,0	
	599–631**	90,9	90,9	97,0	93,9	
632–651**	70,0	70,0	90,0	75,0		
Средняя гомология (%)			58,0	63,2	75,8	61,5

Примечание: * — ИЭ, необходимые для формирования протективного Т-клеточного ответа [22]; ** — ИЭ, необходимые для формирования протективного В-клеточного ответа [20, 34–38].

Таблица 3. Гомология аминокислотных последовательностей ИЭ гликопротеинов вируса Эбола видов ZEBOV (изоляты 1976, 1995, 2014 и 2018 гг.). Поиск ИЭ осуществляли в программе T Cell Epitope Prediction Tools [32], сравнение аминокислотных последовательностей было выполнено в программе Geneious® 10.2.3 (Biomatters; Auckland, New Zealand). На тепловой карте представлена гомология в %: темно-серый цвет — 100%, белый цвет — 0%

		Позиции аминокислот	Гомология аминокислотных последовательностей GP вируса Эбола вида ZEBOV изолятов 1976, 1995, 2014 и 2018 гг, %							
			1976–1995–2014–2018	1976–1995	1976–2014	1976–2018	1995–2014	1995–2018	2014–2018	
GP1	PCD	93–127*	100	100	100	100	100	100	100	
		151–165	100	100	100	100	100	100	100	
		156–170	100	100	100	100	100	100	100	
		161–175	100	100	100	100	100	100	100	
		171–185	100	100	100	100	100	100	100	
		190–204**	100	100	100	100	100	100	100	
		Гликановый кэп	211–225	100	100	100	100	100	100	100
			214–247*	100	100	100	100	100	100	100
			231–245	100	100	100	100	100	100	100
	236–250		100	100	100	100	100	100	100	
	241–255		100	100	100	100	100	100	100	
	246–260	100	100	100	100	100	100	100		
	Муцины	251–265	93,3	100	93,3	100	93,3	100	93,3	
		271–285**	100	100	100	100	100	100	100	
		389–405**	94,1	100	94,1	100	94,1	100	94,1	
		401–417**	88,2	100	88,2	100	88,2	100	88,2	
		476–490**	93,3	100	100	93,3	100	93,3	93,3	
GP2	505–519**	100	100	100	100	100	100	100		
	566–580	100	100	100	100	100	100	100		
	571–585	100	100	100	100	100	100	100		
	576–590	100	100	100	100	100	100	100		
	581–595	100	100	100	100	100	100	100		
	599–631**	100	100	100	100	100	100	100		
	632–651**	100	100	100	100	100	100	100		
Средняя гомология (%)			98,7	100	99,0	99,7	99,0	99,7	98,7	

Примечание: * — ИЭ, необходимые для формирования протективного Т-клеточного ответа [22]; ** — ИЭ, необходимые для формирования протективного В-клеточного ответа [20, 34–38].

сравнению с SUDV, однако не объясняют разницу в индукции защитного иммунитета у животных, иммунизированных соответствующими вариантами гликопротеина GP. Для объяснения этих различий мы проанализировали места связывания антител, которые способны обеспечивать перекрестную защиту от летальной инфекции, вызванной разными видами вируса Эбола. Такие антитела специфичны не только к GP1, но и к областям, примыкающим к трансмембранному домену GP2 [19–21, 33]. В недавних работах было обнаружено, что антитела, обладающие протективной эффективностью, связываются не с линейными, а с конформационными эпитопами в гликопротеине [34–36]. Проведенное нами исследование последовательностей GP показало, что позиции ключевых аминокислот, необходимых для связывания с протективными антителами, весьма консервативны. Анализ мест связывания антител, обладающих протективным потенциалом, показал, что позиции ключевых аминокислот (замена которых полностью блокирует способность антител связываться с GP) в эпитопах ZEBOV полностью идентичны позициям аминокислот в эпитопах гликопротеина вируса Эбола вида BDBV, при этом гомология с этими аминокислотами

в эпитопах гликопротеина вируса Эбола вида SUDV колеблется в пределах 30–60% (рис. 3). По нашему мнению, мутации в таких позициях аминокислот приводят к подавлению протективного действия антител. Гомология мест связывания протективных антител с гликопротеинами вируса Эбола различных видов, по-видимому, и обуславливает наличие кросс-протективного иммунного ответа между видами ZEBOV-BDBV и отсутствие кросс-протективного иммунного ответа между этими видами и SUDV.

Открытие универсальных антител, способных обеспечить протекцию от патогенных для человека видов вируса Эбола [19–21, 33–34, 36], служит предпосылкой к разработке не только эффективных средств терапии БВБЭ, вызванной различными видами вируса Эбола, но и рациональных подходов к созданию вакцины против этих патогенов. Исследования кросс-протективности, а также антител, полученных от реконвалесцентов после эпидемии БВБЭ, дают нам основания считать, что есть возможность создания вакцины на основе гликопротеина ZEBOV, которая могла бы обеспечивать протективный иммунный ответ против ZEBOV и BDBV. При этом для того, чтобы обеспечить протективный иммунитет

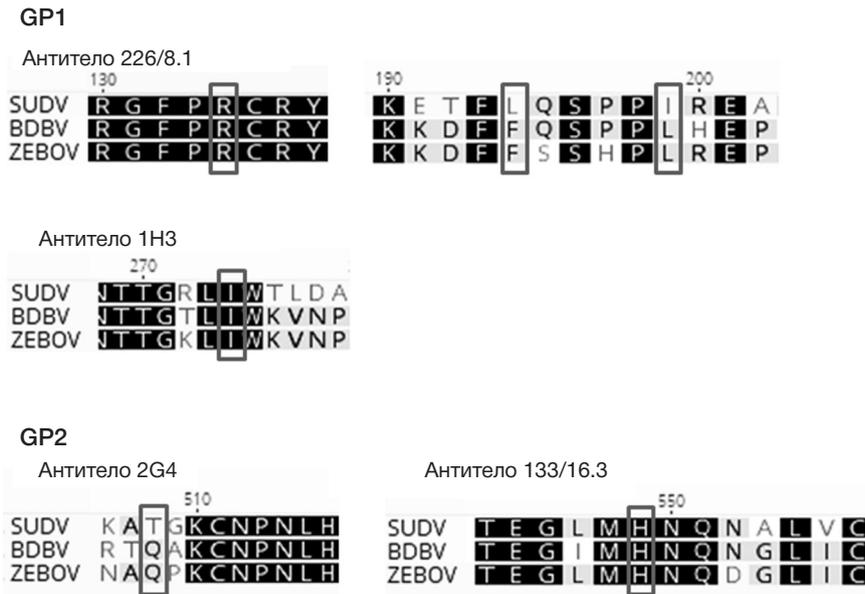


Рис. 3. Выровненные консенсусные аминокислотные последовательности гликопротеинов вируса Эбола видов ZEBOV, SUDV и BDBV. Ключевые позиции аминокислот, необходимые для связывания с антителами, отмечены прямоугольниками [34, 36]

к SUDV необходимо в состав вакцины включить гликопротеин SUDV.

ВЫВОДЫ

Сравнительный анализ структуры GP у 1548 изолятов, относящихся к ZEBOV, SUDV и BDBV, показал высокую вариабельность аминокислотных последовательностей GP вируса Эбола различных видов (~60–65% гомологии). Дальнейший анализ гомологии эпитопов GP ZEBOV, SUDV и BDBV, учитывающий третичную структуру белка, показал наличие общих аминокислот, связывание которых антителами позволяет нейтрализовать вирусы ZEBOV и BDBV, имеющие низкий процент гомологии в линейных аминокислотных последовательностях. Полученные

результаты полностью согласуются с данными о способности существующих кандидатных и зарегистрированных вакцин индуцировать перекрестный протективный иммунитет в отношении вирусов ZEBOV и BDBV. При этом защиту всех иммунизированных животных от летальной инфекции, вызванной SUDV, обеспечивают только вакцины, сконструированные на основе антигена GP SUDV, но не GP других видов.

По нашему мнению, перечисленные факты свидетельствуют о том, что для создания эффективной вакцины, обеспечивающей защиту от известных патогенных видов вируса Эбола, необходимо использовать векторные конструкции, экспрессирующие как минимум два варианта гликопротеина — антигена GP вируса Эбола видов ZEBOV и SUDV.

Литература

- Beer B, Kurth R, Bukreyev A. Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. *Naturwissenschaften*. 1999; 86 (1): 8–17.
- Kuhn JH, Becker S, Ebihara H, Geisbert TW, Johnson KM, Kawaoka Y, et al. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: Classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Archives of Virology*. 2010; 155 (12): 2083–103.
- Goldstein T, Anthony SJ, Gbakima A, Bird BH, Bangura J, Tremeau-Bravard A, et al. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nature Microbiology*. 2018; 3 (10): 1084–89.
- CDC. Cases and Outbreaks of EVD by Year [updated 2018 Nov 9; cited 2018 Nov 12]. Available from: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/chronology.html>.
- Lévy Y, Lane C, Piot P, Beavogui AH, Kieh M, Leigh B, et al. Prevention of Ebola virus disease through vaccination: where we are in 2018. *Lancet*. 2018; 392 (10149): 787–90.
- Bharat TA, Noda T, Riches JD, Kraehling V, Kolesnikova L, Becker S, et al. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109 (11): 4275–80.
- Volchkov VE, Becker S, Volchkova VA, Ternovoj VA, Kotov AN, Netesov SV, et al. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology*. 1995; 214 (2): 421–30.
- Cook JD, Lee JE. The Secret Life of Viral Entry Glycoproteins: Moonlighting in Immune Evasion. *PLoS Pathog*. 2013; 9 (5): e1003258.
- He J, Melnik LI, Komin A, Wiedman G, Fuselier T, Morris CF, et al. Ebola Virus Delta Peptide is a Viroporin. *J Virol*. 2017; 91 (16): e00438–17.
- Lee JE, Saphire EO. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future virology*. 2009; 4 (6): 621–35.
- Wang H, Shi Y, Song J, Qi J, Lu G, Yan J, et al. Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1. *Cell*. 2016; 164 (1–2): 258–68.
- Sanchez A, Yang ZY, Xu L, Nabel GJ, Crews T, Peters CJ. Biochemical Analysis of the Secreted and Virion Glycoproteins of Ebola Virus. *J Virol*. 1998; 72 (8): 6442–47.
- Dolnik O, Volchkova V, Garten W, Carbonnelle C, Becker S, Kahnt J, et al. Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J*. 2004; 23 (10): 2175–84.
- Ito H, Watanabe S, Takada A, Kawaoka Y. Ebola Virus Glycoprotein: Proteolytic Processing, Acylation, Cell Tropism, and Detection of Neutralizing Antibodies. *J Virol*. 2001; 75 (3): 1576–80.
- Kuzmina NA, Younan P, Gilchuk P, Santos RI, Flyak AI, Ilinykh PA, et al. Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection by Human Antibodies Isolated from Survivors. *Cell Rep*. 2018; 24 (7): 1802–15.

16. Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Shedlock DJ, Xu L, Lamoreaux L, et al. Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med.* 2006; 3 (6): e177.
17. Li W, Ye L, Carrion R, Nunneley J, Staples H, Ticer A, et al. Characterization of Immune Responses Induced by Ebola Virus Glycoprotein (GP) and Truncated GP Isoform DNA Vaccines and Protection Against Lethal Ebola Virus Challenge in Mice. *J Infect Dis.* 2015; 212 (Suppl 2): S398–403.
18. Saphire EO, Schendel SL, Fusco ML, Gangavarapu K, Gunn BM, Wec AZ, et al. Systematic Analysis of Monoclonal Antibodies against Ebola Virus GP Defines Features that Contribute to Protection. *Cell.* 2018; 174 (4): 938–52.
19. Wec AZ, Herbert AS, Murin CD, Nyakatura EK, Abelson DM, Fels JM, et al. Antibodies from a Human Survivor Define Sites of Vulnerability for Broad Protection against Ebolaviruses. *Cell.* 2017; 169 (5): 878–90.
20. Gilchuk P, Kuzmina N, Ilinykh PA, Huang K, Gunn BM, Bryan A, et al. Multifunctional Pan-ebolavirus Antibody Recognizes a Site of Broad Vulnerability on the Ebolavirus Glycoprotein. *Immunity.* 2018; 49 (2): 363–74.
21. Flyak AI, Kuzmina N, Murin CD, Bryan C, Davidson E, Gilchuk P, et al. Broadly neutralizing antibodies from human survivors target a conserved site in the Ebola virus glycoprotein HR2-MPER region. *Nat Microbiol.* 2018; 3 (6): 670–77.
22. Sakabe S, Sullivan BM, Hartnett JN, Robles-Sikisaka R, Gangavarapu K, Cubitt B, et al. Analysis of CD8+ T cell response during the 2013–2016 Ebola epidemic in West Africa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115 (32): E7578–E7586.
23. Lévy Y, Lane C, Piot P, Beavogui AH, Kieh M, Leigh B, et al. Prevention of Ebola virus disease through vaccination: where we are in 2018. *Lancet.* 2018; 392 (10149): 787–90.
24. Dolzhnikova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-Vectored Ebola Vaccines. *Acta Naturae.* 2017; 9 (3): 4–11.
25. Marzi A, Robertson SJ, Haddock E, Feldmann F, Hanley PW, Scott DP, et al. EBOLA VACCINE. VSV-EBOV rapidly protects macaques against infection with the 2014/15 Ebola virus outbreak strain. *Science.* 2015; 349 (6249): 739–42.
26. Macneil A, Reed Z, Rollin PE. Serologic cross-reactivity of human IgM and IgG antibodies to five species of Ebola virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5 (6): 1175.
27. Natesan M, Jensen SM, Keasey SL, Kamata T, Kuehne AI, Stonier SW, et al. Human Survivors of Disease Outbreaks Caused by Ebola or Marburg Virus Exhibit Cross-Reactive and Long-Lived Antibody Responses. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; (23): 717–24.
28. Hensley LE, Mulangu S, Asiedu C, Johnson J, Honko AN, Stanley D, et al. Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (5): e1000904.
29. Mire CE, Geisbert JB, Marzi A, Agans KN, Feldmann H, Geisbert TW. Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against Bundibugyo ebolavirus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; (7): e2600.
30. Marzi A, Ebihara H, Callison J, Groseth A, Williams KJ, Geisbert TW, et al. Vesicular stomatitis virus-based Ebola vaccines with improved cross-protective efficacy. *J Infect Dis.* 2011; 204 (Suppl 3): S1066–74.
31. Hatcher EL, Zhdanov SA, Bao Y, Blinkova O, Nawrocki EP, Ostapchuck Y, et al. Virus Variation Resource — improved response to emergent viral outbreaks. *Nucleic Acids Res.* 2016; 45 (D1): 482–90.
32. T Cell Epitope Prediction Tools [cited 2018 Nov 12]. Available from: <http://tools.iedb.org/main/tcell/>.
33. Ilinykh PA, Santos RI, Gunn BM, Kuzmina NA, Shen X, Huang K, et al. Asymmetric antiviral effects of ebolavirus antibodies targeting glycoprotein stem and glycan cap. *PLoS Pathog.* 2018; 14 (8): e1007204.
34. Audet J, Wong G, Wang H, Lu G, Gao GF, Kobinger G, et al. Molecular characterization of the monoclonal antibodies composing ZMAb: a protective cocktail against Ebola virus. *Sci Rep.* 2014; (4): 6881.
35. Murin CD, Fusco ML, Bornholdt ZA, Qiu X, Olinger GG, Zeitlin L, et al. Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111 (48): 17182–7.
36. Ponomarenko J, Vaughan K, Sette A, Maurer-Stroh S. Conservancy of mAb Epitopes in Ebolavirus Glycoproteins of Previous and 2014 Outbreaks. *PLoS Curr.* 2014; (6).
37. Zhao X, Howell KA, He S, Brannan JM, Wec AZ, Davidson E, et al. Immunization-Elicited Broadly Protective Antibody Reveals Ebolavirus Fusion Loop as a Site of Vulnerability. *Cell.* 2017; 169 (5): 891–904.
38. Misasi J, Gilman MS, Kanekiyo M, Gui M, Cagigi A, Mulangu S, et al. Structural and molecular basis for Ebola virus neutralization by protective human antibodies. *Science.* 2016; 351 (6279): 1343–6.

References

1. Beer B, Kurth R, Bukreyev A. Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. *Naturwissenschaften.* 1999; 86 (1): 8–17.
2. Kuhn JH, Becker S, Ebihara H, Geisbert TW, Johnson KM, Kawaoka Y, et al. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: Classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Archives of Virology.* 2010; 155 (12): 2083–103.
3. Goldstein T, Anthony SJ, Gbakima A, Bird BH, Bangura J, Tremeau-Bravard A, et al. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nature Microbiology.* 2018; 3 (10): 1084–89.
4. CDC. Cases and Outbreaks of EVD by Year [updated 2018 Nov 9; cited 2018 Nov 12]. Available from: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/chronology.html>.
5. Lévy Y, Lane C, Piot P, Beavogui AH, Kieh M, Leigh B, et al. Prevention of Ebola virus disease through vaccination: where we are in 2018. *Lancet.* 2018; 392 (10149): 787–90.
6. Bharat TA, Noda T, Riches JD, Kraehling V, Kolesnikova L, Becker S, et al. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (11): 4275–80.
7. Volchkov VE, Becker S, Volchkova VA, Ternovoj VA, Kotov AN, Netesov SV, et al. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology.* 1995; 214 (2): 421–30.
8. Cook JD, Lee JE. The Secret Life of Viral Entry Glycoproteins: Moonlighting in Immune Evasion. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (5): e1003258.
9. He J, Melnik LI, Komin A, Wiedman G, Fuselier T, Morris CF, et al. Ebola Virus Delta Peptide is a Viroporin. *J Virol.* 2017; 91 (16): e00438–17.
10. Lee JE, Saphire EO. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future virology.* 2009; 4 (6): 621–35.
11. Wang H, Shi Y, Song J, Qi J, Lu G, Yan J, et al. Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1. *Cell.* 2016; 164 (1–2): 258–68.
12. Sanchez A, Yang ZY, Xu L, Nabel GJ, Crews T, Peters CJ. Biochemical Analysis of the Secreted and Virion Glycoproteins of Ebola Virus. *J Virol.* 1998; 72 (8): 6442–47.
13. Dolnik O, Volchkova V, Garten W, Carbonnelle C, Becker S, Kahnt J, et al. Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J.* 2004; 23 (10): 2175–84.
14. Ito H, Watanabe S, Takada A, Kawaoka Y. Ebola Virus Glycoprotein: Proteolytic Processing, Acylation, Cell Tropism, and Detection of Neutralizing Antibodies. *J Virol.* 2001; 75 (3): 1576–80.
15. Kuzmina NA, Younan P, Gilchuk P, Santos RI, Flyak AI, Ilinykh PA, et al. Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection by Human Antibodies Isolated from Survivors. *Cell Rep.* 2018; 24 (7): 1802–15.
16. Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Shedlock DJ, Xu L, Lamoreaux L, et al. Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors

- encoding modified GPs. *PLoS Med.* 2006; 3 (6): e177.
17. Li W, Ye L, Carrion R, Nunneley J, Staples H, Ticer A, et al. Characterization of Immune Responses Induced by Ebola Virus Glycoprotein (GP) and Truncated GP Isoform DNA Vaccines and Protection Against Lethal Ebola Virus Challenge in Mice. *J Infect Dis.* 2015; 212 (Suppl 2): S398–403.
 18. Saphire EO, Schendel SL, Fusco ML, Gangavarapu K, Gunn BM, Wec AZ, et al. Systematic Analysis of Monoclonal Antibodies against Ebola Virus GP Defines Features that Contribute to Protection. *Cell.* 2018; 174 (4): 938–52.
 19. Wec AZ, Herbert AS, Murin CD, Nyakatura EK, Abelson DM, Fels JM, et al. Antibodies from a Human Survivor Define Sites of Vulnerability for Broad Protection against Ebolaviruses. *Cell.* 2017; 169 (5): 878–90.
 20. Gilchuk P, Kuzmina N, Ilinykh PA, Huang K, Gunn BM, Bryan A, et al. Multifunctional Pan-ebolavirus Antibody Recognizes a Site of Broad Vulnerability on the Ebolavirus Glycoprotein. *Immunity.* 2018; 49 (2): 363–74.
 21. Flyak AI, Kuzmina N, Murin CD, Bryan C, Davidson E, Gilchuk P, et al. Broadly neutralizing antibodies from human survivors target a conserved site in the Ebola virus glycoprotein HR2-MPER region. *Nat Microbiol.* 2018; 3 (6): 670–77.
 22. Sakabe S, Sullivan BM, Hartnett JN, Robles-Sikisaka R, Gangavarapu K, Cubitt B, et al. Analysis of CD8+ T cell response during the 2013–2016 Ebola epidemic in West Africa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115 (32): E7578–E7586.
 23. Lévy Y, Lane C, Piot P, Beavogui AH, Kieh M, Leigh B, et al. Prevention of Ebola virus disease through vaccination: where we are in 2018. *Lancet.* 2018; 392 (10149): 787–90.
 24. Dolzhikova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-Vectored Ebola Vaccines. *Acta Naturae.* 2017; 9 (3): 4–11.
 25. Marzi A, Robertson SJ, Haddock E, Feldmann F, Hanley PW, Scott DP, et al. EBOLA VACCINE. VSV-EBOV rapidly protects macaques against infection with the 2014/15 Ebola virus outbreak strain. *Science.* 2015; 349 (6249): 739–42.
 26. Macneil A, Reed Z, Rollin PE. Serologic cross-reactivity of human IgM and IgG antibodies to five species of Ebola virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5 (6): 1175.
 27. Natesan M, Jensen SM, Keasey SL, Kamata T, Kuehne AI, Stonier SW, et al. Human Survivors of Disease Outbreaks Caused by Ebola or Marburg Virus Exhibit Cross-Reactive and Long-Lived Antibody Responses. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; (23): 717–24.
 28. Hensley LE, Mulangu S, Asiedu C, Johnson J, Honko AN, Stanley D, et al. Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (5): e1000904.
 29. Mire CE, Geisbert JB, Marzi A, Agans KN, Feldmann H, Geisbert TW. Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against Bundibugyo ebolavirus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; (7): e2600.
 30. Marzi A, Ebihara H, Callison J, Groseth A, Williams KJ, Geisbert TW, et al. Vesicular stomatitis virus-based Ebola vaccines with improved cross-protective efficacy. *J Infect Dis.* 2011; 204 (Suppl 3): S1066–74.
 31. Hatcher EL, Zhdanov SA, Bao Y, Blinkova O, Nawrocki EP, Ostapchuk Y, et al. Virus Variation Resource — improved response to emergent viral outbreaks. *Nucleic Acids Res.* 2016; 45 (D1): 482–90.
 32. T Cell Epitope Prediction Tools [cited 2018 Nov 12]. Available from: <http://tools.iecb.org/main/tcell/>.
 33. Ilinykh PA, Santos RI, Gunn BM, Kuzmina NA, Shen X, Huang K, et al. Asymmetric antiviral effects of ebolavirus antibodies targeting glycoprotein stem and glycan cap. *PLoS Pathog.* 2018; 14 (8): e1007204.
 34. Audet J, Wong G, Wang H, Lu G, Gao GF, Kobinger G, et al. Molecular characterization of the monoclonal antibodies composing ZMAb: a protective cocktail against Ebola virus. *Sci Rep.* 2014; (4): 6881.
 35. Murin CD, Fusco ML, Bornholdt ZA, Qiu X, Olinger GG, Zeitlin L, et al. Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111 (48): 17182–7.
 36. Ponomarenko J, Vaughan K, Sette A, Maurer-Stroh S. Conservancy of mAb Epitopes in Ebolavirus Glycoproteins of Previous and 2014 Outbreaks. *PLoS Curr.* 2014; (6).
 37. Zhao X, Howell KA, He S, Brannan JM, Wec AZ, Davidson E, et al. Immunization-Elicited Broadly Protective Antibody Reveals Ebolavirus Fusion Loop as a Site of Vulnerability. *Cell.* 2017; 169 (5): 891–904.
 38. Misasi J, Gilman MS, Kanekiyo M, Gui M, Cagigi A, Mulangu S, et al. Structural and molecular basis for Ebola virus neutralization by protective human antibodies. *Science.* 2016; 351 (6279): 1343–6.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ БИОСЕНСОР ROKATE ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ПУЛА ГЛУТАТИОНА

А. Г. Шохина¹, В. В. Белоусов^{1,2}, Д. С. Билан¹ ✉

¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Генетически кодируемые биосенсоры на основе флуоресцентных белков представляют собой инструмент исследования ряда биологических процессов в живых системах в режиме реального времени. За последние годы было создано целое семейство биосенсоров, позволяющих визуализировать в живых клетках изменения редокс-состояния пула глутатиона. Целью настоящей работы была разработка нового биосенсора для регистрации соотношения 2GSH/GSSG на основе красного флуоресцентного белка mKate2. Для этого методом направленного мутагенеза в структуру флуоресцентного белка вносили пару аминокислотных остатков цистеина, которые при окислении окружающего пула глутатиона формируют дисульфидную связь, что приводит к изменению спектральных характеристик. Полученный биосенсор был протестирован *in vitro* на выделенном препарате белка, в частности, были исследованы спектральные характеристики, pH-чувствительность белка, окислительно-восстановительный потенциал. Кроме того, биосенсор, названный roKate, был протестирован в культуре живых клеток млекопитающих. Он отличается высокой яркостью и повышенной стабильностью сигнала при изменениях pH в физиологическом диапазоне. От других представителей данного семейства биосенсоров roKate отличается необратимым изменением сигнала при окислении в клетках млекопитающих. Применение данного сенсора предпочтительно в экспериментах с наличием длительного промежутка времени между воздействием на биологическую систему и последующим анализом вызванного эффекта, например в условиях длительной пробоподготовки.

Ключевые слова: генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор, глутатион, соотношение 2GSH/GSSG, roKate

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а_дк № 16-34-60175.

Информация о вкладе авторов: А. Г. Шохина проводила экспериментальную работу; В. В. Белоусов и Д. С. Билан руководили исследованиями, писали текст статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Сергеевич Билан
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; d.s.bilan@gmail.com

Статья получена: 26.12.2018 **Статья принята к печати:** 02.03.2019 **Опубликована онлайн:** 14.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.013

A GENETICALLY ENCODED BIOSENSOR ROKATE FOR MONITORING THE REDOX STATE OF THE GLUTATHIONE POOL

Shokhina AG¹, Belousov VV^{1,2}, Bilan DS¹ ✉

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

² Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Genetically encoded fluorescent sensors are exploited to study a variety of biological processes in living organisms in real time. In recent years, a whole family of biosensors has been developed, serving to visualize changes in the glutathione redox state. The aim of our experiment was to design a biosensor based on the red fluorescent protein mKate2 for measuring the 2GSH/GSSG ratio. A pair of cysteine amino acid residues were introduced into the structure of the fluorescent protein using site-directed mutagenesis. These residues form a disulfide bridge when the surrounding glutathione pool is oxidized, affecting the spectral characteristics of the protein. Our biosensor, which we called roKate, was tested *in vitro* on an isolated protein. Specifically, we examined the spectral characteristics, pH and the redox potential of the sensor. Additionally, the performance of roKate was evaluated using the culture of living mammalian cells. The fluorescent signal emitted by the sensor was very bright and remarkably stable under pH conditions varying in the physiological range. Irreversibly oxidized in mammalian cells, roKate stands out from other members of this biosensor family. This biosensor should be preferred in the experiments when the time between the manipulations with the biological object and the subsequent analysis of the induced effect is substantial, as is the case with long sample preparation.

Keywords: genetically encoded fluorescent sensor, glutathione, 2GSH/GSSG ratio, roKate

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project mol_a_dk No.16-34-60175).

Author contribution: Shokhina AG was responsible for the experimental part of the study. Belousov VV and Bilan DS supervised the study and prepared this manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry S. Bilan
Miklouho-Maclay, 16/10, Moscow, 117997; d.s.bilan@gmail.com

Received: 26.12.2018 **Accepted:** 02.03.2019 **Published online:** 14.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.013

Изучение окислительно-восстановительных (далее редокс-) процессов представляет собой актуальное и интенсивно развивающееся направление в современных биомедицинских исследованиях. Соотношение восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона представляет собой один из важнейших показателей редокс-статуса клеток. Глутатион по своей природе — трипептид (γ -глутамилцистеинилглицин), концентрация которого в клетке может достигать высоких значений (до 10 мМ) [1]. Биологическая функция глутатиона обусловлена способностью его двух восстановленных молекул (2GSH)

отдавать пару электронов молекуле акцептору. При этом глутатион переходит в окисленную форму с образованием дисульфида GSSG, который вновь может восстановиться с помощью фермента глутатионредуктазы (GR) [2]. GSH выполняет ключевую роль в реакциях восстановления перекисей липидов и пероксида водорода, которые возникают в клетках при окислительном стрессе. Структура и функции многих белков клетки зависят от обратимого формирования дисульфидных связей [3], восстановление которых происходит с помощью глутатиона. Таким образом, глутатион выполняет первостепенную роль в реакциях

тиол-дисульфидного обмена клеток, а также вовлечен в глутатионилирование белков, что обуславливает его важную роль в процессах внутриклеточной редокс-сигнализации и фолдинга белков.

Многие патологические состояния вызваны нарушениями в системах, участвующих в регуляции внутриклеточного уровня глутатиона или его редокс-состояния (соотношения 2GSH/GSSG). Так, нарушение синтеза глутатиона, вызванное мутациями в генах, ответственных за синтез субъединиц γ -глутамилцистеинсинтетазы, связано с развитием ряда заболеваний: сахарного диабета [4], астмы [5], шизофрении [6] и др. Нарушения в работе глутатионредуктазы, поддерживающей пул глутатиона в восстановленном состоянии, ассоциированы, например, с системной красной волчанкой [7] и некоторыми формами фавизма [8]. В опухолевых клетках активность этого фермента часто наоборот оказывается повышенной, что приводит к увеличению концентрации GSH и усиливает антиоксидантную защиту патологических клеток [9]. Соотношение 2GSH/GSSG служит важным показателем редокс-состояния внутриклеточной среды, изменение которого связано не только с патологией, но и с регуляцией многих физиологических процессов, например дифференцировкой [10, 11], пролиферацией [12], апоптозом [13]. Однако именно масштабные и неконтролируемые изменения клеточного тиол-дисульфидного обмена приводят к серьезным заболеваниям, в том числе нейродегенеративным, а также связанным с отклонениями работы многих систем органов, в том числе иммунной, сердечно-сосудистой и рядом других [14]. Существуют и другие функции глутатиона в организме. Известно, что метаболизм различных ксенобиотиков включает в себя стадию конъюгации с GSH в реакции, катализируемой глутатионтрансферазами [15].

Определить GSH и GSSG в образце можно с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Другой подход исследования редокс-состояния пула глутатиона в биологических образцах основан на использовании химических красителей. Таким классическим красителем является реагент Элмана [16], использование которого подразумевает разрушение клеток для получения клеточных экстрактов или гомогенатов тканей. Синтетические красители ThiolQuant Green [17] и RealThiol [18] позволяют проводить измерения в целостных клетках. Однако с помощью обоих «прижизненных красителей» можно оценить количественные изменения только GSH. В настоящее время наиболее популярным инструментом для исследования динамики соотношения 2GSH/GSSG служит семейство генетически кодируемых индикаторов на основе редокс-чувствительных флуоресцентных белков (roFP). Функционирование таких индикаторов основано на окислении двух поверхностных остатков цистеина, введенных в структуру флуоресцентного белка методом точечного мутагенеза. Степень окисления редокс-чувствительных цистеиновых остатков биосенсора определяется окружающим пулом глутатиона. Остатки цистеина в структуре белка расположены близко друг к другу таким образом, что при окислении в ответ на изменение соотношения 2GSH/GSSG образуют дисульфидную связь. Образование такой связи в структуре белка приводит к конформационным изменениям, влияющим на его спектральные свойства. Таким образом, в зависимости от значения параметра 2GSH/GSSG roFP находится в окисленном или восстановленном состоянии, которые можно различить спектрально. Поскольку такой индикатор имеет белковую природу, его ген можно экспрессировать

в исследуемой биологической системе любого уровня сложности: от отдельных клеточных органелл до тканей трансгенного организма. Первый представитель этого семейства индикаторов был создан на основе желтого флуоресцентного белка [19], позже появились белки на основе зеленого [20, 21]. К настоящему моменту создана обширная коллекция редокс-чувствительных индикаторов для мониторинга динамики изменения соотношения 2GSH/GSSG в живых системах в режиме реального времени. Существующие версии отличаются по многим своим параметрам, например, по спектральным характеристикам, редокс-потенциалу, скорости реакции, специфичности [22].

Индикаторы с красной эмиссией флуоресценции наиболее удобны для работы *in vivo* из-за минимального поглощения света данного диапазона длин волн соединениями, которые содержатся в тканях (вода, гемоглобин, меланин и др.). Кроме того, зеленый свет, который используется для возбуждения хромофора красного белка, менее токсичен для клеток по сравнению с синим и фиолетовым, которыми возбуждают флуоресценцию индикаторов на основе белков с зеленой эмиссией. Целью настоящей работы было получение новой версии редокс-чувствительного индикатора на основе красного флуоресцентного белка mKate2 [23]. Созданный нами индикатор roKate для регистрации изменения соотношения 2GSH/GSSG характеризуется повышенной pH-стабильностью и высокой яркостью. Особенностью биосенсора roKate является его необратимый ответ в клетках млекопитающих после окисления, что позволяет использовать его в качестве индикатора, обладающего «памятью окисления» пула глутатиона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение генетических конструкций

С помощью направленного мутагенеза мы вносили точечные мутации в структуру красного флуоресцентного белка mKate2. Реакционная проба для амплификации ДНК содержала термостабильную полимеразу Tersus с соответствующим буфером (Evrogen; Россия), эквимольную смесь dNTP (по 200 мкМ), праймеры (10 мкМ) и матричную ДНК (100 нг). Программа ПЦР включала 22 цикла, каждый из которых включал стадию денатурации (95 °C, 30 с), отжига праймеров (60 °C, 45 с), элонгацию (72 °C, 90 с).

Для улучшения свойств отобранных конструкций проводили случайный мутагенез. Реакционная проба содержала термостабильную полимеразу Taq с соответствующим буфером (Evrogen; Россия), праймеры (10 мкМ), dATP (200 мкМ), dTTP (200 мкМ), dCTP (200 мкМ), dGTP (360 мкМ), MnSO₄ (640 мкМ), матричную ДНК (20 нг). Программа ПЦР включала 27 циклов, каждый из которых включал стадию денатурации (95 °C, 30 с), отжига праймеров (60 °C, 45 с), элонгацию (72 °C, 105 с). Ожидаемое количество мутаций — 4–5 на конструкцию [24]. Полученные версии были клонированы в плазмидные векторы pQe30 (для экспрессии в бактериальных клетках) и pC1 (для экспрессии в клетках млекопитающих).

Работа с бактериальной культурой клеток

В работе использовали клетки *E. coli* штамма XL 1-Blue. Клетки растили в жидкой среде LB или на твердой среде на чашках Петри (1,5% агар, приготовленный на LB). Среда содержала антибиотики: 100 мкг/мл ампициллин (в случае

использования вектора pQe30) или 25 мкг/мл канамицин (в случае использования вектора pC1).

Для скрининга флуоресценции бактериальных клонов использовали флуоресцентный бинокуляр US SZX12 (Olympus; Япония). Отбирали наиболее яркие колонии, которые переносили на твердую среду. Для последующих измерений использовали спектрофлуориметр Varian Cary Eclipse (Agilent; США). Для этого биомассу бактерий суспендировали в 1 мл PBS буфера и регистрировали спектры эмиссии ($\lambda_{ex} = 585$ нм) и возбуждения флуоресценции ($\lambda_{em} = 624$ нм). Для изменения редокс-статуса клеток к суспензии добавляли H_2O_2 до конечных концентраций 100 мкМ — 2 мМ. Полученные результаты обрабатывали в программе OriginPro 9.0 (OriginLab; США).

Получение препарата рекомбинантного белка

Для получения препарата рекомбинантного белка наращивали биомассу бактерий *E. coli* XL 1-Blue, экспрессирующих ген биосенсора. Для этого бактериальные клетки трансформировали плазмидой pQe30 roKate. Полученный в данной системе белок на C-конце содержит гистидиновый таг (His-tag). Полученные клоны бактерий помещали в среду LB с антибиотиком (ампициллин 100 мкг/мл), условия роста — 16 ч при комнатной температуре (перемешивание 200 об./мин). Полученную суспензию бактерий осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 2000 g и температуре 4 °C. Лизис клеток проводили с помощью коммерческого набора B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent (ThermoFisher; США). Далее пробы центрифугировали в течение 20 мин при 18 000 g и температуре 4 °C. Надосадочную жидкость наносили на колонку, содержащую смолу TALON (Clontech; США), связывающую His-tag. Элюцию белка с колонки осуществляли раствором PBS (pH 7,0), содержащим 250 мМ имидазола. Для очистки рекомбинантного белка от имидазола использовали гель-фильтрационные колонки с сефадексом G-50 (GE Healthcare Life Sciences; Англия). Для восстановления дисульфидной связи белка пробу инкубировали 30 мин в растворе PBS с 20 мМ дитиотреитола.

Тестирование биосенсора *in vitro*

Аликвоту очищенного белка добавляли к 1 мл раствора PBS (pH 7,0) до конечной концентрации 100 нМ в кювете для спектрофотометрии. Спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse (Agilent; США), параметры регистрации: $\lambda_{ex} = 585$ нм, $\lambda_{em} = 624$ нм. К пробе добавляли GSSG или GSH в диапазоне концентраций 50 мкМ — 2 мМ, после чего регистрировали спектры.

Для определения редокс-потенциала биосенсора очищенный препарат белка титровали растворами глутатиона, в которых соотношение GSH/GSSG варьировало от 10 : 0 до 0 : 10. Для расчета редокс-потенциала использовали следующий подход. Определяли величину Y по формуле: $Y = (F_n - F_{min}) / (F_{max} - F_n)$, где F_n — интенсивность флуоресценции в пробе с заданным соотношением GSH/GSSG, F_{min} — интенсивность флуоресценции в пробе с 1 мМ GSSG, а F_{max} — в пробе с 1 мМ GSH. По полученным значениям строили график зависимости $\log Y$ от $\log([GSSG]/[GSH])$. Находили соотношение GSSG/2GSH, при котором сигнал биосенсора изменялся на 50%, найденное значение обозначали, как величину A. Константу равновесия K_{eq} определяли по формуле $\log K_{eq} = \log(F_{max}/F_{min}) - \log A$.

Рассчитывали редокс-потенциал (E) по формуле: $E = E_0 - (RT/nF) \cdot \ln K_{eq}$, где E_0 — редокс-потенциал глутатиона (–240 мВ) при pH 7,0, R — газовая постоянная (8,314 Дж/моль • К), T — температура (K), n — число электронов, участвующих в обмене, F — константа Фарадея (96490 Дж/моль/V).

Для определения степени окисленности (OxD) пула глутатиона и roKate в пробе с определенным соотношением GSH : GSSG использовали следующие формулы:

$$OxD_{GSH} = 2[GSH]/(2[GSSG] + [GSH]),$$

$$OxD_{roKate} = [GSH]/([GSSG](K_{eq} + [GSH]/[GSSG])).$$

Квантовый выход биосенсора рассчитывали по формуле: $QY = ((Em_{roKate} \cdot Abs_{mKate2}) / (Em_{mKate2} \cdot Abs_{roKate})) \cdot QY_{mKate2}$, где Em_{roKate} и Em_{mKate2} — интенсивность флуоресценции биосенсора roKate и белка сравнения mKate2 в максимуме эмиссии при $\lambda = 624$ нм, Abs_{roKate} и Abs_{mKate2} — поглощение биосенсора roKate и белка сравнения mKate2 при $\lambda = 590$ нм, QY_{mKate2} — квантовый выход mKate2 (известная величина, равная 0,4).

Для оценки коэффициента молярной экстинкции (ξ) регистрировали спектр поглощения при $\lambda = 590$ нм для нативного белка roKate и для белка, денатурированного в 1 мМ NaOH. Исходя из допущения, что ξ денатурированного хромофора roKate равен ξ_{mKate2} (62500 M⁻¹ • см⁻¹), рассчитывали коэффициент молярной экстинкции нативного roKate по следующей формуле: $\xi_{нативного} = (Abs_{нативного} \cdot \xi_{денат.}) / Abs_{денат.}$

Для определения величины pK_a биосенсора использовали ряд буферных растворов с заданным значением pH от 3,0 до 11,0 с шагом 0,5. Аликвоту белка добавляли в каждый из растворов до конечной концентрации 100 нМ и регистрировали спектр возбуждения флуоресценции, после чего строили график зависимости интенсивности от pH.

Культура клеток млекопитающих

В работе использовали клетки линии HeLa Kyoto, которые культивировали в среде DMEM с 10% FBS, 2 мМ глутамин, 1% антибиотиков пенициллина и стрептомицина. Условия содержания — 37 °C, 5% CO₂.

Перед проведением трансфекции клетки культивировали на 35 мм чашках со стеклянным дном для микроскопии FluoroDishes (World Precision Instruments; США). Плазмидную ДНК смешивали с реагентом для трансфекции FuGene HD (Promega; США), следуя рекомендациям производителя. После добавления трансфекционного раствора в культуральную среду с клетками, флаконы с конечной смесью помещали в инкубатор. Микроскопию проводили на следующий день.

Флуоресцентная микроскопия

Для микроскопии клеток использовали флуоресцентный микроскоп DMI 6000 B (Leica; Германия), оборудованный ртутной лампой 120W HXP (Osram; Германия) в качестве источника света, и CCD-камерой CoolSNAP HQ (Photometrics; США). Для регистрации флуоресценции в диапазоне красной области света использовали фильтр TX2 (Excitation: BP560/40; Emission: BP645/75). Перед микроскопией клеточную среду DMEM заменяли раствором Хэнкса, содержащим 15 мМ Hepes. Микроскопию проводили в 1 мл среды при температуре 37 °C. В качестве неспецифического окислителя внутриклеточного пула глутатиона использовали пероксид водорода, который

добавляли к клеткам в объеме 100 мкл до конечной концентрации 750 мкМ. В качестве восстановителя использовали дитиотреитол до конечной концентрации 2 мМ. Полученные серии изображений анализировали с помощью программы Leica Application Suite Advanced Fluorescence (Leica; Германия). Конечную обработку результатов проводили с помощью программ ImageJ (EMBL; Германия) и OriginPro 9.0 (OriginLab; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение генетических конструкций

Для создания редокс-биосенсора, позволяющего регистрировать изменение соотношения 2GSH/GSSG, мы выбрали красный флуоресцентный белок mKate2, который отличается высокой яркостью, повышенной pH-стабильностью в физиологическом диапазоне изменений, а также мономерным состоянием [23]. В структуру белка mKate2 с помощью направленного мутагенеза мы ввели пару остатков цистеина (Cys) таким образом, чтобы при окислении они могли формировать дисульфидную связь. Нами было получено 10 версий белка, отличающихся позициями вставок Cys: 142/198, 142/196, 141/161, 144/196, 141/198, 141/161, 141/196, 107/118, 140/214, 200/214. Известно, что равновесие между редокс-активными остатками цистеинов созданных ранее биосенсоров rYFP, roGFP и пулом глутатиона устанавливается достаточно медленно. Однако если локально возле этих белков увеличить концентрацию глутаредоксина (Grx), реакция протекает значительно быстрее. По этой причине для увеличения динамических характеристик биосенсоров, rYFP и roGFP были на уровне гена связаны с человеческим Grx1 через полипептидный линкер [25, 26]. Все полученные нами пробы на основе белка mKate2 также содержали на N-конце человеческий Grx1, присоединенный с помощью линкера (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly)₆. На рис. 1А представлена схема функционирования предполагаемого биосенсора.

roKate в бактериальной системе экспрессии

Полученные нами генетические конструкции мы экспрессировали в бактериальных клетках *E. coli* штамма XL1 Blue. Через сутки у выросших клонов мы анализировали наличие флуоресценции и оценивали яркость. Для определения функциональной активности каждой светящейся версии биосенсора мы регистрировали изменение спектров возбуждения флуоресценции в суспензии бактерий до и после добавления пероксида водорода (H₂O₂) до конечной концентрации 1 мМ. H₂O₂ является сильным окислителем, который, в избытке попадая в клетку, значительно изменяет редокс-состояние внутренней среды, в том числе редокс-состояние пула глутатиона, сдвигая равновесие в сторону образования GSSG. В качестве отрицательного контроля в этой системе мы использовали белок Grx1-mKate2, не содержащий редокс-активных Cys в хромофорном окружении флуоресцентного белка и поэтому не демонстрирующий спектральных изменений в ответ на окисление. Среди всех вариантов для дальнейшей работы мы отобрали лишь две конструкции с Cys в положениях 141/198 и 141/196. Другие мутантные формы белка были либо не флуоресцирующими, либо не реагировали на окисление.

Интенсивность флуоресценции отобранных мутантных форм в ответ на добавление H₂O₂ изменялась менее

чем на 10%. Для улучшения свойств белков мы провели цикл случайного мутагенеза с их генами. Данный метод подразумевает внесение в ген контролируемого количества случайных мутаций. С помощью такого подхода можно получить тысячи вариантов одного и того же белка, отличающихся несколькими аминокислотными заменами. При дальнейшем скрининге можно отобрать версии с оптимальными свойствами, поскольку даже единичная мутация может привести к значительным изменениям интересующих параметров белка. После проведения нескольких циклов случайного мутагенеза мы отбирали наиболее яркие клоны, которые в дальнейшем тестировали в условиях окислительного стресса. В результате была отобрана версия, которая, помимо редокс-активных Cys141 и Cys198, содержала две дополнительные мутации Lys12Glu и Asn21Asp в структуре флуоресцентного белка. Указанную мутантную форму белка назвали roKate. Амплитуда ответа roKate в бактериальных клетках при окислении составляет не менее 40% (падение интенсивности флуоресценции).

Определение характеристик roKate *in vitro*

Для более детального исследования свойств полученной версии биосенсора мы выделили белок roKate. Для белка характерен один пик в спектре возбуждения флуоресценции с максимумом 585 нм и один пик эмиссии с максимумом в области 624 нм (рис. 1Б). Поскольку для первоначального скрининга мы использовали высокие концентрации H₂O₂, прежде всего мы проверили, может ли H₂O₂ напрямую окислять редокс-активные Cys остатки белка. Для этого в пробу с белком (100 нМ) добавляли H₂O₂ до конечной концентрации 1 мМ, спектр возбуждения флуоресценции такой пробы не изменялся (рис. 1В). Если к белку предварительно добавить восстановленный глутатион GSH (1 мМ), а после в ту же пробу внести 1 мМ H₂O₂, интенсивность флуоресценции падает примерно на 40%, что обусловлено окислением GSH (рис. 1Г). Такой же ответ мы регистрировали при добавлении к белку заранее окисленного глутатиона GSSG (1 мМ) (рис. 1Д). При этом данная реакция обратима в условиях *in vitro*. При внесении в эту же пробу фермента глутатионредуктазы (GR) и NADPH интенсивность флуоресценции белка возвращается практически к исходному значению (рис. 1Д). Таким образом, изменение флуоресцентного сигнала белка опосредовано изменением редокс-статуса глутатиона.

Для определения редокс-потенциала roKate выделенный белок титровали растворами с содержанием GSH и GSSG в разных соотношениях (от 10 : 0 до 0 : 10). На рис. 2А представлена зависимость степени окисленности roKate от степени окисленности глутатиона. По полученным данным мы определили редокс-потенциал биосенсора, который составил -245 мВ.

Используя стандартный ряд буферных растворов с заданным значением pH, мы протестировали pH-чувствительность белка. Хромофор флуоресцентных белков может находиться в протонированном и депротонированном состояниях, благодаря аминокислотному остатку тирозина в его составе. Поэтому интенсивность флуоресценции зависит от значения pH. В экспериментальной системе важно учитывать, насколько изменяется флуоресцентный сигнал используемого биосенсора при изменениях pH в физиологическом диапазоне значений (6,0–8,0). Мы определили, что pKa биосенсора roKate составляет 6,5. При

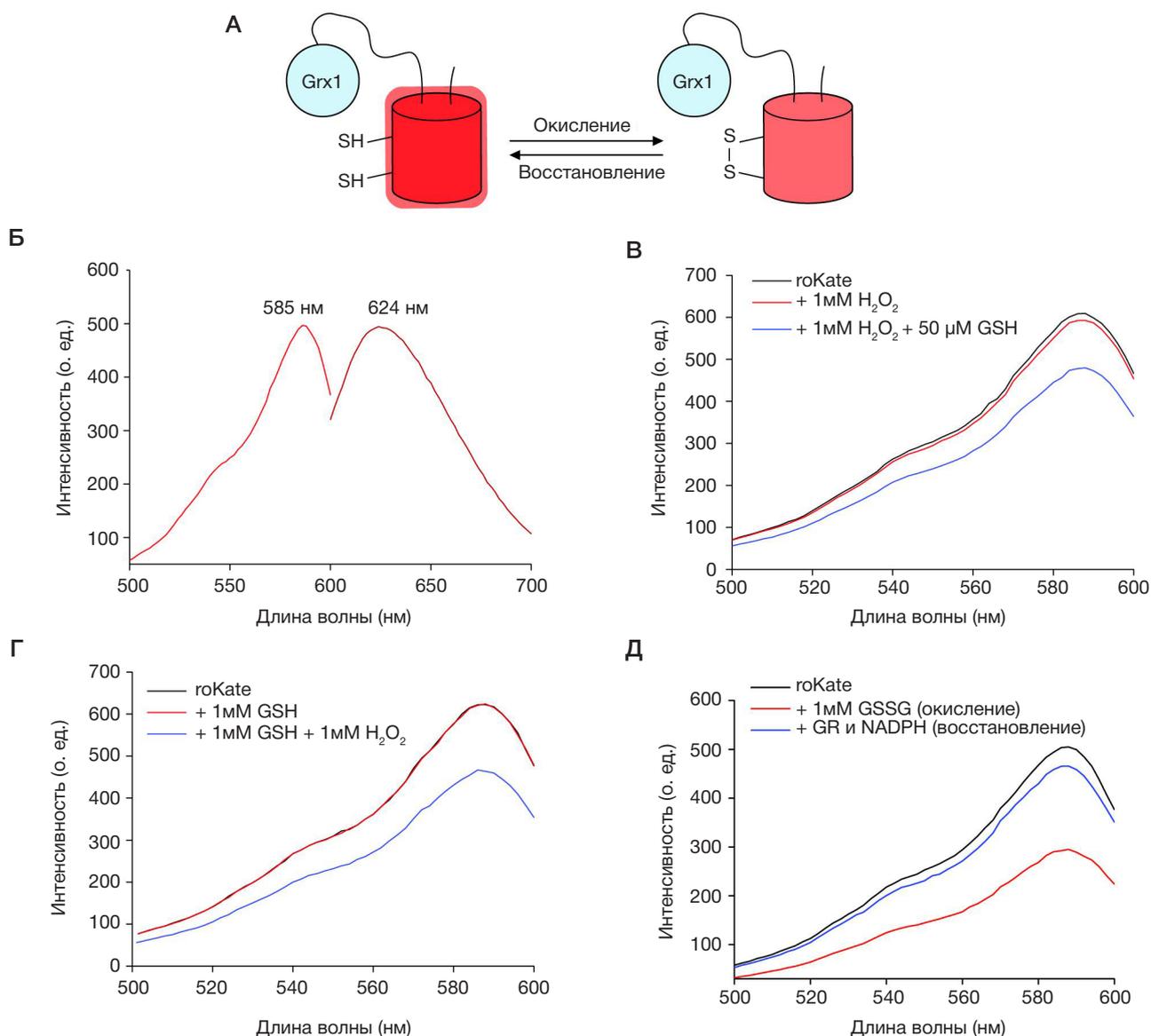


Рис. 1. А. Схема функционирования биосенсора roKate. В структуру красного флуоресцентного белка внесены два близкорасположенных аминокислотных остатка цистеина, которые при участии человеческого глутаредоксина 1 (Grx1) формируют дисульфидную связь при окислении. При окислении уменьшается интенсивность флуоресценции белка. **Б.** Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции биосенсора roKate. **В.** Изменение спектра возбуждения флуоресценции roKate в ответ на добавление пероксида водорода и последующее добавление в ту же пробу GSH. **Г.** Изменение спектра возбуждения флуоресценции roKate на выделенном препарате белка при окислении (добавка GSSG) и последующем восстановлении (ферментативная реакция восстановления глутатиона с участием GR и NADPH)

изменении pH от 6,0 до 8,0 интенсивность флуоресценции увеличивается примерно в 3 раза (рис. 2Б).

Мы также оценили коэффициент молярной экстинкции roKate и квантовый выход, которые составили $36400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и 0,3 соответственно.

roKate в эукариотической системе экспрессии

Ген roKate был перенесен в вектор pC1 для тестирования сенсора в клетках млекопитающих. В человеческих клетках линии HeLa Kyoto максимальная амплитуда ответа составила 55% при окислительном стрессе, вызванном добавлением в среду H₂O₂ (максимальная концентрация 750 мкМ) (рис. 3А и Б). Повторное внесение H₂O₂ осуществляли с целью выяснить максимальное изменение сигнала при окислении. Подобные биосенсоры в живых клетках обычно восстанавливаются клеточными системами

без внесения каких-либо восстановителей. Однако roKate не восстанавливался в цитоплазме клеток HeLa Kyoto даже после инкубации с различными восстановителями (дитиотреитол, β-меркаптоэтанол, трис(2-карбоксиил) фосфин). Конструкция без Grx1 на N-конце значительно уступает полноразмерному биосенсору в скорости реакции (рис. 3А). Данный факт свидетельствует в пользу того, что Grx1 выполняет ключевую роль в установлении равновесия между внутриклеточным пулом глутатиона и редокс-активными остатками цистеина сенсора. Версия без редокс-активных остатков Cys в структуре mKate2 в данной системе не продемонстрировала изменений флуоресцентного сигнала.

В эукариотической системе биосенсор roKate окисляется необратимо. Таким образом, roKate позволяет детектировать в клетках млекопитающих только динамику окисления пула глутатиона и не позволяет визуализировать его обратного восстановления.

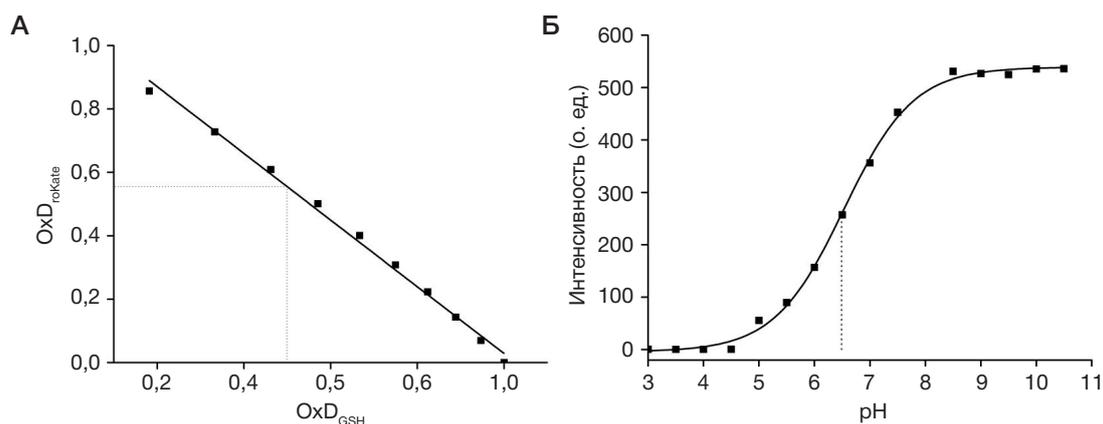


Рис. 2. А. Зависимость степени окисленности roKate от степени окисленности глутатиона. Б. Зависимость интенсивности флуоресценции roKate от pH

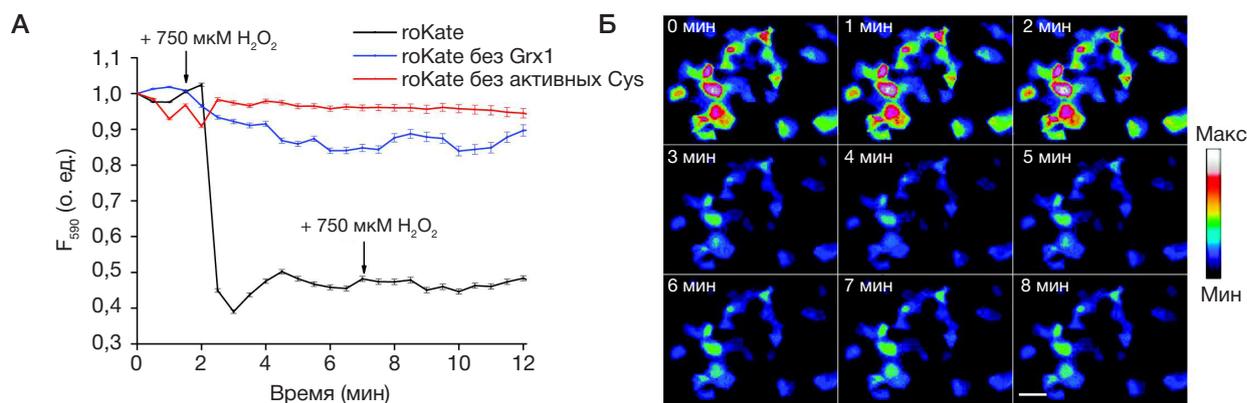


Рис. 3. Биосенсор roKate в клетках линии HeLa Kyoto. А. Динамика изменения интенсивности флуоресценции roKate (черная линия), версии сенсора без Grx1 (синяя линия) и версии сенсора без редокс-активных остатков цистеина (красная линия) в цитоплазме живых клеток HeLa Kyoto в ответ на внесение в среду пероксида водорода (момент добавки отмечен стрелкой). Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего значения. Б. Фотографии клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих биосенсор roKate, до и после добавки пероксида водорода (указанное время соответствует таковому на графике рисунка А). Фотографии окрашены в псевдоцвета, соответствующие значению сигнала биосенсора. Шкала 40 мкм

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы разработали генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор для регистрации редокс-состояния пула глутатиона на базе красного флуоресцентного белка mKate2. Полученный нами биосенсор roKate отличается по свойствам и дизайну строения от ранее разработанного варианта rXRFP [27]. Индикатор rXRFP был создан на базе кругового пермутанта красного белка crmApple. Круговые пермутанты флуоресцентных белков получают путем соединения на уровне гена исходных N- и C-концов полипептидным линкером и формирования новых в непосредственной близости с хромофором. Таким образом структура кругового пермутанта флуоресцентного белка становится более конформационно подвижной, что влияет на изменение спектральных характеристик. В структуре биосенсора rXRFP редокс-активные остатки цистеина расположены на N- и C-концах кругового пермутанта, при этом белок не шит с Grx [27], т. е. для его уравнивания с окружающим редокс-состоянием пула глутатиона используется эндогенный Grx. Кроме того, хромофор круговых пермутантов флуоресцентных белков более открыт для окружающей среды по сравнению с закрытыми структурами нативных белков. По этой причине, например, биосенсор rXRFP чувствителен к физиологическим колебаниям pH.

Еще одним представителем семейства биосенсоров на основе красных флуоресцентных белков для регистрации соотношения 2GSH/GSSG является Grx1-roCherry. Структура биосенсора Grx1-roCherry устроена

по классическому принципу и состоит из белка mCherry, содержащего пару редокс-активных цистеинов, и соединенного через полипептидный линкер Grx1. Данный биосенсор отличается от roKate редокс-потенциалом (-311 мВ), а также способностью к обратному восстановлению в различных клетках млекопитающих [28].

Помимо того, что биосенсоры с красной флуоресценцией более удобны для работы с системами *in vivo*, они могут быть использованы в комбинации с зелеными индикаторами в режиме многопараметрической микроскопии. Данный подход более информативен, поскольку позволяет регистрировать сразу несколько параметров в пределах одной биологической системы или один и тот же параметр, например, в разных компартментах клетки [29].

По неустановленной причине окисленный сенсор roKate в клетках млекопитающих не восстанавливается, поэтому он может быть использован в качестве «сенсора-памяти», фиксирующего момент окисления в живых клетках или тканях. Это может быть удобно в моделях с наличием длительных временных интервалов между биологическими событиями и регистрацией флуоресцентного сигнала, например при длительной пробоподготовке. За время, которое в некоторых случаях требуется для подготовки проб к анализу, восстановительные системы клеток могут восстановить пул глутатиона и исказить результат исследования. Поскольку roKate в клетках млекопитающих окисляется необратимо, эффект окисления глутатиона, вызванный различными воздействиями, может быть таким образом зафиксирован. Кроме того, биосенсор roKate также можно использовать для регистрации динамики

окисления внутриклеточного пула глутатиона в режиме реального времени.

ВЫВОДЫ

Мы разработали новый генетически кодируемый красный флуоресцентный биосенсор roKate для регистрации

редокс-состояния пула глутатиона. Биосенсор roKate может быть использован для изучения редокс-процессов, связанных с изменением соотношения 2GSH/GSSG в клетках бактерий. В клетках млекопитающих roKate окисляется необратимо. Данное свойство позволяет использовать roKate в качестве «сенсора-памяти», помогающего фиксировать во времени окисление пула глутатиона.

Литература

- Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012; 2012: 736837.
- Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016; (95): 27–42.
- Nagy P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18 (13): 1623–41.
- Bekris LM, Shephard C, Janer M, Graham J, McNeney B, Shin J, Zarghami M, Griffith W, Farin F, Kavanagh TJ, Lernmark A. Glutamate cysteine ligase catalytic subunit promoter polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset and GAD65 autoantibody levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007; 115 (4): 221–28.
- Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Khoroshaya IV, Kozhuhov MA, Panfilov VI. The relationship between polymorphisms in the glutamate cysteine ligase gene and asthma susceptibility. *Respir Med*. 2007; 101 (11): 2422–4.
- Tosic M, Ott J, Baral S, Bovet P, Deppen P, Gheorghita F, Matthey ML, Parnas J, Preisig M, Saraga M, Solida A, Timm S, Wang AG, Werge T, Cuenod M, Do KQ. Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene. *Am J Hum Genet*. 2006; 79 (3): 586–92.
- Ramos PS, Oates JC, Kamen DL, Williams AH, Gaffney PM, Kelly JA, et al. Variable association of reactive intermediate genes with systemic lupus erythematosus in populations with different African ancestry. *J Rheumatol*. 2013; 40 (6): 842–9.
- Kamerbeek NM, van Zwieten R, de Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N, et al. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*. 2007; 109 (8): 3560–6.
- Backos DS, Franklin CC, Reigan P. The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83 (8): 1005–12.
- Huh YJ, Kim JM, Kim H, Song H, So H, Lee SY, et al. Regulation of osteoclast differentiation by the redox-dependent modulation of nuclear import of transcription factors. *Cell Death Differ*. 2006; 13 (7): 1138–46.
- Kim JM, Kim H, Kwon SB, Lee SY, Chung SC, Jeong DW, et al. Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325 (1): 101–8.
- Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87 (9): 3343–7.
- Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; (22 Suppl 1): 38–42.
- Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009; 390 (3): 191–214.
- Armstrong RN. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chem Res Toxicol*. 1991; 4 (2): 131–40.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 25 (1): 192–205.
- Jiang X, Yu Y, Chen J, Zhao M, Chen H, Song X, et al. Quantitative imaging of glutathione in live cells using a reversible reaction-based ratiometric fluorescent probe. *ACS Chem Biol*. 2015; 10 (3): 864–74.
- Jiang X, Chen J, Bajic A, Zhang C, Song X, Carroll SL, et al. Quantitative real-time imaging of glutathione. *Nat Commun*. 2017; (8): 16087.
- Ostergaard H, Henriksen A, Hansen FG, Winther JR. Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J*. 2001; 20 (21): 5853–62.
- Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, et al. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*. 2004; 279 (13): 13044–53.
- Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*. 2004; 279 (21): 22284–93.
- Schwarzlander M, Dick TP, Meyer AJ, Morgan B. Dissecting Redox Biology Using Fluorescent Protein Sensors. *Antioxid Redox Signal*. 2016; 24 (13): 680–712.
- Shcherbo D, Murphy CS, Ermakova GV, Solovieva EA, Chepurnykh TV, Shcheglov AS, et al. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J*. 2009; 418 (3): 567–74.
- Доступно по ссылке: www.clontech.com, протокол № PT3393-1.
- Bjornberg O, Ostergaard H, Winther JR. Mechanistic insight provided by glutaredoxin within a fusion to redox-sensitive yellow fluorescent protein. *Biochemistry*. 2006; 45 (7): 2362–71.
- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods*. 2008; 5 (6): 553–9.
- Fan Y, Chen Z, Ai HW. Monitoring redox dynamics in living cells with a redox-sensitive red fluorescent protein. *Anal Chem*. 2015; 87 (5): 2802–10.
- Shokhina AG, Kostyuk AI, Ermakova YG, Panova AS, Staroverov DB, Egorov ES, et al. Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry. *Redox Biol*. 2019; (21): 101071.
- Kostyuk AI, Panova AS, Bilan DS, Belousov VV. Redox biosensors in a context of multiparameter imaging. *Free Radic Biol Med*. 2018; (128): 23–39.

References

- Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012; 2012: 736837.
- Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016; (95): 27–42.
- Nagy P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18 (13): 1623–41.
- Bekris LM, Shephard C, Janer M, Graham J, McNeney B, Shin J,

- Zarghami M, Griffith W, Farin F, Kavanagh TJ, Lernmark A. Glutamate cysteine ligase catalytic subunit promoter polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset and GAD65 autoantibody levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007; 115 (4): 221–28.
5. Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Khoroshaya IV, Kozuhov MA, Panfilov VI. The relationship between polymorphisms in the glutamate cysteine ligase gene and asthma susceptibility. *Respir Med*. 2007; 101 (11): 2422–4.
 6. Tosic M, Ott J, Barral S, Bovet P, Deppen P, Gheorghita F, Matthey ML, Parnas J, Preisig M, Saraga M, Solida A, Timm S, Wang AG, Werge T, Cuenod M, Do KQ. Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene. *Am J Hum Genet*. 2006; 79 (3): 586–92.
 7. Ramos PS, Oates JC, Kamen DL, Williams AH, Gaffney PM, Kelly JA, et al. Variable association of reactive intermediate genes with systemic lupus erythematosus in populations with different African ancestry. *J Rheumatol*. 2013; 40 (6): 842–9.
 8. Kamerbeek NM, van Zwielen R, de Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N, et al. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*. 2007; 109 (8): 3560–6.
 9. Backos DS, Franklin CC, Reigan P. The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83 (8): 1005–12.
 10. Huh YJ, Kim JM, Kim H, Song H, So H, Lee SY, et al. Regulation of osteoclast differentiation by the redox-dependent modulation of nuclear import of transcription factors. *Cell Death Differ*. 2006; 13 (7): 1138–46.
 11. Kim JM, Kim H, Kwon SB, Lee SY, Chung SC, Jeong DW, et al. Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325 (1): 101–8.
 12. Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87 (9): 3343–7.
 13. Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; (22 Suppl 1): 38–42.
 14. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009; 390 (3): 191–214.
 15. Armstrong RN. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chem Res Toxicol*. 1991; 4 (2): 131–40.
 16. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 25 (1): 192–205.
 17. Jiang X, Yu Y, Chen J, Zhao M, Chen H, Song X, et al. Quantitative imaging of glutathione in live cells using a reversible reaction-based ratiometric fluorescent probe. *ACS Chem Biol*. 2015; 10 (3): 864–74.
 18. Jiang X, Chen J, Bajic A, Zhang C, Song X, Carroll SL, et al. Quantitative real-time imaging of glutathione. *Nat Commun*. 2017; (8): 16087.
 19. Ostergaard H, Henriksen A, Hansen FG, Winther JR. Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J*. 2001; 20 (21): 5853–62.
 20. Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, et al. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*. 2004; 279 (13): 13044–53.
 21. Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem*. 2004; 279 (21): 22284–93.
 22. Schwarzlander M, Dick TP, Meyer AJ, Morgan B. Dissecting Redox Biology Using Fluorescent Protein Sensors. *Antioxid Redox Signal*. 2016; 24 (13): 680–712.
 23. Shcherbo D, Murphy CS, Ermakova GV, Solovieva EA, Chepurnykh TV, Shcheglov AS, et al. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J*. 2009; 418 (3): 567–74. Available from: www.clontech.com, протокол № PT3393-1.
 24. Bjornberg O, Ostergaard H, Winther JR. Mechanistic insight provided by glutaredoxin within a fusion to redox-sensitive yellow fluorescent protein. *Biochemistry*. 2006; 45 (7): 2362–71.
 25. Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods*. 2008; 5 (6): 553–9.
 26. Fan Y, Chen Z, Ai HW. Monitoring redox dynamics in living cells with a redox-sensitive red fluorescent protein. *Anal Chem*. 2015; 87 (5): 2802–10.
 27. Shokhina AG, Kostyuk AI, Ermakova YG, Panova AS, Staroverov DB, Egorov ES, et al. Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry. *Redox Biol*. 2019; (21): 101071.
 28. Kostyuk AI, Panova AS, Bilan DS, Belousov VV. Redox biosensors in a context of multiparameter imaging. *Free Radic Biol Med*. 2018; (128): 23–39.

АРТЕРИИТ ТАКАЯСУ: РЕЗУЛЬТАТЫ РЕТРОСПЕКТИВНОГО АНАЛИЗА ПАЦИЕНТОВ УРАЛЬСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

И. Э. Бородина^{1,2}✉, А. А. Попов², Г. Г. Салаватова¹, Л. А. Шардина²

¹ Свердловская областная клиническая больница № 1, Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

Артериит Такаясу (АТ) — редкое заболевание, которое ревматологи, врачи общей практики и другие специалисты могут не распознать при первичном посещении пациента из-за различных клинических проявлений. Целью исследования было оценить клиническую картину и течение АТ у 183 пациентов Среднего Урала. В ретроспективную часть исследования вошли 183 страдающих АТ пациентов, наблюдавшихся в Свердловской областной клинической больнице № 1 в период с 1979 по 2018 г. Соотношение мужчин и женщин составляло 1 : 3. Средний возраст женщин — 33,5 года, мужчин — 35,2 лет. Наиболее часто были зарегистрированы поражения следующих артерий: подключичной — 101 (55%) случай, сонной — 98 (53%) случаев и почечных — 77 (42%) случаев. Наиболее часто встречался ангиографический тип V, а типичным ангиографическим признаком был артериальный стеноз — 94 (51%). Хирургические вмешательства выполнены 66 пациентам. За период исследования зарегистрирован 31 летальный исход, пятилетняя выживаемость составила 92%; 10-летняя — 90%, а 15-летняя — 80%. У 72 (39%) пациентов развились клинически значимые сердечно-сосудистые события: инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбоз крупной артерии и венозный тромбоз. В разных географических зонах АТ может иметь широкий спектр клинических проявлений.

Ключевые слова: артериит Такаясу, клинические проявления, почечная артерия

Информация о вкладе авторов: все авторы принимали участие в планировании работы, статистической обработке, обсуждении результатов, написании и редактировании текста. И. Э. Бородина и Г. Г. Салаватова проводили сбор первичного материала и формирование электронной базы данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФБГОУ ВО УГМУ Министерства здравоохранения России, протокол № 9 от 23 ноября 2018 г.

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Эдуардовна Бородина
ул. Репина, д. 3, г. Екатеринбург, Свердловская обл., 620014; borodysik@mail.ru

Статья получена: 10.08.2018 **Статья принята к печати:** 02.03.2019 **Опубликована онлайн:** 14.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.012

TAKAYASU'S ARTERITIS: THE RETROSPECTIVE ANALYSIS OF PATIENTS FROM THE URAL POPULATION

Borodina IE^{1,2}✉, Popov AA², Salavatova GG¹, Shardina LA²

¹ Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No.1, Yekaterinburg, Russia

² Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

Takayasu's arteritis (TA) is a rare disease that can be overlooked during the first visit to a GP, rheumatologist, or any other medical specialist due to a variety of its symptoms. The aim of this study was to describe the clinical presentation and the course of patients with TA residing in the Middle Ural. A retrospective analysis was conducted using the medical records of 183 patients treated at the Sverdlovsk Regional Clinical Hospital 1 from 1979 through 2018. The male to female ratio was 1:3. The mean age was 33.5 years for women and 35.2 for men. The most frequently involved arteries were subclavian (101 cases; 55%), carotid (98 cases; 53%) and renal (77 cases; 42%). Type V was the most common angiographic type. Arterial stenosis was present in 94 (51%) patients. Sixty-six patients received surgical interventions. Of all patients included in the analysis, 31 died. The observed 5-year survival was 92%, 10-year survival, 90% and 15-year survival, 80%. Seventy-two patients (39%) developed major adverse cardiovascular events (MACE), including myocardial infarction, ischemic stroke, and thrombosis of large arteries/veins. The clinical presentation of TA may vary in different geographical regions.

Keywords: Takayasu's arteritis, clinical symptoms, renal artery

Author contribution: all authors participated in conceiving and planning the study, processing the data, discussing the results, and writing the manuscript. Borodina IE and Salavatova GG collected the medical records for the electronic database.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University (Protocol No. 9 dated November 23, 2018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina E. Borodina
Repina 3, Yekaterinburg, Sverdlovsk region, 620014; borodysik@mail.ru

Received: 10.08.2018 **Accepted:** 02.03.2019 **Published online:** 14.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.012

Артериит Такаясу (АТ) представляет собой гранулематозное воспаление аорты и ее крупных ветвей. Считается, что АТ встречается в основном в Азии и Южной Америке, но несчастные случаи регистрируются и в других частях мира [1]. Распространенность АТ варьирует от 0,8 до 2,6 случаев на 1 000 000, в зависимости от региона проживания и этнической группы [2]. В Российской Федерации отсутствуют эпидемиологические данные для оценки распространенности АТ. Между тем, из-за несвоевременной диагностики начало лечения может

быть отсрочено, что может привести к серьезным неблагоприятным сердечно-сосудистым событиям (MACE) и преждевременной смерти, которые можно предотвратить.

Клиническое начало АТ может имитировать широкий спектр заболеваний без классических признаков и симптомов, таких как асимметрия пульса или артериального давления на верхних конечностях, но с выраженной артериальной гипертензией, ухудшением зрения или болью в животе.

Целью исследования было ретроспективно описать клинические проявления лабораторных и рентгенологических

особенностей, течения и исходов АТ у 183 больных, проживающих на территории Среднего Урала.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное когортное исследование включены 183 пациента с верифицированным АТ, наблюдавшихся в Свердловской областной клинической больнице (ОКБ) № 1 в период с 1979 по 2018 г. Среди пациентов были: 139 женщин в возрасте на момент установления заболевания от 9 до 62 лет (средний возраст — 33,5; медиана — 35; 25%–75% — 24–43) и 44 мужчины в возрасте от 12 до 59 лет (средний возраст — 35,18; медиана — 34; 25%–75% — 26,5–42). Длительность заболевания у женщин от 0,6 до 64 лет (в среднем 12,3 года; медиана составила 10 лет (25%–75% — 4–18)), у мужчин — от 0,6 до 32 лет (в среднем 9 лет; медиана у мужчин — 7 лет (25%–75% — 4–14,5)). Длительность от первых симптомов до постановки диагноза

у женщин составляла 0,6–54 года (в среднем 5,7 лет; медиана — 3 года; 25%–75% — 1–7), у мужчин 0,6–33 года (в среднем 6 лет; медиана — 4 года; 25%–75% — 1,5–8) (табл. 1).

Первичный диагноз АТ при анализе медицинских карт верифицировали в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов 1990 г. [3].

По унифицированному протоколу собирали и анализировали демографические данные, клинические и ангиографические особенности и связанные с АТ хирургические вмешательства, результаты лабораторных исследований. Характеристику поражения артерий по данным ангиографии проводили по критериям Moriwaki [4]. Для оценки степени поражения сосудов использовали данные контрастной ангиографии и/или компьютерной томографии (КТ), и/или МРТ-ангиографии, и/или УЗДГ артерий. Различие методов визуализации артерий для оценки локализации и распространенности изменений (стеноз, окклюзия, дилатация, диссекция и др.) было

Таблица 1. Общая характеристика пациентов, страдающих артериитом Такаясу, включенных в ретроспективное исследование

Характеристики	Пациенты когорты		
	Женщины 139 (76%)	Мужчины 44 (24%)	Всего <i>n</i> = 183 (100%)
Возраст на момент установления заболевания, лет, Ме [25%–75%]	35 [24–43]	34 [26,5–42]	35 [24–43]
Длительность заболевания, годы, Ме [25%–75%]	10 [4–18]	7 [4–14,5]	13,5 [6–20]
Длительность от первых симптомов до постановки диагноза, годы, Ме [25%–75%]	3 [1–7]	4 [1,5–8]	3 [1–8]

Таблица 2. Клинические и лабораторные данные пациентов на момент исследования

	Пациенты (<i>n</i> = 183)
Артериальная гипертензия	98 (53%)
Боль, слабость, онемение, асимметрия пульса на верхних конечностях	89 (49%)
Общая слабость	87 (47,5%)
Головные боли	86 (47%)
Лихорадка	65 (35,5%)
Снижение веса	44 (24%)
Перебегающая хромота	40 (22%)
Головокружение	40 (2%)
Разность артериального давления на верхних конечностях более 10 мм рт. ст.	37 (20%)
Хроническая абдоминальная ишемия	36 (20%)
Боли в груди	31 (17%)
Боль, слабость, онемение нижних конечностей	26 (14%)
Одышка	16 (8%)
Артралгии	13 (7%)
Лабораторные данные	
СОЭ (мм/ч), Ме [25%–75%]	18 [6–28]
СРБ (г/л), Ме [25%–75%]	0,3 [0–6]
Лейкоциты (10 ⁹ /л), Ме [25%–75%]	6,2 [4–8,7]
Гемоглобин (г/л), Ме [25%–75%]	119 [97–128]
Тип АТ по	
1	60 (33%)
2a	9 (5%)
2b	1 (0,5%)
3	3 (2%)
4	32 (17%)
5	78 (43%)

Примечание: Ме — медиана; 25% — нижний квартиль; 75% — верхний квартиль.

обусловлено ретроспективным характером исследования и изменением технического обеспечения и клинической практики, произошедшим в течение периода наблюдения. Однако у каждого пациента данные оценки с помощью УЗДГ были подтверждены, как минимум, одним обследованием с применением контрастирования сосудов.

Описание клинических и ангиографических проявлений болезни у других этнических групп получали в результате поиска в базе данных PubMed с помощью ключевых слов «Takayasu's arteritis». Критерии включения для пациентов в этих работах также основаны на рекомендациях ACR 1990 г. и соответствуют критериям, использованным нами [3]: АТ, диагностированный при наличии трех и более следующих симптомов (чувствительность 90%, специфичность 97,8%): возраст начала заболевания до 40 лет, синдром перемежающейся хромоты (слабость и боли в мышцах конечностей при движениях), ослабление пульса на одной или обеих плечевых артериях, разница в показателях уровня артериального давления более 10 мм рт. ст. на плечевых артериях, шум на подключичных артериях или брюшной аорте, изменения при ангиографии (сужение просвета или окклюзия аорты, ее крупных ветвей в проксимальных отделах верхних и нижних конечностей, не связанные с атеросклерозом, фибромускулярной дисплазией, спазмом).

Полученные результаты сопоставляли со справочными данными Elibrary (бесплатный полнотекстовый архив литературы по биомедицинским и естественным наукам на русском языке), использовали ключевые слова «артериит Такаясу» и АТ для получения клинических и ангиографических проявлений заболевания в случаях, зарегистрированных в России [1, 14, 19, 20].

Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали лицензионный программный продукт Statistica 7.0 (Statsoft inc., США). Категориальные переменные анализировали с помощью критерия хи-квадрат. Все статистические тесты были двусторонними и статистически значимыми ($p < 0,05$). Для оценки ряда признаков, влияющих на выживаемость пациентов, страдающих АТ, использовали анализ выживаемости по Каплану–Майеру. Различия между группами оценивали методом логарифмического ранжирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Демографические данные и клинические проявления

На момент обследования наиболее частыми клиническими проявлениями были общая слабость (47,5%), артериальная гипертензия (53%), асимметрия пульса на верхних конечностях (49%), боль, снижение силы, онемение верхних конечностей (49%), головная боль (47%) (табл. 2).

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), уровни С-реактивного белка (СРБ) и высокочувствительного СРБ были повышены (табл. 2). Наиболее частым поражением сосудов было вовлечение дуги аорты, ее основных ветвей, а также поражения брюшной аорты и / или почечных артерий (тип V).

Наиболее часто отмечали вовлечение в патологический процесс подключичной, сонной и почечной артерий. Наиболее типичным видом поражения артерий был стеноз (табл. 3).

Оперативное лечение было проведено 66 (36%) пациентам (23 мужчинам и 43 женщинам). Показаниями к хирургическим вмешательствам были: гемодинамически значимые стенозы, окклюзии и тромбозы пораженных сосудов; артериальная гипертензия, обусловленная стенозом почечных артерий или субтотальным стенозом аорты, наличие симптомов ишемии верхних или нижних конечностей в стадии декомпенсации. Оперативное лечение при аортоартериите можно разделить на две группы: эндоваскулярное (стентирование, протезирование, ангиопластика) и реконструктивные оперативные вмешательства. Кроме того, в одном случае в связи с наличием аневризмы и тромбоза почечных артерий и последующим нефросклерозом была проведена нефрэктомия и аутотрансплантация почки (табл. 4).

В консервативной терапии преобладали монотерапия глюкокортикоидами — 96 (52%) и использование дезагрегантов (аспирин, дипиридамол) — 116 (63%) (табл. 5).

С 1979 по 2018 г. был зафиксирован 31 случай смерти пациентов с АТ (18 мужчин / 13 женщин). Обращает на себя внимание молодой возраст умерших: средний возраст смерти у женщин — 38 лет (Me [25%–75%] — 36 [32–44]) и 49 лет у мужчин (Me [25%–75%] — 50 [40–57]). Средняя продолжительность болезни к моменту смерти с момента установления диагноза составила 9,25 года (6,5 [3–16]) у мужчин и 9 лет (5 [3–10]) у женщин. Данные о причинах смерти были получены из протоколов аутопсий ($n = 22$) и по результатам опроса близких родственников пациентов ($n = 9$) (табл. 6).

Таблица 3. Характеристика поражения артерий при АТ

Вовлеченные артерии	<i>n</i>
Подключичные	101 (55%)
Сонные	98 (53%)
Позвоночная	16 (9%)
Подмышечная	11 (6%)
Плечевая	12 (6,5%)
Легочные	6 (3%)
Коронарные	31 (17%)
Чревной ствол	42 (23%)
Верхняя брыжеечная артерия	45 (25%)
Почечные	77 (42%)
Бедренные	25 (14%)
Подвздошные	33 (18%)
Дуга аорты	39 (21%)
Восходящий отдел грудной аорты	15 (8%)
Нисходящий отдел грудной аорты	9 (5%)
Брюшной отдел аорты	52 (28,4%)
Типы поражения артерий	<i>n</i>
Стеноз	94 (51%)
Стеноз + окклюзия	55 (30%)
Окклюзия / аневризма	2 (1%)
Стеноз / аневризма / окклюзия	7 (4%)
Окклюзия	8 (4%)
Стеноз + коарктация	3 (2%)
Стеноз + аневризма	14 (7,6%)

Таблица 4. Объем хирургических вмешательств при АТ

Оперативное вмешательство	Пациенты (n = 66)
Протезирование аутовеной почечной артерии	4 (6%)
Сонно-подключичное шунтирование	4 (6%)
Аутовенозное протезирование плечевой артерии	1 (1,5%)
Аутовенозная пластика плечевой артерии	1 (1,5%)
Стентирование почечной артерии	13 (20%)
Десцендобифеморальное шунтирование	3 (4,5%)
Торакоабдоминальное шунтирование	2 (3%)
Протезирование чревного ствола, верхней брыжеечной артерии	3 (4,5%)
Тромбэктомия из брюшной аорты	2 (3%)
АББШ	7 (11%)
Ангиопластика почечной артерии	11 (17%)
Стентирование общей сонной артерии	1 (1,5%)
Ангиопластика подключичной артерии	1 (1,5%)
Стентирование подключичной артерии	1 (1,5%)
Тромбэктомия из протезо-подколенного шунта	1 (1,5%)
АББШ + протезирование ПБА справа. Тромбоз АББ протеза / Тромбэктомия из обеих ветвей АББ протеза. Пластика ПБА, ГБА слева с формированием единого устья, протезная профундопластика справа	1 (1,5%)
Дилатация правой почечной артерии	2 (3%)
Аутоперитрансплантация почки	1 (1,5%)
Нефрэктомия	4 (6%)
Тромбэктомия почечной артерии	2 (3%)
Протезирование БЦА	2 (3%)
Эндартерэктомия левой почечной артерии	1 (1,5%)
Подключично-сонный анастомоз	2 (3%)
Эндартерэктомия из чревного ствола	1 (1,5%)
Тромбэктомия из плечевой артерии	1 (1,5%)
Тромбэктомия из ПБА справа	1 (1,5%)
Тромбэктомия из правой ветви протеза	1 (1,5%)
Ампутация бедра	2 (3%)
Ревизия брюшной полости по поводу мезентериального тромбоза	1 (1,5%)
Протезирование инфраренального отдела аорты	1 (1,5%)
Резекция тонкой кишки с анастомозом конец в конец по поводу острого мезентериального тромбоза	1 (1,5%)
Резекция аневризмы брахиоцефального ствола	2 (3%)
Бифуркационное аорто-сонно-брахиоцефальное аллопротезирование	3 (4,5%)
Тромбэктомия из общей сонной артерии	2 (3%)
Резекция брюшной полости, почечных артерий	2 (3%)
Резекция правой половины толстой кишки и терминального отдела подвздошной кишки с наложением еюноперитрансверзоанастомоза по поводу острого мезентериального тромбоза	1 (1,5%)
Тромбэктомия из подвздошно-бедренного сегмента	1 (1,5%)
Имплантация артериовенозного шунта левого предплечья	1 (1,5%)
Аортобикаротидное шунтирование	3 (4,5%)
Торакоабдоминальное протезирование по поводу коарктации аорты	1 (1,5%)
Резекция аневризмы брюшного отдела аорты	1 (1,5%)
Стентирование аорты по поводу коарктации	1 (1,5%)
Резекция аневризмы проксимального анастомоза (подключичной артерии)	1 (1,5%)
Сонно-подключичное протезирование	1 (1,5%)
Аутовенозная пластика подключично-мышечного сегмента	1 (1,5%)
Дилатация плечевой артерии	1 (1,5%)
Подвздошно-бедренное шунтирование	1 (1,5%)
Стентирование коронарных артерий	5 (7,5%)
АМКШ	1 (1,5%)
Стентирование ГБА слева	1 (1,5%)
Линейное подвздошно-бедренное шунтирование слева	1 (1,5%)

Примечание: АББШ — аортобедренное шунтирование; АМКШ — аорто- и маммарокоронарное шунтирование; БЦА — брахиоцефальные артерии; ПБА — поверхностная бедренная артерия; ГБА — глубокая бедренная артерия.

Определенный интерес представляет анализ выживаемости больных АТ (рис. 1). Пятилетняя выживаемость составила 92%; 10-летняя — 90%; 15-летняя — 80% (медиана составила 34 [20–41]).

Всего было зафиксировано 72 сердечно-сосудистых исхода (27 мужчин и 45 женщин). Возраст дебюта заболевания: Ме [25%–75%] — 33 [26–43]. Длительность заболевания до развития события: Ме [25%–75%] — 10 [5–20]. Возраст на момент сосудистых осложнений (MACE) — 38 [30–49,5] (табл. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Артериит Такаюсу — считающееся редким заболевание — изучают во всем мире в связи с высокой социальной и экономической значимостью, обусловленной серьезными сердечно-сосудистыми осложнениями, приводящими к инвалидности и преждевременной смерти молодых людей.

Несмотря на доступность диагностических возможностей, широкий спектр клинических проявлений, низкий уровень знаний врачей общей практики и органов общественного

Таблица 5. Медикаментозное лечение артериита Такаюсу

Вид лекарственной терапии	Пациенты (n = 183)
Монотерапия глюкокортикоидами	96 (52%)
ГКС + цитостатики (циклофосфамид, азатиоприн, гидроксихлорохин или метотрексат)	43 (23%)
Без иммуносупрессивной терапии / или в документации нет данных о полном объеме проводимой терапии	40 (21%)
Генноинженерные биологические препараты	0 (0%)
Деагреганты	116 (63%)
Статины	27 (15%)
Нестероидные противовоспалительные препараты	42 (23%)
Плазмаферез	31 (17%)

Таблица 6. Причины смерти у пациентов с АТ

Причины смерти	Пациенты (n = 31)
Множественные инфаркты головного мозга вследствие прогрессирующей ишемии головного мозга	1 (3%)
Инфаркт головного мозга вследствие тромбоза внутренней сонной артерии	1 (3%)
Крупноочаговая бронхопневмония	1 (3%)
Сердечная декомпенсация вследствие недостаточности аортального клапана с формированием аортального порока	2 (6%)
Массивная кровопотеря вследствие несостоятельности швов сосудистого анастомоза после аутовенозного протезирования почечной артерии	1 (3%)
Абсцедирующая бронхопневмония после аортобикаротидного протезирования, имплантация ЭКС в миокардиальную позицию с последующим реперфузионным повреждением головного мозга	1 (3%)
Инфаркт головного мозга + энцефалопатия после реперфузионного повреждения головного мозга с послеоперационной мозговой комой после аортобикаротидного протезирования	1 (3%)
Послеоперационный сепсис вследствие гнойного медиастинита после формирования подключично-каротидного анастомоза	1 (3%)
Инфаркт головного мозга вследствие тромбоза после резекции аневризмы брахиоцефального сегмента	1 (3%)
Инфаркты головного мозга на фоне прогрессирующей ишемии головного мозга после бифуркационного аорто-каротидного шунтирования	1 (3%)
Гангрена тонкой кишки вследствие ишемии кишечника после бифуркационного аорто-бедренного шунтирования	1 (3%)
Послеоперационный перитонит вследствие несостоятельности швов анастомоза после резекции тонкой кишки по поводу мезентериального тромбоза	2 (6%)
Внутричерепное кровоизлияние вследствие симптоматической артериальной гипертензии	2 (6%)
ТЭЛА вследствие тромбоза глубоких вен нижних конечностей	1 (3%)
ТЭЛА вследствие множественного тромбоза артериального и венозного русла внутренних органов	1 (3%)
Инфаркт головного мозга тромбоза общей сонной артерии	1 (3%)
Массивная кровопотеря вследствие разрыва расслаивающей аневризмы дуги аорты	1 (3%)
Массивная кровопотеря вследствие разрыва расслаивающей аневризмы брюшной аорты	2 (6%)
Острая почечная недостаточность вследствие тромбоза брюшной аорты	1 (3%)
Перитонит вследствие острого мезентериального тромбоза	1 (3%)
Инфаркт миокарда	2 (6%)
Рак печени	1 (3%)
ОНМК (ишемический инсульт)	1 (3%)
Отравление ядом	2 (6%)
Неизвестная причина	2 (6%)

Примечание: ЭКС — электрокардиостимулятор; ТЭЛА — тромбоз легочной артерии; ОНМК — острая недостаточность мозгового кровообращения.

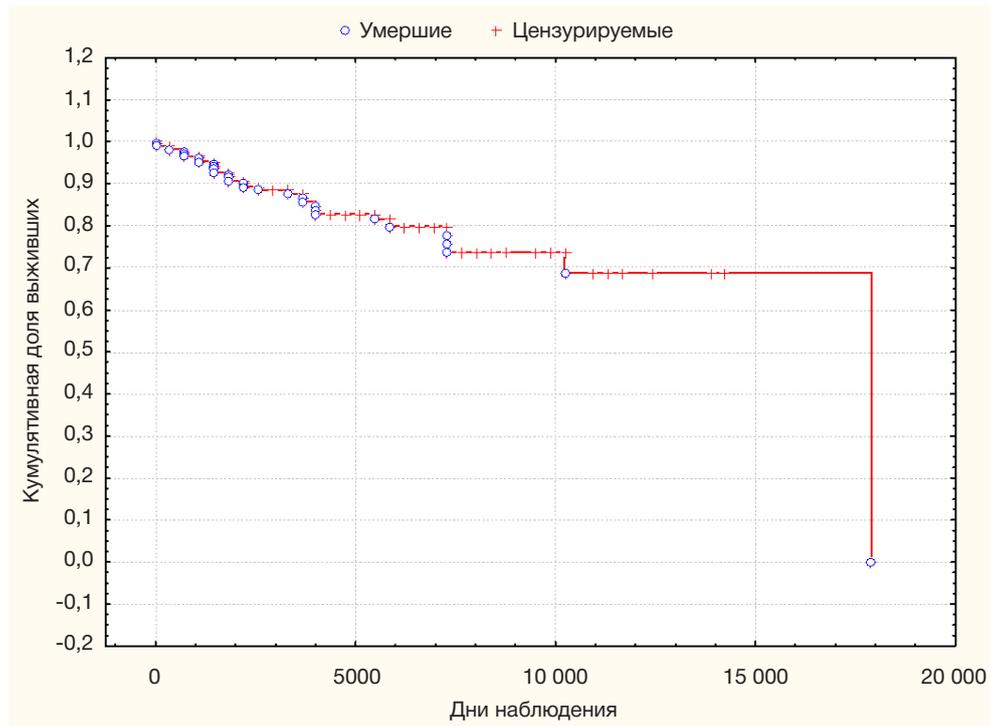


Рис. 1. Выживаемость пациентов с АТ

Таблица 7. Структура сердечно-сосудистых осложнений в когорте

	Пациенты с MACE (n = 72)
Инфаркт миокарда	14 (20%)
Ишемический инсульт	24 (35%)
Транзиторная ишемическая атака	3 (3%)
Гемморагический инсульт	4 (6%)
Тромбоз почечных артерий	5 (7%)
Тромбоз плечевой артерии	2 (3%)
Мезентериальный тромбоз	4 (6%)
Тромбоз лучевой артерии	1 (1,4%)
Тромбоз БЦА ствола	1 (1,4%)
Тромбоз артерии стопы	2 (3%)
Тромбоз подмышечной артерии	1 (1,4%)
Тромбоз инфраренального отдела аорты	1 (1,4%)
Тромбоз брюшной аорты	2 (3%)
Тромбоз сонных артерий	3 (3%)
Тромбоз подключичных артерий	3 (3%)
Тромбоз чревного ствола	1 (1,4%)
Разрыв аневризмы грудного отдела аорты	2 (3%)
Разрыв аневризмы брюшного отдела аорты	1 (1,4%)
Тромбоз аорто-бедренного шунта	6 (8%)
Тромбоземболия легочной артерии	3 (3%)
Тромбоз яремной вены	2 (3%)
Синус-тромбоз	1 (1,4%)
Тромбоз суральных вен	1 (1,4%)
Тромбоз малой подкожной вены	1 (1,4%)
Тромбофлебит глубоких вен голени	1 (1,4%)
Тромбофлебит аортовенозного шунта почечной артерии	1 (1,4%)

Таблица 8. Клинические проявления АТ в различных географических регионах

	Настоящее исследование (n = 183), %	Италия (n = 67), % [9]	Индия (n = 106), % [10]	Бразилия (n = 73), % [11]	Южная Африка (n = 272), % [12]	Япония (n = 84), % [13]	Россия (n = 215), % [14]
Слабость	47,5	Нет данных	Нет данных	Нет данных	10	Нет данных	50
Снижение веса	24	12	9,4	28	Нет данных	5	9
Лихорадка	35,5	39	16	26	10	20	Нет данных
Головная боль	47	33	47	45	Нет данных	Нет данных	50
Головокружение	22	27	Нет данных	29	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Боль, слабость, онемение верхних конечностей	49	52	59	58	12	54	50
Артериальная гипертензия (систолическое 140/90 мм рт. ст., диастолическое 90 мм рт. ст.)	53	46	52	36	77	52	68
Асимметрия пульса на верхних конечностях	49	73	59	85	12	54	50
Разность артериального давления на верхних конечностях 10 мм рт. ст.	20	72	59	85	12	54	50

Таблица 9. Поражения артерий при АТ в различных географических регионах

Артерии	Данное исследование (n = 183), %	Китай (n = 411), % [15]	Корея (n = 20), % [16]	США (n = 126), % [17]	Италия (n = 104), % [9]	Франция (n = 82), % [18]
Подключичные	53	79,8	67,1	6,3	65,6	68,3
Сонные	55	79,1	72,1	50,9	44,3	59,8
Позвоночные	9	28,7	Нет данных	18,5	13	28,0
Легочные	3	68,9	13,4	33,3	Нет данных	Нет данных
Коронарные	17	35,7	63,3	22,2	Нет данных	Нет данных
Брыжеечные	25	29,7	22,8	24,7	31,6	Нет данных
Почечные	42	48,9	32,2	18,7	34,4	14,6
Подвздошные	18	27,2	13,3	13,5	19,7	18,3
Восходящая аорта	8	9,5	47,8	9,1	Нет данных	Нет данных

здравоохранения в отношении АТ могут привести к задержке диагноза или неправильной первоначальной диагностике заболевания.

В уральской выборке 139 из 183 испытуемых составляли женщины (76%), в то время как в других странах соотношение мужчин и женщин с АТ колебалось от 1 : 2,4 до 1 : 8 в Израиле, до 6,9 : 1 в Мексике и 8 : 1 в Японии [5–8]. В настоящем исследовании демографические характеристики, клиническое начало и течение заболевания соответствуют ранее опубликованным данным, сообщающим о молодом возрасте начала АТ [6–12].

Головную боль, артериальную гипертензию (определяемую как систолическое артериальное давление 140 мм рт. ст. и / или диастолическое давление 90 мм рт. ст. и выше) отмечали одинаково часто во всех исследованиях, включая и данную когорту [9–14] (табл. 8).

Наиболее распространенными локализациями поражения артериального бассейна были подключичная, сонная и почечные артерии. Наиболее частым видом поражения был стеноз. Наиболее частым типом АТ был тип V (43%). Также обнаружено, что поражение сонных артерий и подключичной артерии было одинаково частым во всех

исследованиях, включая это. В нашей когорте, как и в других публикациях, отмечено крайне редкое вовлечение позвоночных, легочных, подвздошных артерий. Описан высокий процент поражения восходящей аорты и коронарных артерий у жителей Кореи [9,15–18] (табл. 9).

Согласно данным исследователей Российской Федерации, поражение брахиоцефальных артерий зарегистрировано в 85% случаев, почечной артерии — в 23% случаев [19, 20] (табл. 10).

Наиболее частым типом поражения крупных сосудов во всех исследованиях, кроме сербского, был тип V, а тип III был отмечен как наиболее редкий. Для сербской выборки была характерна высокая частота поражений типа I и типа IIa, в то время как в корейской популяции наиболее распространен тип IIb, а в Индии и Бразилии относительно высока выявляемость поражений IV типа. Вклад в различные клинические проявления АТ могут вносить как генетические, так и экологические факторы (табл. 11) [15–17, 21–24].

Выживаемость пациентов в нашей когорте была схожа с данными предыдущих публикаций [17, 25–27]. Существуют также разные данные с пятилетней и 10-летней

Таблица 10. Поражение артерий при АТ в российской популяции

Артерии	Настоящее исследования (n = 183)	Центральные регионы России [19]	(Североевропейские регионы России) [20]
Подключичная	55	85%	Нет данных
Сонная	53		Нет данных
Позвоночная	9		Нет данных
Легочная	3	Нет данных	Нет данных
Коронарная	17	Нет данных	Нет данных
Брыжеечная	25	Нет данных	Нет данных
Почечная	42	Нет данных	23%
Подвздошная	18	Нет данных	Нет данных
Восходящая аорта	5	Нет данных	Нет данных

Таблица 11. Ангиографические характеристики АТ в различных регионах мира

	Настоящее исследование	Китай [15]	Корея [16]	США [17]	Индия [21]	Мексика [22]	Сербия [23]	Бразилия [24]
Тип I, %	33	22,1	11,1	20	6,9	19	50	11,9
Тип IIa, %	5	3,9	8,6	6	1	3	19	6
Тип IIb, %	0,5	3,9	14,1	7	5,9	4	0	1
Тип III, %	2	2,9	4,0	5	2,9	4	0	9
Тип IV, %	17	6,3	7,6	5	28,4	2	0	27
Тип V, %	43	60,8	54,5	57	54,9	69	31	18

выживаемостью (69 и 36%) [28]. Пятилетняя выживаемость арабского населения составила только 50% [29]. Между тем японские пациенты показали 100%-ю пятилетнюю выживаемость [30].

Для определения распространенности заболевания среди различных этнических групп крайне необходимо ввести общенациональный реестр АТ.

Общенациональный реестр АТ поможет лучше описать представление АТ и клиническое течение, что повысит осведомленность медицинских специалистов об этом заболевании и своевременную его диагностику. Фактическая распространенность АТ может быть значительно выше, чем предполагается из данных литературы. Своевременная диагностика и терапия могут улучшить исходы пациентов с АТ.

Основным ограничением данного исследования является его ретроспективный характер. Ретроспективный характер исследования обуславливает различия в объеме и перечне обследований пациентов в разные годы, а также затрудняет соответствующую интерпретацию данных.

Выводы

Клиническая картина АТ разнообразна. Своевременная диагностика может быть затруднена на «стадии сохранного пульса» из-за формирования коллатерального кровообращения, когда кроме общевоспалительной симптоматики не наблюдаются симптомы, характерные для поражения артерий. Пациенты с АТ должны быть предупреждены о высоком риске сердечно-сосудистых осложнений и контролировать артериальное давление, показатели липидного спектра, свертываемости крови. Своевременная хирургическая коррекция гемодинамически значимых стенозов, окклюзий и тромбозов пораженных сосудов позволяет оптимизировать лечение артериальной гипертензии, ликвидировать симптомы ишемии конечностей и предупредить развитие новых сосудистых осложнений. У большинства пациентов наблюдался генерализованный V тип поражения артерий. Достаточно высокая выживаемость при АТ может быть обусловлена молодым возрастом пациентов и развитием коллатерального кровообращения.

Литература

- Насонов Е. Л. Ревматология: российские клинические рекомендации. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010; 331 с.
- Волосников Д. К., Глазырина Г. А., Серебрякова Е. Н. Неспецифический аортоартериит (артериит Такаюсу) у детей и подростков: обзор литературы и описание случая. Трудный пациент. 2015; 1 (13): 36–9.
- Arend W, Michel B, Bloch D, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum.* 1990; (33): 1129–34.
- Moriwaki R, Noda M, Yajima M, et al. Clinical manifestations of Takayasu arteritis in India and Japan new classification of angiographic findings. *Angiology.* 1997; (48): 369–79.
- Asri A, Tazi-Mezalek Z, Aouni M, et al. Takayasu's disease in Morocco. Report of 47 cases. *Rev Med Interne.* 2002; (23): 9–20.
- Ishikawa K, Maetani S. Long-term outcome for 120 Japanese patients with Takayasu's disease. Clinical and statistical analyses of related prognostic factors. *Circulation.* 1994; (90): 1855–60.
- Toshihiko N. Current status of large and small vessel vasculitis in Japan. *Int J Cardiol.* 1996; (54): 91–8.
- Zheng DY, Liu LS, Fan DJ. Clinical studies in 500 patients with aortoarteritis. *Chin Med J.* 1990; (103): 536–40.
- Vanoli M, Bacchiani G, Origgi L, et al. Takayasu's arteritis: a changing disease. *J Nephrol.* 2001; (14): 497–505.
- Jain S, Kumari S, Ganguly N, et al. Current status of Takayasu arteritis in India. *Int J Cardiol.* 1996; (54): 111–6.
- Sato EL, Hatta FS, Levy-Neto M, et al. Demographic, clinical, and angiographic data of patients with Takayasu arteritis in Brazil. *Int J Cardiol.* 1998; (66): 67–70.

12. Mwiapatayi B, Jaffeiy P. Takayasu arteritis: clinical features and management: report of 272 cases. *ANZ J Surg.* 2005; (75): 110–7.
13. Nakao K, Ikeda M, et al. Takayasu's arteritis: Clinical Report of Eighty-four Cases and Immunological Studies of Seven Cases. *Circulation.* 1967; (35): 1141–55.
14. Арабидзе Г. Г., Абугова С. П., Матвеева Л. С. Клинические аспекты болезни Такаюсу (215 наблюдений). *Тер. архив.* 1980; (5): 124–9.
15. Jing Li, Fei Sun, et al. The clinical characteristics of Chinese TAayasu's arteritis patients: a retrospective study of 411 patients over 24 years. *Arthritis Res Ther.* 2017; (19): 107. DOI: 10.1186/s13075-017-1307-z
16. Lee GY, Jang SY, Ko SM, et al. Cardiovascular manifestations of TAayasu arteritis and their relationship to the disease activity: analysis of 204 Korean patients at a single center. *Int J Cardiol.* 2012; 159 (1): 14–20.
17. Schmidt J, Kermani TA, Bacani AK, et al. Diagnostic features, treatment, and outcomes of Takayasu arteritis in a US cohort of 126 patients. *Mayo Clin Proc.* 2013; 88 (2): 821–30.
18. Arnaud L, Haroche J, Toledano D, et al. Cluster analysis of arterial involvement in Takayasu arteritis reveals symmetric extension of the lesions in paired arterial beds. *Arthritis Rheum.* 2011; 63 (4): 1136–40.
19. Покровский А. В., Зотиков А. Е., Юдин В. И. Неспецифический аортоартериит (болезнь Такаюсу). М.: ИРСИСЪ, 2002.
20. Чихладзе Н. М. Артериальная гипертензия у больных с неспецифическим аортоартериитом. *Системные гипертензии.* 2018; 15 (2): 43–8.
21. Moriwaki R, Noda M, Yajima M, et al. Clinical manifestations of Takayasu arteritis in India and Japan — new classification of angiographic findings. *Angiology.* 1997; 48 (5): 369–79.
22. Soto ME, Espinola N, Flores-Suarez LF, et al. Takayasu arteritis: clinical features in 110 Mexican Mestizo patients and cardiovascular impact on survival and prognosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26 (3 Suppl 49): 9–15.
23. Petrovic-Rackov L, Pejnovic N, Jevtic M, et al. Longitudinal study of 16 patients with Takayasu's arteritis: clinical features and therapeutic management. *Clin Rheumatol.* 2009 Feb; 28 (2): 179–85. DOI: 10.1007/s10067-008-1009-7.
24. Clemente Maria, et al. Brazilian multicenter study of 71 patients with juvenile-onset TAayasu's arteritis: clinical and angiographic features. *Rev Brasil Reumatol.* 2016 Mar; 56 (2): 145–51.
25. Phillip R, Luqmani R. Mortality in systemic vasculitis: a systemic review. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26 (5): 94–104.
26. Balakrishnan KG, Subramanyan R, Joy J. Natural history of aortoarteritis (Takayasu's disease). *Circulation.* 1989; 80 (3): 429–37.
27. Hall S, Barr W, Lie JT, Stanson AW, Kazmier FJ, Hunder GG. Takayasu arteritis. A study of 32 North American patients. *Medicine (Baltimore).* 1985; 64 (2): 89–99.
28. Park MC, Lee SW, Park YB, Chung NS. Clinical characteristics and outcomes of Takayasu's arteritis: analysis of 108 patients using standardized criteria for diagnosis, activity assessment and angiographic classification. *Lee Scand J Rheumatol.* 2005; 34 (4): 284–92.
29. Mustafa K. Takayasu's arteritis in Arabs. *Clin Rheumatol.* 2014 Dec; 33 (12): 1777–83. DOI: 10.1007/s10067-014-2633-z.
30. Ishihara T, Haraguchi G, Kamiishi T, Tezuka D, Inagaki H, Isobe M. Sensitive assessment of activity of Takayasu's arteritis by pentraxin3, a new biomarker. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 57 (16): 1712–3.

References

1. Nasonov EL, Nasonova VA. *Rheumatology. National guidelines.* Moscow, 2010; 539–67.
2. Volosnyakov D, Glazyrina G, Serebryakova E, et al. Nonspecific aortoarteritis (Takayasu arteritis) in children and adolescents: literature review and clinical case. *Difficult patient.* 2015; 1 (13): 36–9.
3. Arend W, Michel B, Bloch D, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum.* 1990; (33): 1129–34.
4. Moriwaki R, Noda M, Yajima M, et al. Clinical manifestations of Takayasu arteritis in India and Japan new classification of angiographic findings. *Angiology.* 1997; (48): 369–79.
5. Asri A, Tazi-Mezalek Z, Aouni M, et al. Takayasu's disease in Morocco. Report of 47 cases. *Rev Med Interne.* 2002; (23): 9–20.
6. Ishikawa K, Maetani S. Long-term outcome for 120 Japanese patients with Takayasu's disease. Clinical and statistical analyses of related prognostic factors. *Circulation.* 1994; (90): 1855–60.
7. Toshihiko N. Current status of large and small vessel vasculitis in Japan. *Int J Cardiol.* 1996; (54): 91–8.
8. Zheng DY, Liu LS, Fan DJ. Clinical studies in 500 patients with aortoarteritis. *Chin Med J.* 1990; (103): 536–40.
9. Vanoli M, Bacchiani G, Origgi L, et al. Takayasu's arteritis: a changing disease. *J Nephrol.* 2001; (14): 497–505.
10. Jain S, Kumari S, Ganguly N, et al. Current status of Takayasu arteritis in India. *Int J Cardiol.* 1996; (54): 111–6.
11. Sato EL, Hatta FS, Levy-Neto M, et al. Demographic, clinical, and angiographic data of patients with Takayasu arteritis in Brazil. *Int J Cardiol.* 1998; (66): 67–70.
12. Mwiapatayi B, Jaffeiy P. Takayasu arteritis: clinical features and management: report of 272 cases. *ANZ J Surg.* 2005; (75): 110–7.
13. Nakao K, Ikeda M, et al. Takayasu's arteritis: Clinical Report of Eighty-four Cases and Immunological Studies of Seven Cases. *Circulation.* 1967; (35): 1141–55.
14. Arabidze G, Abugova SP, et al. Clinical aspects of Takayasu syndrome (215 cases). *Ter Arkh.* 1980; 52 (5): 124–9.
15. Jing Li, Fei Sun, et al. The clinical characteristics of Chinese TAayasu's arteritis patients: a retrospective study of 411 patients over 24 years. *Arthritis Res Ther.* 2017; (19): 107. DOI: 10.1186/s13075-017-1307-z.
16. Lee GY, Jang SY, Ko SM, et al. Cardiovascular manifestations of TAayasu arteritis and their relationship to the disease activity: analysis of 204 Korean patients at a single center. *Int J Cardiol.* 2012; 159 (1): 14–20.
17. Schmidt J, Kermani TA, Bacani AK, et al. Diagnostic features, treatment, and outcomes of Takayasu arteritis in a US cohort of 126 patients. *Mayo Clin Proc.* 2013; 88 (2): 821–30.
18. Arnaud L, Haroche J, Toledano D, et al. Cluster analysis of arterial involvement in Takayasu arteritis reveals symmetric extension of the lesions in paired arterial beds. *Arthritis Rheum.* 2011; 63 (4): 1136–40.
19. Pokrovskij AV, Zotikov AE, Yudin VI. *Nespecificcheskij aortoarteriit (bolezni' Takayasu).* М.: IRIS, 2002.
20. Chikhladze NM. Arterial hypertension in patients with non-specific aortoarteritis. *Systemic Hypertension.* 2018; 15 (2): 43–48. DOI: 10.26442/2075-082X_2018.2.43-48.
21. Moriwaki R, Noda M, Yajima M, et al. Clinical manifestations of Takayasu arteritis in India and Japan—new classification of angiographic findings. *Angiology.* 1997; 48 (5): 369–79.
22. Soto ME, Espinola N, Flores-Suarez LF, et al. Takayasu arteritis: clinical features in 110 Mexican Mestizo patients and cardiovascular impact on survival and prognosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26 (3 Suppl 49): 9–15.
23. Petrovic-Rackov L, Pejnovic N, Jevtic M, et al. Longitudinal study of 16 patients with Takayasu's arteritis: clinical features and therapeutic management. *Clin Rheumatol.* 2009 Feb; 28 (2): 179–85. DOI: 10.1007/s10067-008-1009-7.
24. Clemente Maria, et al. Brazilian multicenter study of 71 patients with juvenile-onset TAayasu's arteritis: clinical and angiographic features. *Rev Brasil Reumatol.* 2016 Mar; 56 (2): 145–51.
25. Phillip R, Luqmani R. Mortality in systemic vasculitis: a systemic review. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26 (5): 94–104.
26. Balakrishnan KG, Subramanyan R, Joy J. Natural history of aortoarteritis (Takayasu's disease). *Circulation.* 1989; 80 (3): 429–37.
27. Hall S, Barr W, Lie JT, Stanson AW, Kazmier FJ, Hunder GG.

- Takayasu arteritis. A study of 32 North American patients. *Medicine (Baltimore)*. 1985; 64 (2): 89–99.
28. Park MC, Lee SW, Park YB, Chung NS. Clinical characteristics and outcomes of Takayasu's arteritis: analysis of 108 patients using standardized criteria for diagnosis, activity assessment and angiographic classification. *Lee Scand J Rheumatol*. 2005; 34 (4): 284–92.
 29. Mustafa K. Takayasu's arteritis in Arabs. *Clin Rheumatol*. 2014 Dec; 33 (12): 1777–83. DOI: 10.1007/s10067-014-2633-z.
 30. Ishihara T, Haraguchi G, Kamiishi T, Tezuka D, Inagaki H, Isobe M. Sensitive assessment of activity of Takayasu's arteritis by pentraxin3, a new biomarker. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57 (16): 1712–3.

ЧАСТОТА НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У ПАЦИЕНТОВ ДНЕВНОГО СТАЦИОНАРА С ПОГРАНИЧНЫМИ ЗНАЧЕНИЯМИ ГЛИКЕМИИ НАТОЩАК И ХОТЯ БЫ ОДНИМ ФАКТОРОМ РИСКА РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

В. В. Боева¹ ✉, Т. А. Боева², А. Н. Завьялов³

¹ Федеральный клинический центр высоких медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, Московская область, городской округ Химки, микрорайон Новогорск, Россия

² Тамбовское областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Тамбовская Центральная районная больница», Тамбовская область, Тамбовский район, с. Покрово-Пригородное, Россия

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

С целью оценки диагностики нарушений углеводного обмена проведено обследование пациентов, поступивших в дневной стационар Тамбовского областного государственного бюджетного учреждения здравоохранения (ТОГ БУЗ) «Тамбовская Центральная районная больница» в период 6 месяцев 2018 г. Проведенное в рамках дневного стационара обследование 91 человека позволило выявить у 31 (34,0%) человека сахарный диабет 2-го типа (СД), у 6 (6,5%) нарушенную гликемию натощак и у 22 (24,1%) нарушенную толерантность к глюкозе. Данное обследование показало необходимость расширения популяции скрининга в группах риска по развитию сахарного диабета 2 типа. Дано обоснование проведения перорального теста толерантности с 75 г глюкозы всем лицам с глюкозой венозной плазмы натощак $\geq 5,6 \leq 6,0$ ммоль/л, имеющим один или более факторы риска развития СД 2 типа и/или метаболический синдром: среди данной категории СД был выявлен в 4,3%, а предиабет — в 14,4% случаев.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, нарушенная гликемия натощак, нарушенная толерантность к глюкозе, скрининг, глюкоза венозной плазмы натощак, предиабет

Информация о вкладе авторов: В. В. Боева — анализ литературы, планирование исследования, анализ и интерпретация данных; Т. А. Боева — анализ литературы, планирование исследования, анализ и сбор данных; А. Н. Завьялов — анализ литературы, анализ и интерпретация данных.

Соблюдение этических стандартов: этический комитет ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России; №176 от 25 июня 2018 г.

✉ **Для корреспонденции:** Валентина Владимировна Боева
ул. Ивановская, д. 3, Новогорск, Московская обл., 141435; BoevaVV@yandex.ru

Статья получена: 20.01.2019 **Статья принята к печати:** 12.03.2019 **Опубликована онлайн:** 15.03.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.014

FREQUENCY OF CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDERS IN DAY-CARE PATIENTS WITH BORDERLINE FASTING BLOOD SUGAR LEVELS AND AT LEAST ONE RISK FACTOR FOR DIABETES MELLITUS

Boeva VV¹ ✉, Boeva TA², Zavyalov AN³

¹ Federal Clinical Centre of High Medical Technologies, Moscow Region, Novogorsk, Russia

² Tambov Central Regional Hospital, Pokrovo Prigorodnoe Rural Settlement, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

In order to assess the diagnosis of carbohydrate metabolism disorders, day care patients from Tambov central regional hospital were investigated. The study was conducted during 6 months in 2018. The study included 91 patients and allowed the diagnosis of type 2 diabetes mellitus (DM) in 31 (34.0%) cases, 6 (6.5%) impaired fasting glucose and 22 (24.1%) impaired glucose tolerance. This survey highlighted the necessity to expand the screening populations at risk for developing type 2 diabetes. The rationale for the 75-gram oral glucose tolerance test for all individuals with fasting plasma glucose $\geq 5.6 \leq 6.0$ mmol/l and having one or more risk factors for developing type 2 diabetes and / or metabolic syndrome is shown. Among these categories diabetes was detected in 4.3%, and prediabetes in 14.4% of cases.

Keywords: diabetes mellitus type 2, impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, screening, fasting venous plasma glucose, prediabetes

Author contribution: all authors participated in conceiving and planning the study, collected and analyzing the data. Boeva VV prepared the study for publication.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian Medical Research Medical University (Protocol 176 dated June 25, 2018). All patients gave informed consent to participate.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valentina V. Boeva
Ivanovskaya 3, Novogorsk, Moscow region, 141435; BoevaVV@yandex.ru

Received: 20.01.2019 **Accepted:** 12.03.2019 **Published online:** 15.03.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.014

Сахарный диабет (СД) является важнейшей медико-социальной проблемой. Число больных СД 2-го типа в мире к концу 2017 г. достигло 425 млн человек, а к 2045 г. эта цифра возрастет до 629 млн человек. Около 212,4 млн жителей планеты имеют недиагностированный СД 2-го типа [1]. По данным Государственного регистра СД, число больных в РФ на январь 2018 г. составило около 4,5 млн человек, среди которых у 4,1 млн был диагностирован СД 2-го типа [2]. Экстраполяция результатов исследования

NATION на всех жителей РФ позволяет предполагать, что около 20,7 млн человек имеют предиабет, а еще 4,2 млн — недиагностированный СД 2-го типа. Таким образом, реальная численность пациентов с СД 2-го типа в РФ составляет не менее 8 млн человек (около 5,5% населения), что вместе с данными о предиабете (около 19,3% населения) представляет значительную угрозу для общественного здоровья и здравоохранения, поскольку не менее 50% остается недиагностированными, а

следовательно, не получают лечения и имеют высокий риск развития осложнений из-за несвоевременной диагностики [3, 4].

Ежегодное увеличение численности больных СД в среднем по России в период с 2007 по 2012 г. составляло 173 640 человек в год, ежегодный прирост — 6,23% [5].

Согласно данным Федерального регистра сахарного диабета на 17 января 2018 г. распространенность СД 2-го типа в Тамбовской области составляет 4044,3 на 100 000 человек, занимая второе место по данному показателю среди 85 субъектов РФ [2]. Это позволяет рассматривать Тамбовскую область в качестве одной из возможных пилотных площадок для углубленного изучения тенденций в эпидемиологии СД 2-го типа в России. Анализ распространенности СД 2-го типа среди взрослого населения Тамбовского района продемонстрировал увеличение этого показателя за период с 2011 по 2018 г. с 1600,6 до 2477,0 на 100 000 человек. Возрастание распространенности СД 2-го типа в области, в первую очередь, связано с увеличением первичной заболеваемости СД 2-го типа с 208,1 до 242,6 [6].

Очевидно, что проблема профилактики и своевременного выявления СД 2-го типа приобретает общегосударственные масштабы, так как распространенность патологии остается достаточно высокой и демонстрирует тенденцию к дальнейшему росту, а проведение скрининга в группах высокого риска на современном этапе недостаточно эффективно. Соответственно, необходим системный популяционный подход, для обеспечения которого требуется расширение программы скрининга и профилактики на федеральном и региональном уровнях.

С 2007 по 2012 г. в РФ действовала подпрограмма «Сахарный диабет» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями». Ее целевыми индикаторами были выбраны продолжительность жизни больных и доля осложнений

при СД, т. е. упор был сделан на вторичную профилактику. Федеральная программа первичной профилактики СД 2-го типа, а значит предотвращения прогрессии предиабета в диабет, отсутствует.

Термин «предиабет» был впервые предложен Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 1965 г. С 1999 г. данный термин или эквивалентный ему — «ранние нарушения углеводного обмена» — предлагается использовать для общего названия двух предшествующих СД состояний — нарушенной гликемии натощак (НГН), нарушенной толерантности к глюкозе (НТГ) и их сочетания, чтобы акцентировать внимание и подчеркнуть высокий риск развития СД 2-го типа в дальнейшем (примерно 4–9% случаев в год) [3, 7].

Тот факт, что не менее 50% пациентов с СД 2-го типа не знают о наличии у них заболевания, может свидетельствовать о недостаточной чувствительности существующих критериев отбора пациентов для скрининга.

Распространенность метаболического синдрома (МС) в общей популяции составляет от 14 до 24% [8]. Среди трудоспособного населения экономически развитых стран симптомокомплекс диагностируют у 20–50% населения [9]. В России МС у лиц в возрасте старше 30 лет диагностируют в 30% случаев, при этом количество больных непрерывно растет [10]. В 90% случаев СД 2-го типа сочетается с абдоминальным ожирением и является клиническим исходом МС.

Таким образом, проблема своевременной диагностики СД 2-го типа представляется чрезвычайно актуальной, поскольку до сих пор, несмотря на увеличение доступности методов диагностики, СД 2-го типа часто выявляется лишь на этапе развития осложнений, т. е. через несколько лет от реального дебюта заболевания. Своевременная диагностика нарушений углеводного обмена в перспективе может снизить распространенность СД 2-го типа, развитие осложнений, инвалидизацию пациентов и, как следствие,

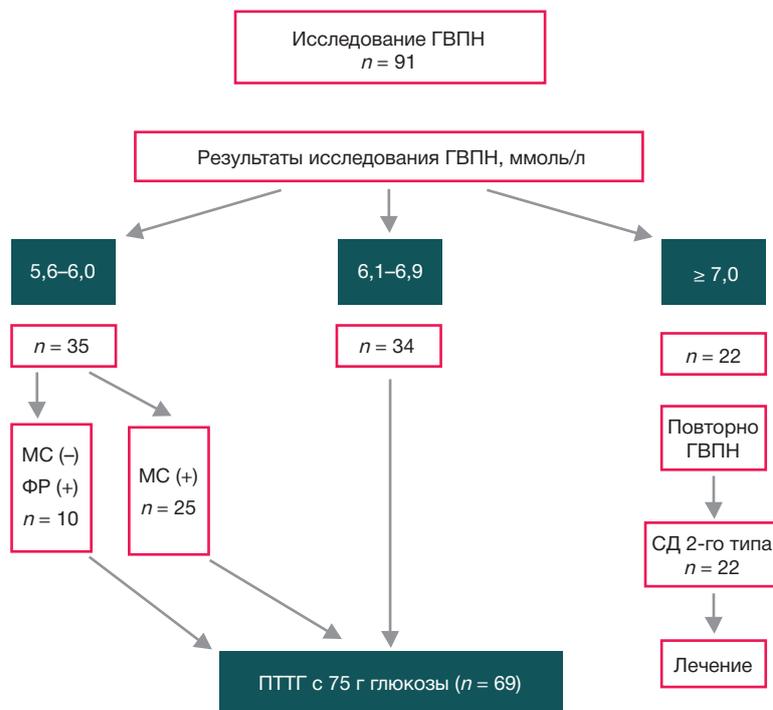


Рис. 1. В исследование были включены 91 пациент, которые были поделены на три группы в зависимости от уровня гликемии. Пациентам с двукратным повышением уровня ГВПН $\geq 7,0$ ммоль/л был выставлен диагноз СД 2-го типа и назначена терапия заболевания. Пациентам с уровнем ГВПН 6,1–6,9 ммоль/л был проведен пероральный тест толерантности к глюкозе (ПТТГ). Пациентам с уровнем ГВПН 5,6–6,0 ммоль/л, имеющим факторы риска развития СД 2-го типа и метаболический синдром, также проведен ПТТГ. ГВПН — глюкоза венозной плазмы натощак

снизить финансовую нагрузку на государственную систему здравоохранения, что является одним из приоритетных направлений ее развития. Поэтому дальнейшие исследования в данной области представляются актуальными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценка методов диагностики нарушений углеводного обмена проведена у 840 пациентов, поступивших в дневной стационар ТОГ БУЗ «Тамбовская Центральная районная больница» в период 6 месяцев 2018 г. В анализ были включены 91 человек (24 мужчины и 67 женщин в возрасте от 32 до 79 лет), удовлетворяющие следующим критериям:

1) Значение глюкозы венозной плазмы натощак (ГВПН) не менее 5,6 ммоль/л.

2) Наличие одного или более факторов риска (ФР) развития СД 2-го типа [1]:

- возраст более 45 лет;
- избыточная масса тела или ожирение ($ИМТ \geq 25 \text{ кг/м}^2$);
- абдоминальное ожирение (окружность талии у мужчин $> 94 \text{ см}$ и у женщин $> 80 \text{ см}$);
- артериальная гипертензия ($АД \geq 140/90 \text{ мм рт. ст.}$ или медикаментозная антигипертензивная терапия);
- гиперхолестеринемия ($ЛПНП \geq 1,8 \text{ ммоль/л}$);
- наличие сердечно-сосудистых заболеваний;
- нарушенная гликемия натощак или нарушенная толерантность к глюкозе в анамнезе;
- отягощенная наследственность по СД.

Данное обследование было одномоментным неинтервенционным когортным наблюдением. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие до начала всех процедур.

Критерии исключения: СД 2-го типа, СД 1-го типа; обострение хронического заболевания, воспалительный процесс, тяжелая сопутствующая патология; $ГВПН < 5,6 \text{ ммоль/л}$.

Одновременно с оценкой факторов риска развития СД 2-го типа, определяли признаки метаболического синдрома. Согласно определению IDF (2005 г.), основными клиническими проявлениями метаболического синдрома у лиц европеоидной расы являются центральное ожирение (окружность талии $> 94 \text{ см}$ у мужчин и $> 80 \text{ см}$ у женщин) и два или более из следующих четырех факторов [11]:

- 1) повышение триглицеридов $> 1,7 \text{ ммоль/л}$ (или гиполипидемическая терапия);
- 2) снижение холестерина липопротеидов высокой плотности $< 1,03 \text{ ммоль/л}$ у мужчин и $< 1,29 \text{ ммоль/л}$ у женщин (или гиполипидемическая терапия);
- 3) повышение артериального давления ($АД \geq 130/85 \text{ мм рт. ст.}$ (или антигипертензивная терапия);
- 4) содержание глюкозы в крови натощак $\geq 5,6 \text{ ммоль/л}$ или диагностированный ранее СД 2-го типа.

Для уточнения состояния углеводного обмена всем пациентам с уровнем ГВПН 5,6–6,0, метаболическим синдромом или хотя бы одним фактором риска СД 2-го типа,

был проведен пероральный тест толерантности к глюкозе (ПТТГ) с 75 г глюкозы. Схема исследования представлена на рис. 1.

Статистическую обработку материалов работы проводили с использованием программы Statistica ver 6,1 (StatSoft; Россия) на персональном компьютере. В связи с тем, что полученные данные не подчинялись закону нормального распределения (анализ проведен методом Колмогорова–Смирнова), использовали методы непараметрической статистики, критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из 91 обследованных нами пациента 22 человека (24,2%) самостоятельно обратились в лечебно-профилактическое учреждение (ЛПУ) в связи с впервые возникшими жалобами на повышенную утомляемость, жажду, сухость во рту, учащенное мочеиспускание, зуд кожных покровов, прибавку веса или нестабильность АД. Диагноз СД 2-го типа был подтвержден у всех 22 человек: 4 мужчин и 18 женщин в возрасте 34–69 лет, у которых при двукратном исследовании уровень ГВПН оказался $\geq 7,0 \text{ ммоль/л}$.

У 35 пациентов (38,4%) уровень ГВПН составил 5,6–6,0, выявлены метаболический синдром и один или более факторов риска СД 2-го типа. У 34 человек (37,3%) уровень ГВПН оказался в пределах 6,1–6,9 ммоль/л, у 33 из 34 (97%) выявлена картина метаболического синдрома. Всем пациентам данных групп был проведен ПТТГ.

Частота нарушений углеводного обмена у пациентов дневного стационара с пограничным значением гликемии натощак и хотя бы одним фактором риска СД 2-го типа составила 64,8% ($n = 59$), из них впервые выявленный СД 2-го типа наблюдался в 34,0% ($n = 31$), а предиабет в 30,7% ($n = 28$) случаев. У лиц с предиабетом преобладала нарушенная толерантность к глюкозе — 24,1% (22 человека).

У всех пациентов с впервые выявленным СД 2-го типа ($n = 31$) был обнаружен метаболический синдром, при этом у 9 человек СД 2-го типа был диагностирован по результатам ПТТГ.

Распределение пациентов в зависимости от степени нарушения углеводного обмена по результатам ПТТГ в группе 35 человек с исходным значением ГВПН 5,6–6,0 ммоль/л представлено на рис. 3.

Распределение пациентов в зависимости от степени нарушения углеводного обмена по результатам ПТТГ в группе из 34 человек с исходным значением ГВПН 6,1–6,9 ммоль/л представлено на рис. 4.

Клинико-демографическая характеристика пациентов в зависимости от степени нарушений углеводного обмена ($n = 91$) представлена в табл. 1.

По данным ПТТГ ($n = 69$), частота встречаемости СД 2-го типа составила 13,0% (9 человек), НТГ была выявлена у 31,8% (22 человек), НГН — у 8,7% (6 человек), нормальная толерантность к глюкозе встречалась в 46,3%

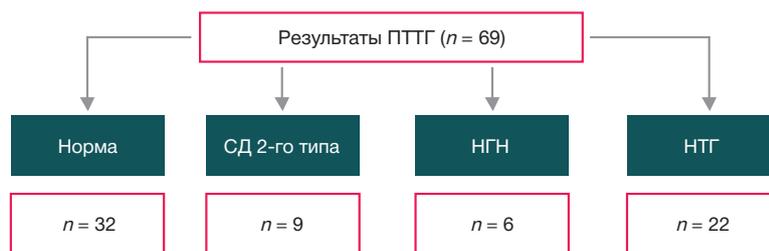


Рис. 2. Распределение пациентов в зависимости от степени нарушения углеводного обмена по результатам ПТТГ. НГН — нарушенная гликемия натощак; НТГ — нарушенная толерантность к глюкозе; ПТТГ — пероральный тест толерантности к глюкозе

(32 человека) случаев (рис. 2). Обращает на себя внимание более низкая частота встречаемости НГН по данным ПТТГ.

Из 9 пациентов с впервые выявленным СД 2-го типа по результатам ПТТГ у 3 человек исходный уровень ГВПН соответствовал диапазону 5,6–6,0 ммоль/л и у 6 пациентов — 6,1–6,9 ммоль/л.

Распределение пациентов в зависимости от степени нарушения углеводного обмена по результатам ПТТГ в группах с исходным значением гликемии натощак, равным 5,6–6,0 ммоль/л ($n = 35$) и 6,1–6,9 ммоль/л ($n = 34$), представлено в табл. 2.

Согласно полученным данным, большую часть пациентов составляли лица старше 45 лет (в 100% случаев в группе НГН и НТГ; в 84,3% и 90,3% — в группах с нормальным углеводным обменом и впервые выявленным СД 2-го типа соответственно). Во всех группах преобладали пациенты с избыточной массой тела или ожирением, а также все пациенты имели увеличенное значение ОТ. Не выявлено достоверных различий по количеству пациентов с отягощенной наследственностью по СД 2-го типа (табл. 1).

Выявлено достоверно большее количество пациентов с артериальной гипертензией в группе с нормальным углеводным обменом и предиабетом в сравнении с группой с впервые выявленным СД 2-го типа ($p < 0,05$).

Достоверных различий по показателям липидного спектра, наличию сопутствующего хронического панкреатита и перенесенных сердечно-сосудистых заболеваний в группах не выявлено ($p > 0,05$).

Следует отметить, что большее количество пациентов, имеющих в анамнезе гипергликемию, отмечено в группе впервые выявленного СД ($p > 0,05$). Причем из 8 человек только у двоих ранее было верифицировано нарушение углеводного обмена и диагностирована нарушенная толерантность к глюкозе. Данные пациенты принимали метформин (не более года) с последующей самостоятельной отменой. Контрольных диагностических тестов с целью уточнения состояния углеводного обмена у остальных пациентов не проводили.

Среди 4 пациентов с НТГ, у которых гипергликемию выявляли в период с 2013 по 2018 г., одна женщина непрерывно принимала метформин в дозе 500 мг в сутки в течение 6 лет. Данное обстоятельство позволило ей сохранить состояние углеводного обмена на стадии предиабета. Ни в одном случае ПТТГ с 75 г глюкозы не был проведен ранее с целью уточнения характера выявленных нарушений углеводного обмена.

У двоих пациентов с НГН в течение последнего года также был выявлен повышенный уровень ГВПН (до 6,5 ммоль/л)

Таблица 1. Сравнительная клиничко-демографическая характеристика пациентов

Оцениваемые параметры	Норма ($n = 32$)	НГН ($n = 6$)	НТГ ($n = 22$)	СД 2-го типа ($n = 31$)
Мужчины	10 (31,2%)	3 (50,0%)	5 (22,7%)	6 (19,3%)
Женщины	22 (68,7%)	3 (50,0%)	17 (77,2%)	25 (80,6%)
Возраст ≥ 45 лет	27 (84,3%)	6 (100%)	22 (100%)	28 (90,3%)
Отягощенная наследственность по СД 2-го типа	2 (6,2%)	1 (16,6%)	6 (27,2%)	7 (22,5%)
ИМТ ≥ 25	30 (93,7%)	6 (100%)	21 (95,4%)	31 (100%)
ОТ > 80 см (Ж)	22 (100%)	3 (100%)	17 (100%)	25 (100%)
ОТ > 94 см (М)	10 (100%)	3 (100%)	5 (100%)	6 (100%)
Артериальная гипертензия	32 (100%)*	6 (100%)	22 (100%)*	25 (80,6%)
Гиперхолестеринемия	21 (65,6%)	6 (100%)	15 (68,1%)	18 (58,0%)
Хронический панкреатит	3 (9,3%)	1 (16,6%)	3 (13,6%)	5 (16,1%)
Наличие сердечно-сосудистых заболеваний:	9 (28,1%)	2 (33,3%)	4 (18,1%)	8 (25,8%)
ОИМ	3 (9,3%)	1 (16,6%)	2 (9,0%)	3 (9,6%)
ОНМК	3 (9,3%)	0 (0%)	1 (4,5%)	0 (0%)
ТИА	1 (3,1%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (6,4%)
Атеросклероз периферических артерий	2 (6,2%)	1 (16,6%)	1 (4,5%)	3 (9,6%)
Гипергликемия в анамнезе	3 (9,3%)	2 (33,3%)	4 (18,1%)	8 (25,8%)

Примечание: * — наличие статистически достоверного различия, $p < 0,05$. ИМТ — индекс массы тела; НГН — нарушенная гликемия натощак; НТГ — нарушенная толерантность к глюкозе; ОИМ — острый инфаркт миокарда; ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения; ОТ — объем талии; ПТТГ — пероральный тест толерантности к глюкозе; ТИА — транзиторная ишемическая атака; СД — сахарный диабет.

Таблица 2. Распределение пациентов в зависимости от степени нарушения углеводного обмена по результатам ПТТГ

Состояние углеводного обмена	$n = 69$		χ^2/ϕ	p
	ГВПН 5,6–6,0	ГВПН 6,1–6,9		
Норма	22 (31,8%)	10 (14,4%)	6,5	0,011*
НГН	2 (2,8%)	4 (5,7%)	0,43	$> 0,05$
НТГ	8 (11,5%)	14 (20,2%)	1,9	0,17
СД	3 (4,3%)	6 (8,6%)	0,3	$> 0,05$

Примечание: * — наличие статистически достоверного различия, $p < 0,05$. ГВПН — глюкоза венозной плазмы натощак; НГН — нарушенная гликемия натощак; НТГ — нарушенная толерантность к глюкозе; ПТТГ — пероральный тест толерантности к глюкозе; СД — сахарный диабет. В группе пациентов с исходным уровнем ГВПН 5,6–6,0 ммоль/л согласно результатам ПТТГ частота случаев с НГН составила 2,8%, НТГ — 11,5% и СД 2-го типа — 4,3%. Таким образом, частота случаев возникновения предиабета составила 14,4%. При сравнении итогов ПТТГ среди пациентов двух групп в зависимости от исходного уровня ГВПН достоверно меньше случаев с НТГ выявлено среди лиц с уровнем ГВПН 6,1–6,9 ммоль/л.

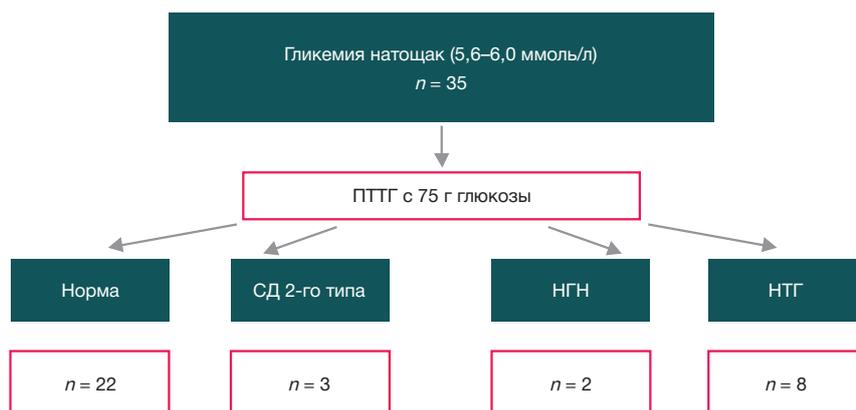


Рис. 3. Распределение пациентов в зависимости от степени нарушения углеводного обмена по результатам ПТТГ в группе из 35 человек с исходным уровнем ГВПН 5,6–6,0 ммоль/л. НГН — нарушенная гликемия натощак; НТГ — нарушенная толерантность к глюкозе; ПТТГ — пероральный тест толерантности к глюкозе



Рис. 4. Распределение пациентов в зависимости от степени нарушения углеводного обмена по результатам ПТТГ в группе из 34 человек с исходным уровнем ГВПН 6,1–6,9 ммоль/л. НГН — нарушенная гликемия натощак; НТГ — нарушенная толерантность к глюкозе; ПТТГ — пероральный тест толерантности к глюкозе

по данным лабораторных исследований, но по этому поводу к эндокринологу пациенты не обращались. ПТТГ был проведен во время госпитализации в дневной стационар по поводу дестабилизации значений АД.

Все пациенты с нарушениями углеводного обмена были осмотрены эндокринологом. Пациентам с впервые выявленным СД 2-го типа была назначена соответствующая сахароснижающая терапия.

Пациентам с НГН и НТГ с целью профилактики развития СД 2-го типа был назначен метформин в стартовой дозе 500 мг на ночь и даны рекомендации по самоконтролю уровня гликемии в домашних условиях. В случае нормогликемии было рекомендовано проведение контрольного ретеста через год, при повышении уровня гликемии — обращение к эндокринологу с целью коррекции медикаментозной терапии.

Лицам с нормальной толерантностью к глюкозе с учетом наличия факторов риска развития СД 2-го типа были даны рекомендации по правильному гипокалорийному питанию, снижению веса, приему гипотензивных препаратов при артериальной гипертензии и статинов в случае дислипидемии.

Таким образом, проведение ПТТГ у пациентов с уровнем ГВПН 5,6–6,0 ммоль/л, имеющих факторы риска развития СД и/или метаболический синдром, является актуальным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании с участием 91 пациента дневного стационара с пограничным значением гликемии натощак и хотя бы одним фактором риска СД 2-го типа частота случаев впервые

выявленного СД 2-го типа составила 34,0% ($n = 31$), НГН — 6,5% ($n = 6$), НТГ — 24,1% ($n = 22$). Нормальная толерантность к глюкозе диагностирована в 35,1% ($n = 32$) случаев.

Согласно исследованию NATION около 21 млн жителей РФ в возрасте 20–79 лет имеют предиабет, а еще 4,2 млн — недиагностированный СД 2-го типа [3]. В данном исследовании в качестве диагностического критерия использовали анализ на гликированный гемоглобин. Такой подход является альтернативой [12] по отношению к использованному в данном исследовании, имеет свои преимущества (более высокую специфичность для выявления СД 2-го типа) и недостатки (более низкую специфичность для выявления предиабета) [13,14].

Тот факт, что не менее 50% пациентов с СД 2-го типа не знают о наличии у них заболевания, может свидетельствовать о недостаточной чувствительности принятых в РФ критериев отбора пациентов для скрининга. Определение группы риска СД 2-го типа в разных странах значительно отличается. В частности, Канадская диабетологическая ассоциация (CDA) указывает на необходимость проведения скрининга на СД 2-го типа у всех пациентов старше 40 лет вне зависимости от наличия у них факторов риска [15]. Американская диабетологическая ассоциация (ADA) определяет среди критериев для скрининга возраст старше 45 лет вне зависимости от наличия факторов риска, либо возраст моложе 45 лет + наличие определенных факторов риска [16]. Европейские клинические рекомендации предлагают использовать расчет риска СД 2-го типа по опроснику (калькулятору риска) и последующее

проведение скрининга в популяциях среднего и высокого риска, исходя из результата заполнения опросника [17]. Столь существенное различие рекомендаций связано с экономическими и эпидемиологическими причинами.

Проведенное нами исследование показало необходимость расширения популяции скрининга в группах риска по развитию СД 2-го типа. Дано обоснование проведения ПТТГ с 75 г глюкозы всем лицам с уровнем ГВПН 5,6–6,0 ммоль/л, имеющим один или более фактор риска развития СД 2-го типа и/или метаболический синдром: среди данной категории СД был выявлен в 4,3%, а предиабет — в 14,4% случаев. Ранняя диагностика начальных нарушений углеводного обмена и своевременная медикаментозная профилактика позволяют предотвратить конверсию предиабета в СД 2-го типа. Своевременное выявление СД 2-го типа и, соответственно, назначенное лечение помогут предупредить развитие осложнений.

ВЫВОДЫ

1) Проведенный скрининг состояния углеводного обмена у пациентов с пограничными значениями гликемии натощак в условиях дневного стационара продемонстрировал, что реальная распространенность СД 2-го типа в 3 раза превышает регистрируемую. 2) Необходимо проводить скрининг нарушений углеводного обмена среди пациентов групп риска по развитию СД 2-го типа с использованием анализа на ГВПН, в том числе при отсутствии у данных пациентов клинических проявлений диабета. 3) С целью уточнения состояния углеводного обмена проведение ПТТГ с 75 г глюкозы оправдано у всех лиц с метаболическим синдромом и/или наличием одного или более фактора риска развития СД 2-го типа, имеющих уровень ГВПН от 5,6 до 6,0 ммоль/л помимо традиционного показателя лицам с уровнем ГВПН от 6,1 до 6,9 ммоль/л.

Литература

- International Diabetes Federation. Diabetes Atlas, 8th ed, 2017.
- Государственный регистр сахарного диабета. Профессиональный всероссийский ресурс по нозологиям диабета под эгидой Эндокринологического Научного Центра. Доступно по ссылке: <http://diaregistry.ru/content/o-proekte.html#content>. Проверено 28.11.18.
- Дедов И. И., Шестакова М. В., редакторы. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. 8-е издание. М., 2017.
- Дедов И. И., Шестакова М. В., Галстян Г. Р. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование NATION). Сахарный диабет. 2016; 19 (2): 104–12.
- Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 гг». Под ред. Дедова И. И., Шестаковой М. В. Сахарный диабет. 2013; Спецвыпуск 2S: 2–48.
- Тамбовское областное государственное бюджетное учреждение «Центр материально-технического обеспечения деятельности учреждений здравоохранения». Форма №12. Приказ Росстата: Об утверждении формы от 21.07.2016; № 355.
- Стародубова А. В., Червякова Ю. В., Копелев А. А., Алиева А. М. Возможности медикаментозной коррекции метаболических нарушений и профилактики сахарного диабета при нарушениях углеводного обмена. Лечебное дело. 2015; (3): 59–65.
- van Vliet-Ostapchouk J, Nuotio M, Slagter S, Doiron D, Fischer K, Foco L, et al. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. BMC Endocrine Disorders. 2014; 14 (1), 9.
- Симоненко В. Б., Медведев И. М., Толмачев В. В. Патогенетические аспекты артериальной гипертензии при метаболическом синдроме. Клиническая медицина. 2011; 89 (1): 49–51.
- Ивашкин В. Т., Драпкина О. М., Корнеева О. Н. Клинические варианты метаболического синдрома. М.: Медицинское информационное агентство, 2011; с. 220.
- Международная Федерация диабета (IDF): консенсус по критериям метаболического синдрома. Ожирение и метаболизм. 2005; (3): 47–9.
- Khetan A, Rajagopalan S, Prediabetes. Can J Cardiol. 2018 May; 34 (5): 615–23.
- Yan S. et al. Diagnostic accuracy of HbA1c in diabetes between Eastern and Western. Eur J Clin Invest. 2013 Jul; 43 (7): 716–26.
- Barry E. Efficacy and effectiveness of screen and treat policies in prevention of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of screening tests and interventions. BMJ. 2017 Jan; 4; 356: i6538.
- Goldenberg R, Punthakee Z. Canadian Diabetes Association 2013 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada: definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. Can J Diabetes. 2013; 37.
- Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care 2017; (40): 11–24.
- ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the task force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society Of Cardiology (ESC) and Developed in Collaboration With The European Association For The Study Of Diabetes (EASD). Eur Heart J. 2013; (34): 3035–87.

References

- International Diabetes Federation. Diabetes Atlas, 8th ed, 2017.
- State Diabetes Register. Professional All-Russian Resource on Diabetes Nosology under the auspices of Endocrinology Research Center/ <http://diaregistry.ru/content/o-proekte.html#content> Verified on May 28, 2018.
- Dedov II, Shestakova MV, editors. Algorithms of Specialized Medical Care for Diabetes Mellitus Patients. 8-th Edition. Moscow, 2017.
- Dedov II, Shestakova MV, Galstyan GR. Prevalence of Type 2 Diabetes Mellitus in Adult Russian Population (NATION study). Diabetes Mellitus. 2016; 19 (2): 104–112.
- Results of implementation of the subprogramme «Diabetes Mellitus» of the Federal Target Program «Prevention and Control of Socially Significant Diseases in 2007–2012». Edited by Dedov II, Shestakova MV. Diabetes Mellitus. 2013; Special edition 2S: 2–48.
- Tambov Regional State Budgetary Establishment «Technical and Material Support Center of Healthcare Institutions Activities». Form No. 12. Order of the Federal State Statistics Service: On form approval dated 2016 July 21; 355.
- Starodubova AV., Chervyakova YuV., Kopelev AA., Alieva AM.

- Possibilities of Drug Correction of Metabolic Disorders and Prevention of Diabetes Mellitus in Case of Carbohydrate Metabolism Disorder. *General Medicine*. 2015; (3): 59–65.
8. van Vliet-Ostapchouk J, Nuotio M, Slagter S, Doiron D, Fischer K, Foco L, et al. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocrine Disorders*. 2014; 14 (1): 9.
 9. Simonenko VB, Medvedev IM, Tolmachev VV. Patogeneticheskie aspekty arterial'noj gipertenzii pri metabolicheskom sindrome/ *Klinich. medicina*. 2011; 89 (1): 49–51.
 10. Ivashkin VT, Drapkina OM, Korneeva ON. Klinicheskie varianty metabolicheskogo sindroma. M: Medicinskoe informacionnoe agentstvo. 2011; 220.
 11. International Diabetes Federation (IDF): Consensus on the Criteria of Metabolic Syndrome. *Obesity and Metabolism*. 2005; (3): 47–9.
 12. Khetan A, Rajagopalan S, Prediabetes, *Can J Cardiol*. 2018 May; 34(5): 615–23.
 13. Yan S, et al. Diagnostic accuracy of HbA1c in diabetes between Eastern and Western. *Eur J Clin Invest*. 2013 Jul; 43(7): 716–26.
 14. Barry E. Efficacy and effectiveness of screen and treat policies in prevention of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of screening tests and interventions. *BMJ*. 2017 Jan; 4; 356: i6538.
 15. Goldenberg R, Punthakee Z. Canadian Diabetes Association 2013 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada: definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Can J Diabetes*. 2013; 37.
 16. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2017; (40): 11–24.
 17. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the task force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society Of Cardiology (ESC) and Developed in Collaboration With The European Association For The Study Of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013; (34): 3035–87.

В журнале Вестник РГМУ (июль–август 2018/04, с. 5–21) были допущены ошибки в статье:

НАДЛЕЖАЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ БИОБЕЗОПАСНОСТИ КАК СРЕДСТВО СНИЖЕНИЯ УЯЗВИМОСТИ ОБЩЕСТВА, ЭКОНОМИКИ И ГОСУДАРСТВА ПЕРЕД БИОГЕННЫМИ УГРОЗАМИ

В. А. Гуцин, В. А. Мануйлов, В. В. Макаров, А. П. Ткачук

✉ Для корреспонденции: Владимир Алексеевич Гуцин
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; wowaniada@gmail.com

Статья получена: 30.09.2018 Статья принята к печати: 14.10.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.054

Редакция просит учесть следующие изменения:

	Напечатано:	Должно быть:
с. 5, пункт «Финансирование»	Статья подготовлена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках программы «Национальная система химической и биологической безопасности 2015–2020» и Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.	Статья подготовлена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.
с. 5, пункт «Funding»	This work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation as part of the project The National System for Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015–2020) and by the Ministry of Education and Science as part of the project RFMEFI60117X0018.	This work was supported by the Ministry of Education and Science within the framework of the project RFMEFI60117X0018.

В журнале Вестник РГМУ (июль–август 2018/04, с. 29–36) были допущены ошибки в статье:

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ АЭРОЗОЛЬНЫЙ ПРОБООТБОРНИК С РЕЦИРКУЛЯЦИЕЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫМ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ

А. Э. Акмалов, Г. Е. Котковский, С. В. Столяров, Б. И. Вердиев, Р. С. Овчинников, А. А. Почтовый, А. П. Ткачук, А. А. Чистяков

✉ Для корреспонденции: Геннадий Евгеньевич Котковский
Каширское шоссе, 31, г. Москва, 115409; geko@mail.ru

Статья получена: 27.07.2018 Статья принята к печати: 23.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.049

Редакция просит учесть следующие изменения:

	Напечатано:	Должно быть:
с. 29, пункт «Финансирование»	Федеральная целевая программа «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 г.)», государственный контракт №К-27-НИР/148-2 между Министерством здравоохранения Российской Федерации и Национальным исследовательским ядерным университетом «МИФИ»	Статья подготовлена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.
с. 29, пункт «Funding»	This work was supported by the Federal Target Program The National System for Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015-2020), the state contract No. K-27-НИР/148-2 signed by the Ministry of Healthcare of the Russian Federation and the National Research Nuclear University MEPhI.	This work was supported by the Ministry of Education and Science within the framework of the project RFMEFI60117X0018.

В журнале Вестник РГМУ (июль–август 2018/04, с. 37–44) были допущены ошибки в статье:

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО СТЕНДА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АЭРОЗОЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ В КОНТРОЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ

Д. А. Клейменов, Б. И. Вердиев, А. А. Ененко, В. А. Гущин, А. П. Ткачук

✉ Для корреспонденции: Денис Александрович Клейменов
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; 10000let@rambler.ru, denis.a.kleyменов@gamaleya.org

Статья получена: 06.08.2018 Статья принята к печати: 31.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.053

Редакция просит учесть следующие изменения:

	Напечатано:	Должно быть:
с. 37, пункт «Финансирование»	Статья подготовлена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках программы «Национальная система химической и биологической безопасности 2015–2020» и Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.	Статья подготовлена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта RFMEFI60117X0018.
с. 37, пункт «Funding»	This work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation as part of the project The National System for Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015–2020) and by the Ministry of Education and Science as part of the project RFMEFI60117X0018.	This work was supported by the Ministry of Education and Science within the framework of the project RFMEFI60117X0018.