

Перспективы использования препаратов наноструктурированного серебра для борьбы с инфекционными заболеваниями, включая COVID-19

В.А. Бурмистров¹, Н.Е. Богданчикова², А.О. Гюсан³, Б.Б. Ураскулова³,
О. Альманса-Рейес⁴, М. Альварado-Вера⁴, И. Пласенсия-Лопес⁵, А.Н. Пестряков⁶,
Л.Н. Рачковская⁷, А.Ю. Летягин⁷

¹ ООО Научно-производственный центр «Вектор-Вита»
630098, г. Новосибирск, ул. Приморская, 33, оф. 212

² Центр нанонаук и нанотехнологий Мексиканского Национального автономного университета
Мексика, 22860, г. Энсенада, ш. Тихуана-Энсенада, 107 км

³ Медицинский институт Северо-Кавказской государственной академии
369000, г. Черкесск, ул. Ставропольская, 36

⁴ Научно-производственный центр «Бионаг С. А. П. И. де С. В.»
Мексика, 22427, г. Тихуана, Университет Отай, ул. Технологическая, 817-1

⁵ Автономный университет Нижней Калифорнии
Мексика, 22427, г. Тихуана, ул. Университетская, 14418

⁶ Томский политехнический университет
634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

⁷ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Резюме

Продолжающаяся пандемия COVID-19 высветила значительные бреши в защите от инфекций. Существует реальная и достаточно высокая вероятность возникновения новых инфекций, представляющих опасность для человека. Для борьбы (профилактика и лечение) с ними необходимы препараты нового типа, отличающиеся по механизму действия от существующих антимикробных средств и вакцин и таким образом дополняющие их. Такие препараты должны обладать комплексной универсальной активностью в отношении болезнетворных микроорганизмов независимо от их вида (бактерии, вирусы, грибы, простейшие) и в целом повышать устойчивость макроорганизма к инфицированию болезнетворными агентами, стимулировать неспецифический иммунитет, как общий, так и местный. В этом плане перспективны препараты наноструктурированного серебра. Свойства наночастиц серебра зависят от их строения, формы, размера, морфологии, лигандного окружения и способа получения. Арговит представляет собой препарат наносеребра с оптимизированными биохимическими и токсикологическими характеристиками. Эффективность арговита для борьбы с инфекционными возбудителями показана в разных областях медицины: кишечные инфекции различной этиологии, острые респираторно-вирусные инфекции и связанные с ними бактериальные осложнения, гнойная хирургия, диабетическая стопа, лекарственно устойчивые формы туберкулеза, вирусные инфекции, обусловленные как ДНК-, так и РНК-содержащими вирусами. В клинике на волонтерах показана эффективность применения данного препарата для защиты от инфицирования коронавирусом и для лечения ранних стадий COVID-19.

Ключевые слова: серебряные наночастицы, коронавирус, инфекционные заболевания, COVID-19.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Рачковская Л.Н., e-mail: noolit@niikel.ru

Для цитирования: Бурмистров В.А., Богданчикова Н.Е., Гюсан А.О., Ураскулова Б.Б., Альманса-Рейес О., Альварado-Вера М., Пласенсия-Лопес И., Пестряков А.Н., Рачковская Л.Н., Летягин А.Ю. Перспективы использования препаратов наноструктурированного серебра для борьбы с инфекционными заболеваниями, включая COVID-19. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 4–15. doi: 10.18699/SSMJ20210501

Prospects for the use of nanostructured silver preparations for the control of infectious diseases, including COVID-19

V.A. Burmistrov¹, N.E. Bogdanchikova², A.O. Gyusan³, B.B. Uraskulova³,
H. Almanza-Reyes⁴, M. Alvarado-Vera⁴, I. Plascencia-Lopez⁵, A.N. Pestryakov⁶,
L.N. Rachkovskaya⁷, A.Yu. Letyagin⁷

¹ LLC Research and Production Center «Vector-Vita»

630098, Novosibirsk, Primorskaya str., 33, of. 212

² Center of Nanosciences and Nanotechnology, National Autonomous University of Mexico
Mexico, 22860, Ensenada, km 107 Carretera Tijuana-Ensenada

³ Medical Institute of the North Caucasus State Academy

369000, Cherkessk, Stavropol str., 36

⁴ Investigation and Production Center «Bionag S.A.P.I. de C.V.»

Mexico, 22427, Tijuana, University Otay, Technological str., 817-1

⁵ Autonomous University of Baja California

Mexico, 22427, Tijuana, University str., 14418

⁶ Tomsk Polytechnic University

634050, г. Томск, Lenin ave., 30

⁷ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and
Genetics of SB RAS

630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

Abstract

The ongoing COVID-19 pandemic has highlighted significant gaps in human protection from infection. There is a real and fairly high probability of new infections that pose a danger to humans. To combat (prevention and treatment) this kind of infections, new types of drugs are needed, which differ in their mechanism of action from existing antimicrobial agents and vaccines, and thus complement them. These drugs should have complex universal activity against pathogens, regardless of their type (bacteria, viruses, fungi, protozoa) and, in general, increase the resistance of the macroorganism to infection by pathogenic agents, stimulate nonspecific immunity, both general and local. In this regard, preparations of nanostructured silver are promising. The properties of silver nanoparticles depend on their structure, shape, size, morphology, ligand environment and preparation method. Argovit represents nanosilver formulation with optimized biochemical and toxicological characteristics. Argovit effectiveness for combating infectious pathogens in various fields of medicine was shown for: intestinal infections of various etiologies; acute respiratory viral infections and associated bacterial complications; purulent surgery, diabetic foot; drug resistant forms of tuberculosis; viral infections caused by both DNA and RNA viruses. In the clinic, argovit effectiveness in protection from coronavirus infection and for treatment of the early stages of COVID-19 disease on volunteers was shown.

Key words: silver nanoparticles, coronavirus, infectious diseases, COVID-19.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Rachkovskaya L.N., e-mail: noolit@niikel.ru

Citation: Burmistrov V.A., Bogdanchikova N.E., Gyusan A.O., Uraskulova B.B., Almanza-Reyes H., Alvarado-Vera M., Plascencia-Lopez I., Pestryakov A.N., Rachkovskaya L.N., Letyagin A.Yu. Prospects for the use of nanostructured silver preparations for the control of infectious diseases, including COVID-19. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 4–15. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210501

Введение

Продолжающаяся пандемия COVID-19 высветила значительные бреши в защите человека от инфекции. Экономике всех стран нанесен колоссальный ущерб. Но главное, погибли и продолжают гибнуть люди. О возможности появления

такого рода пандемии предупреждали ученые [1], но на предупреждения не было обращено должного внимания. Дело в том, что окружающий нас животный, а также растительный и водный миры по существу являются естественными резервуарами, в которых циркулирует огромное количество вирусов, бактерий и других микро-

организмов, значительная часть которых еще не исследована и даже не открыта. Доля известных видов вирусов составляет не более 4 % от общего оцениваемого их количества, доля известных бактерий – не более 12 % [1]. Жизненный цикл вирусов и бактерий, составляющий часы и дни, гораздо короче, чем жизненные циклы животных и человека (годы, десятилетия). Для бактерий и вирусов возможна реализация горизонтального переноса генов. Другими словами, изменчивость и обусловленная ею эволюция на уровне микроорганизмов идут гораздо более быстрыми темпами, чем на уровне макроорганизмов. Появляются новые виды инфекционных агентов или новые штаммы известных возбудителей с новыми свойствами. Периодически из этого огромного животного и растительного резервуара вирусов и бактерий новые виды и штаммы попадают в человеческую популяцию.

В зависимости от вирулентности (болезнетворности) и контагиозности (заразности) и других свойств новых возбудителей последствия такого проникновения для человеческой популяции могут быть совершенно непредсказуемыми и тяжелыми. Яркий пример этому – пандемия COVID-19. Примеры из недалекого прошлого: вирус иммунодефицита человека ВИЧ, ведущий свое происхождение от обезьяньего ретровируса; геморрагическая лихорадка Эбола; атипичная пневмония; птичий и свиной гриппы; MERS (ближневосточный респираторный синдром) и SARS (тяжелый острый респираторный синдром), вызываемые различными штаммами коронавируса. Коронавирусные инфекции хорошо известны ветеринарам, и до недавнего времени они были распространены в основном только среди животных и птиц. Так, типичным примером кишечной формы коронавирусной инфекции является трансмиссивный гастроэнтерит, представляющий опасность для поросят, телят и другого молодняка животных, примером легочной формы – инфекционный бронхит у кур. В результате мутации коронавирус приобрел тропность к тканям органов (бронхам и легким) человека, а также повышенную контагиозность и вирулентность. В результате возникла проблема COVID-19. Эволюция коронавируса идет быстрыми темпами уже в человеческой популяции, появились «английский», «бразильский», «южноафриканский», «индийский» варианты, и неизбежно будут появляться другие штаммы коронавируса.

В целом существует реальная и достаточно высокая вероятность возникновения новых инфекций, представляющих повышенную опасность для человека. Их предшественники, как правило, циркулируют среди животных и птиц.

Высокая контагиозность новых инфекционных возбудителей значительно повышает риск возникновения эпидемий и мировых пандемий. Рост населения, его скученность в больших городах, постоянная миграция, туризм, деловые поездки – все это также повышает вероятность быстрого распространения инфекций. Рекомендуются меры по ограничению распространения инфекций – карантин, самоизоляция, социальная дистанция, маски, перчатки, антисептики и тому подобное – явно недостаточны. Для создания и организации производства вакцин нужно время, а инфекция распространяется быстро, и за время создания вакцины из локального очага она может перерасти в эпидемию или даже пандемию. Случай с коронавирусной инфекцией показал, что имеющиеся противовирусные препараты (РНКазы, реафероны, индукторы интерферонов, ингибиторы репликации вирусов и т.д.) недостаточны для обеспечения должного уровня защиты и лечения.

Для борьбы (профилактики и лечения) с такого рода инфекциями необходимы препараты нового типа, отличающиеся по механизму действия от существующих антимикробных средств и таким образом дополняющие их. Эти препараты должны обладать комплексной антибактериальной, противовирусной и фунгицидной активностью, оказывать противовоспалительное действие и в целом повышать устойчивость организма к инфицированию болезнетворными агентами, т.е. стимулировать неспецифический иммунитет, как общий, так и местный (в частности, лизоцимную активность). В этом плане перспективны препараты наноструктурированного серебра (наносеребра), получаемые с использованием современных нанотехнологий.

Цель данной обзорной работы – показать возможности современных препаратов наноструктурированного серебра (наносеребра, биосеребра) при их использовании в борьбе с инфекционными заболеваниями, включая новые и вновь возникающие инфекции.

Отражением важности данной работы является огромный рост публикаций по этой тематике. На запрос по «серебряным наночастицам» русскоязычный интернет выдает свыше 400 тысяч ссылок, англоязычный – более 30 млн ссылок. На первый взгляд опубликованная информация противоречивая, одни авторы отмечают высокую эффективность и безопасность препаратов наносеребра, другие исследователи обращают внимание на их возможную токсичность или малую эффективность. Но при критическом анализе опубликованных статей становится ясно, что в разных исследованиях использовались разные препа-

раты серебра, и все это лишь означает, что одни из них токсичны и малоэффективны, а другие не токсичны и эффективны. Углубленное изучение показывает, что такая разноречивость связана с технологическими особенностями получения серебросодержащих препаратов, обуславливающими разнообразие физико-химических свойств, в том числе и каталитических (селективность, активность кластеров серебра) [1].

По существу, наносеребро – это групповое название класса препаратов, подобно тому, как, например, пептиды – групповое название препаратов фрагментов белков. Многие разработчики и исследователи наносеребра совершают методологическую ошибку, полагая, что все его препараты аналогичны (имеют чуть ли не одинаковую химическую формулу) и должны обладать примерно одинаковыми свойствами независимо от способа получения, состава и состояния, размера, морфологии и лигандного окружения кластерных частиц, а биохимическое действие наносеребра сводится к антисептическому токсическому действию ионов серебра. В реальности ситуация намного сложнее.

Наночастицы серебра проявляют биотические свойства, участвуя в качестве катализаторов в биохимических и физиологических процессах организма, в частности окислительно-восстановительных реакциях (антиоксидантное и прооксидантное действие), а также предположительно в синтезе оксида азота (NO – важнейший регулятор и медиатор во многих процессах в нервной, иммунной и сердечно-сосудистой системах). В качестве примера неожиданных свойств наносеребра можно отметить данные по повышению в 1,5 раза рождаемости лабораторных животных (мышей) при длительном приеме его препарата [2].

Суть нанотехнологий можно выразить возможностью сборки структур буквально по атому, по молекуле. Из одного и того же набора атомов и молекул можно создать достаточно большое количество разных структур, которые, соответственно, будут проявлять и разные свойства. Задача – создать стабильную структуру с нужными свойствами. В качестве иллюстрации важности технологии получения наносеребра (и, соответственно, получаемой наноструктуры) отметим работу [3], в которой проведено сравнение цитотоксичности и генотоксичности по отношению к лимфоцитам человека двух препаратов наносеребра, стабилизированных поливинилпирролидоном, но полученных разными способами. Несмотря на практически одинаковый химический нетто-состав, отмечена разница между соединениями по токсичности в десятки раз. Понятно, что в качестве кандидатов в лекарственные препараты в первую

очередь должны отбираться нетоксические и безопасные субстанции наносеребра.

Поскольку в зависимости от способа получения препараты наносеребра могут значительно различаться между собой по токсикологическим показателям и эффективности, то каждый препарат, претендующий на лекарство, должен иметь свою собственную научно-доказательную базу (досье) по безопасности и эффективности. Надо полагать, что ссылки и автоматический перенос данных о свойствах одних препаратов наносеребра на другие без дополнительного экспериментального подтверждения неправомерны. Исходя из этих соображений, в данной работе в качестве примера взята субстанция наносеребра, выпускаемая под торговым наименованием «арговит» («арговит-С», «арговит-био»). Данная субстанция и препараты на ее основе имеют обширную научно-доказательную базу по безопасности и эффективности – опубликованные научные статьи с результатами исследований (более 80), диссертации (более 19), патенты и заявки на патенты (более 20), научно-методические рекомендации [4].

Арговит производится по запатентованной инновационной и масштабируемой промышленной технологии электронно-лучевого синтеза [5]. Благодаря используемой технологии обеспечивается прочное взаимодействие наноразмерных кластеров серебра с полимером-стабилизатором (поливинилпирролидоном и/или гидролизатом коллагена), доля ионного серебра и обусловленная им токсичность сводится к минимуму. Получаемая субстанция стабильная, срок годности не менее двух лет.

Субстанция наносеребра, изготавливаемая по данной технологии, под торговым названием «арговит» была ранее зарегистрирована в качестве ветеринарного лекарственного препарата, предназначенного для профилактики и лечения кишечных инфекций бактериальной, вирусной и смешанной этиологии, применяется перорально в виде разбавленного водного раствора. При регистрации ветеринарного лекарства препарат прошел все необходимые токсикологические исследования, по результатам которых был отнесен к малоопасным веществам, 4-й класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76.

В ходе исследований была также продемонстрирована терапевтическая эффективность применения данного препарата при кишечных инфекциях [6–8]. Биологически активная субстанция наносеребра под торговым наименованием «арговит-С» в настоящее время зарегистрирована в качестве сырья в пищевой промышленности для приготовления биологически активных до-

бавок к пище, свидетельство о государственной регистрации № RU.77.99.11.003.E.001635.03.13 от 01.03.2013. При регистрации была проведена ее всесторонняя токсикологическая оценка и определен показатель безопасности NOAEL (No-Observed Adverse Effect Level) – уровень, при котором не наблюдается неблагоприятного воздействия на организм. Это максимальная доза препарата, не вызывающая обнаруживаемого вредного воздействия на здоровье человека (1 мг активного фармакологического ингредиента на 1 кг массы тела). Согласно исследованиям, выполненным в Федеральном исследовательском центре питания и биотехнологии (г. Москва) [9–12], NOAEL для арговита-С составляет 0,1 мг/кг массы тела в день по серебру, т.е. 7 мг серебра в день для человека массой 70 кг. Рекомендуемые для использования терапевтические дозировки серебра не превышают этот показатель, т.е. совершенно безопасны.

В работе [13] сравнили применение растворов хлоргексидина и арговита для санации брюшной полости в комплексной схеме лечения гнойного перитонита с использованием регионарной лимфотропной терапии. У лиц контрольной (44 пациента с острым распространенным перитонитом) и опытной (42 человека с аналогичным заболеванием) групп санацию брюшной полости проводили соответственно стандартным 0,2%-м водным раствором хлоргексидина и 0,25%-м раствором арговита. По сравнению с раствором хлоргексидина использование для санации брюшной полости раствора арговита уменьшило количество осложнений и летальность в послеоперационном периоде. Наиболее частым осложнением было нагноение послеоперационной раны, которое наблюдалось в восьми случаях в контрольной группе, в пяти случаях – в опытной группе. Продолжающийся перитонит был отмечен в трех случаях в контрольной группе, в опытной группе не наблюдался, системная воспалительная реакция составила 18,1 и 9,5 %, частота кишечных осложнений – 20,4 и 9,5 %, летальность – 20,4 и 11,9 % соответственно. У четырех больных в контрольной группе в послеоперационном периоде была отмечена ранняя спаечная кишечная непроходимость, что потребовало экстренного оперативного вмешательства. Средний срок пребывания больных в стационаре в опытной группе сократился на 4,4 койкодня по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой терапевтической эффективности арговита по сравнению с хлоргексидином.

В работе [14] показана высокая эффективность применения раствора арговита для лечения

диабетической стопы: терапии поддавались диабетические язвы II и даже III степени по классификации Вагнера.

Большой объем исследований был выполнен по изучению антибактериальной активности арговита, включая его эффективность в отношении антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов [15–19]. Как известно, антибиотики не действуют на вирусы. Но вирусные инфекции обычно сопровождаются бактериальными осложнениями (смешанные инфекции), для борьбы с которыми и используют антибиотики. Появление и быстрое распространение антибиотико-устойчивых штаммов болезнетворных бактерий (супербактерий) превратилось в серьезную проблему. Это вызывает необходимость подбора и замены одних антибиотиков другими, а в целом – необходимость постоянной разработки новых антибиотиков. Но устойчивые штаммы бактерий появляются очень быстро, в первые же годы от начала массового использования нового антибиотика или даже на стадии его регистрации. Для фармацевтических компаний утрачивается экономический смысл вкладывать средства в разработки новых антибиотиков, поскольку нет гарантий возврата вложений. Показана эффективность арговита в отношении антибиотикоустойчивых штаммов бактерий, вызывающих ЛОР-инфекции [15–19], а также препаратов на его основе при лечении больных с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза [20, 21].

В работе [22] приведены данные по изучению влияния арговита на течение хронического туберкулеза в эксперименте. Показано, что ингаляционное введение наночастиц серебра мышам, больным туберкулезом, приводило к снижению обсемененности легких и селезенки микобактериями на 2 порядка. У этих животных уменьшалось содержание белка в жидкости бронхолегочного лаважа в 2 раза, что свидетельствовало об угнетении воспалительных процессов в легких; увеличивалась продукция активных форм кислорода нейтрофилами, отражающая их бактерицидный потенциал; восстанавливались соотношение популяций лимфоцитов в селезенке и цитокиновый баланс (снижался уровень интерферона-гамма, фактора некроза опухоли-альфа и интерлейкина-4 в сыворотке крови и жидкости бронхолегочного лаважа). Таким образом, показано, что ингаляционное введение наночастиц серебра приводило не только к заметному бактерицидному эффекту, но и восстанавливало баланс иммунной системы мышей. Препараты наносеребра «арговит» способны восстанавливать чувствительность бактерий к действию антибиотиков [23], при их совместном использовании наблюдаются эффекты

синергизма [24]. Другими словами, вместо дорогостоящей и длительной разработки нового антибиотика, причем без гарантий успеха, для борьбы с антибиотикоустойчивыми штаммами можно использовать комбинации имеющихся антибиотиков с арговитом.

Принципиальным недостатком антибиотиков является их негативное действие на нормальную микрофлору организма, что ведет к развитию дисбактериозов. Для препарата наносеребра обнаружено селективное действие на патогенную и полезную микрофлору [25]: в первую очередь подавляется патогенная микрофлора (бактерицидное действие), нормальная (пробиотическая) микрофлора угнетается умеренно (бактериостатическое действие), а после прекращения приема наносеребра нормофлора быстро восстанавливается, дисбактериозы не развиваются. Отмечена противораковая и антипаразитарная активность арговита [26], что открывает возможности его использования для профилактики и лечения злокачественных новообразований и паразитарных инфекций.

С использованием арговита получены модифицированные серебром сорбенты, предназначенные для целей как энтеросорбции, так и вальверносорбции (пудра, присыпки) [27–31]. Известно, что сорбенты широко используют в медицинской практике для детоксикации организма при различных заболеваниях. Дополнительное придание их поверхности антимикробных свойств за счет иммобилизованного серебра позволяет усилить саногенное действие. Сорбционные материалы интересны не только в роли детоксикантов, используемых для удаления токсических агентов из жидких сред, но и в качестве носителей для доставки в зоны терапевтического воздействия биологически активных веществ.

Противовирусная активность и терапевтическая эффективность препарата «арговит» отмечена в отношении как РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов: лихорадки долины Рифт, РНК-содержащего [32]; чумы плотоядных, РНК-содержащего [33]; парвовирусного энтерита, ДНК-содержащего [34]; синдрома белого пятна у креветок, ДНК-содержащего [35, 36]; ротавирусной инфекции, РНК-содержащего [34]; инфекционного ринотрахеита, ДНК-содержащего [34]; инфекционного бронхита у кур (коронавирусная пневмония птиц), который может рассматриваться как модель COVID-19 [37].

Приведенные данные свидетельствуют об универсальности противовирусного действия арговита и придают уверенность, что разработанная субстанция может быть эффективно использована для борьбы с уже имеющейся коронавирусной

инфекцией (COVID-19), а также с другими как бактериальными, так и вирусными инфекциями, которые могут появиться в будущем.

Эффективность использования разбавленного раствора арговита для дополнительной защиты от инфицирования коронавирусом проверена на практике в клинике. В исследовании, выполненном в Головной больнице г. Тихуана (Мексика), принимали участие более 200 медицинских работников (врачей, медсестер, санитарок), имевших непосредственный ежедневный контакт с госпитализированными пациентами с COVID-19. Медицинский персонал находился в одинаковых условиях и использовал стандартные меры и средства защиты (защитные медицинские маски, перчатки, антисептики и т. д.). Отметим, что исследование проводилось в феврале – апреле 2020 г., и в этот период персонал больницы еще не был обеспечен изолирующими костюмами. В опытной группе медицинский персонал (114 человек) дополнительно к стандартным средствам применял разбавленный раствор арговита в виде спрея для обработки слизистых носоглотки (миндалины, горло, рот, нос) или раствора для полоскания горла. В контрольной группе (118 человек) раствор арговита не использовали. За 9 недель наблюдения в опытной группе из 114 человек заболели двое (1,8 %). Оба заболевших в опытной группе перенесли легкую форму COVID-19. В контрольной группе (медицинский персонал больницы, не использовавший раствор арговита) из 118 человек 33 работника (27 %) заболели COVID-19. В примерно аналогичном исследовании, выполненном в Городской больнице № 3 г. Новосибирска, из 73 медицинских работников (практически весь персонал, за исключением 2–3 человек), обслуживающих пациентов с COVID-19 и использовавших раствор арговита для обработки слизистых носоглотки, за весь период работы данного «ковидного» отделения никто не заболел. По результатам исследования сделан вывод, что препарат наносеребра «арговит» в виде спрея для обработки слизистых оболочек носоглотки или раствора для полоскания горла может быть рекомендован в качестве средства дополнительной защиты от коронавирусной инфекции.

Также исследована эффективность использования препарата наносеребра в комплексной терапии больных коронавирусом. Проведено рандомизированное проспективное клиническое исследование воздействия препарата «витарген» (разбавленный раствор арговита, концентрация серебра 1 мг/мл) на течение COVID-19 с участием 92 больных. В исследовании принимали участие мужчины и женщины в возрасте от 21 до 68 лет с диагнозами «Коронавирусная инфекция,

вызванная SARS-CoV, легкая форма» (45 человек) и «Коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV, среднетяжелая форма» (47 человек), установленными в соответствии с Временными методическими рекомендациями МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, версия 9. Диагноз подтверждался с помощью метода ПЦР. На участие в исследовании все больные дали добровольное письменное информированное согласие до его начала.

Пациенты были разделены на опытные и контрольные группы, сопоставимые по антропометрическим, лабораторным и клиническим исходным показателям (лица с легкой формой – O1 ($n = 23$) и K1 ($n = 22$), со среднетяжелой формой – O2 ($n = 24$) и K2 ($n = 23$) соответственно). Все больные получали стандартную терапию при заболевании в соответствии с рекомендованными схемами лечения, представленными во ВМР МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечению коронавирусной инфекции. Дополнительно в схему лечения пациентов опытных групп (O1, O2) были включены ингаляции с витаргеном 2 раза в день длительностью 10 минут в течение 10 дней (O1) или до выписки из стационара (O2).

Эффективность терапии оценивалась по количеству дней лечения до улучшения клинического статуса, по времени элиминации вируса (отсутствие SARS-CoV-2 по результатам ПЦР в двух мазках из рта и носоглотки, взятых с интервалом более 24 ч) и по данным компьютерной томографии легких (согласно «эмпирической» визуальной шкале оценки степени поражения легких в соответствии с Временными методическими рекомендациями МЗ РФ по диагностике и лечению COVID-19).

Сравнительный анализ клинического статуса пациентов показал, что повышение температуры

тела на 10-й день лечения отмечалось у меньшего числа пациентов опытной группы (O1), чем контрольной (K1); снижение интенсивности болевого синдрома наступило быстрее в группе, получавшей ингаляции с препаратом наносеребра (на 5-й день терапии), так же как и восстановление обоняния и вкусовых ощущений (таблица).

По данным ПЦР-анализа, к 10-му дню терапии в опытной группе (O1) доля больных с элиминацией COVID-19 составила 97 %, в контрольной (K1) – 81 %, среднее время до наступления клинического улучшения, согласно категориальной порядковой шкале ВОЗ, – соответственно 6 и 10 дней. Полученные данные свидетельствуют о повышении эффективности терапии при включении препарата наносеребра в комплексные схемы лечения COVID-19, по крайней мере при легких, незапущенных формах заболевания.

В случае больных коронавирусной инфекцией среднетяжелой формы течения изучение клинического статуса пациентов опытной (O2) и контрольной (K2) групп не выявило статистически значимых различий исследуемых показателей. Это может быть связано в той или иной степени либо с малой концентрацией действующего вещества (1 мг/мл наносеребра), недостаточной для оказания должного терапевтического эффекта при среднетяжелых формах инфекции, либо с тем, что при данном способе применения (спрей, ингаляции) наносеребро преимущественно локализуется в верхних отделах дыхательного тракта (носоглотка, ротоглотка, нос, миндалины, горло) и не достигает нижних отделов дыхательной системы, пораженных вирусом. То есть надо увеличивать концентрацию серебра и совершенствовать способ доставки действующего вещества в очаги поражения (в частности, использовать аэрозоль), что послужит предметом дальнейших исследований.

Таблица. Динамика клинического состояния больных коронавирусной инфекцией легкой формы течения, n (%)

Table. Dynamics of the clinical condition of patients with mild coronavirus infection, n (%)

Клиническая симптоматика	До начала лечения		Через 5 дней		Через 10 дней	
	O1	K1	O1	K1	O1	K1
Повышение температуры тела	18 (78,3 %)	17 (77,3 %)	8 (34,8 %)	13 (59,0 %)	1* (4,3 %)	6 (27,3 %)
Боль в горле	15 (65,2 %)	13 (59,1 %)	4* (17,4 %)	11 (50,0 %)	0	3 (13,6 %)
Сухой кашель	22 (96,6 %)	20 (90,9 %)	2 (8,7 %)	6 (27,3 %)	1 (4,3 %)	5 (22,7 %)
Слабость, потливость, боль в мышцах	23 (100 %)	22 (100 %)	15 (65,2 %)	19 (86,3 %)	1* (4,3 %)	7 (31,8 %)
Нарушение вкуса и обоняния	21 (91,3 %)	20 (90,9 %)	13 (56,5 %)	18 (81,8 %)	3* (13,0 %)	9 (40,9 %)

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0,05$ (точный тест Фишера).

Напомним, что для респираторных инфекций, передающихся воздушно-капельным путем, входными воротами являются носоглотка и ротоглотка. На слизистых оболочках носоглотки формируются первичные очаги инфекции, из которых вирус далее распространяется по всему организму, поражает легкие и другие органы. Важно не допустить образования и развития этих первичных очагов. Дополнительная обработка слизистых оболочек носоглотки и ротоглотки (горло, миндалины, рот, нос) раствором (спреем) наносеребра инактивирует вирус и препятствует образованию и развитию первичных очагов инфекции, что в свою очередь уменьшает вероятность образования и развития вторичных очагов и осложнений. Простая, доступная, легко выполняемая процедура обработки слизистых оболочек носоглотки серебросодержащим спреем или раствором позволяет осуществлять профилактику заболевания, а также купировать процесс развития COVID-19 на ранних стадиях.

Субстанция наносеребра «арговит» и препараты на ее основе оказывают биотическое действие. Обширный цикл исследований по применению арговита в качестве биологически активной добавки к пище у животных и птицы выполнен в Сибирском Федеральном научном центре агробиотехнологий РАН [38]. Показано, что его использование в биотических дозах (1–2 мкг на 1 кг живой массы) повышает продуктивность животных, снижает заболеваемость, увеличивает сохранность. При назначении арговита увеличивается стрессоустойчивость животных под действием неблагоприятных факторов, улучшается качество производимой продукции, возрастает лизоцимная активность сыворотки крови, т.е. усиливается неспецифический иммунитет.

Заключение

Как уже отмечалось, существует реальная и достаточно высокая вероятность появления как новых инфекций, так и новых вариантов уже существующих инфекций, представляющих повышенную опасность для человека. Для борьбы (профилактики и лечения) с ними необходимы препараты нового типа, отличающиеся по механизму действия от существующих антимикробных средств и таким образом дополняющие их. Эти препараты должны обладать комплексной универсальной активностью в отношении болезнетворных микроорганизмов независимо от их вида (бактерии, вирусы, грибы, простейшие и т.д.) и в целом повышать устойчивость макроорганизма к инфицированию болезнетворными агентами, т.е. стимулировать неспецифический

иммунитет, как общий, так и местный. Субстанция наноструктурированного серебра «арговит», получаемая по оригинальной запатентованной технологии, обладает комплексом положительных биологических свойств: оказывает антибактериальное, противовирусное, фунгицидное, противовоспалительное действие, проявляет противопаразитарную и противораковую активность. Субстанция обладает низкой токсичностью (в рекомендуемых к применению профилактических и терапевтических дозировках совершенно безопасна), оказывает биотическое действие, повышает устойчивость организма к действию болезнетворных возбудителей, усиливает неспецифический иммунитет. Производится серийно по инновационной масштабируемой технологии. Субстанция стабильная, срок годности не менее двух лет. Показана эффективность и, соответственно, перспективность данной субстанции и препаратов на ее основе для борьбы с инфекционными возбудителями в разных областях медицины: кишечные инфекции различной этиологии; острые респираторно-вирусные инфекции и связанные с ними бактериальные осложнения (ЛОР-заболевания), в том числе при заражении антибиотикоустойчивыми штаммами бактерий; гнойная хирургия, диабетическая стопа; лекарственно устойчивые формы туберкулеза; вирусные инфекции, обусловленные ДНК- и РНК-содержащими вирусами. В клинике на волонтерах показана эффективность применения данного наносеребра для защиты от инфицирования коронавирусом и для лечения ранних стадий COVID-19.

В целом все это позволяет утверждать, что субстанция «арговит» может быть эффективно использована для борьбы с уже имеющейся коронавирусной инфекцией (COVID-19), включая постковидный синдром, а также с другими новыми как бактериальными, так и вирусными инфекциями, которые могут появиться в будущем.

Список литературы / References

1. Блажитко Е.М., Бурмистров В.А., Колесников А.П., Михайлов Ю.И., Родионов П.П. Серебро в медицине. Новосибирск: Наука-Центр, 2004. 256 с.
Blagitko E.M., Burmistrov V.A. Kolesnikov A.P., Michailov Yu.I., Rodionov P.P. Silver in medicine. Novosibirsk: Nauka-Center, 2004. 256 p. [In Russian].
2. Зиньковская И., Ивлиева А.Л., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А. Неожиданный эффект длительного перорального приема наночастиц серебра на рождаемость у мышей. *Экол. человека*. 2020; 10: 23–30. doi: 10.33396/1728-0869-2020-10-23-30
Zinkovskaya I., Ivlieva A.L., Petritskaya E.N., Rogatkin D.A. Unexpected effect of prolonged oral ad-

ministration of silver nanoparticles on the birth rate in mice. *Ekologia cheloveka = Human Ecology*. 2020; 10: 23–30. [In Russian]. doi: 10.33396/1728-0869-2020-10-23-30

3. Ruiz-Ruiz B., Arellano-García M.E., Radilla-Chávez P., Salas-Vargas D.S., Toledano-Magaña Y., Casillas-Figueroa F., Vazquez-Gomez R.L., Pestryakov A., García-Ramos J.C., Bogdanchikova N. Cytokinesis block micronucleus assay using human lymphocytes as a sensitive tool for cytotoxicity. *ACS Omega*. 2020; 5 (21): 12005–12015. doi: 10.1021/acsomega.0c00149

4. ООО НПЦ «Вектор-Вита». Наши разработки для профилактики COVID-19. Режим доступа: <http://vector-vita.narod.ru/links.html>

LLC SPC «Vector-Vita». Our developments for the prevention of COVID-19. Available at: <http://vector-vita.narod.ru/links.html> [In Russian].

5. Бурмистров В.А., Бурмистров А.В., Бурмистров И.В., Бурмистров А.В., Пестряков А.Н., Одегова Г.В., Богданчикова Н.Е. Способ получения коллоидных наночастиц серебра. Пат. РФ № 2602534; опубл. 20.11.2016.

Burmistrov V.A., Burmistrov A.V., Burmistrov I.V., Burmistrov A.V., Pestryakov A.N., Odegova G.V., Bogdanchikova N.E. Method of obtaining colloidal silver nanoparticles. Patent RF № 2602534; published 20.11.2016. [In Russian].

6. Шкиль Н.А., Шкиль Н.Н., Бурмистров В.А., Соколов М.Ю. Антимикробные свойства, фармако-токсикологические характеристики и терапевтическая эффективность препарата Арговит при желудочно-кишечных болезнях телят. *Науч. ж. КубГАУ*. 2011; 68: 527–537.

Shkil N.A., Shkil N.N., Burmistrov V.A., Sokolov M.Yu. Antimicrobial properties, pharmacotoxicological characteristics and therapeutic efficacy of Argovit in gastrointestinal diseases of calves. *Nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Scientific Journal of the Kuban State Agrarian University*. 2011; 68: 527–537. [In Russian].

7. Шкиль Н.А., Бурмистров В.А., Шкиль Н.Н., Юхин Ю.М., Соколов М.Ю., Зайченко В.И. Использование серебросодержащего препарата Арговит в ветеринарии. *Международ. научно-исслед. ж.* 2016; 46 (4-5): 68–70. doi: 0.18454/IRJ.2016.46.305

Shkil N.A., Burmistrov V.A., Shkil N.N., Yukhin Yu.M., Sokolov M.Yu., Saichenko V.I. Use of Argovit product with silver content in veterinary. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal = International Research Journal*. 2016; 46 (4-5): 68–70. [In Russian]. doi: 10.18454/IRJ.2016.46.305

8. Шкиль Н.Н., Шкиль Н.А., Бурмистров В.А., Юхин Ю.М. Фармакотоксикологические характеристики наночастиц препаратов серебра и висмута. *Сиб. вестн. с.-х. науки*. 2017; 47 (2): 80–84.

Shkil N.N., Shkil N.A., Burmistrov V.A., Yukhin Yu.M. Pharmacotoxicological characteristics of nanoparticles of silver and bismuth preparations. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki = Siberian Herald of Agricultural Science*. 2017; 47 (2): 80–84. [In Russian].

9. Шумакова А.А., Шипелин В.А., Сидорова Ю.С., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Придворова С.М., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном. I. Характеристика наноматериала, интегральные, гематологические показатели, уровень тиоловых соединений и апоптоз клеток печени. *Вопр. питания*. 2015; 84 (6): 46–57.

Shumakova A.A., Shipelin V.A., Sidorova Yu.S., Trushina E.N., Mustafina O.K., Pridvorova S.M., Gmshinsky I.V., Khotimchenko S.A. Toxicological assessment of nanosized colloidal silver stabilized with polyvinylpyrrolidone. I. Characteristics of nanomaterial, integral, hematological parameters, the level of thiol compounds and apoptosis of liver cells. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2015; 84 (6): 46–57. [In Russian].

10. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Звездин В.Н., Довбыш А.А., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Акафьева Т.И. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном, в 92-дневном эксперименте на крысах. II. Морфология внутренних органов. *Вопр. питания*. 2016; 85 (1): 47–55.

Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Zvezdin V.N., Dovbysh A.A., Gmshinsky I.V., Khotimchenko S.A., Akafyeva T.I. Toxicological evaluation of nanosized colloidal silver stabilized with polyvinylpyrrolidone in a 92-day experiment on rats. II. Morphology of internal organs. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2016; 85 (1): 47–55. [In Russian].

11. Гмошинский И.В., Шипелин В.А., Ворожко И.В., Сенцова Т.Б., Сото С.Х., Авренева Л.И., Гусева Г.В., Кравченко Л.В., Хотимченко С.А., Тутьян В.А. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном. III. Энзимологические, биохимические маркеры, состояние системы антиоксидантной защиты. *Вопр. питания*. 2016, 85 (2): 14–23.

Gmshinsky I.V., Shipelin V.A., Vorozhko I.V., Sentsova T.B., Soto S.Kh., Avrenyeva L.I., Guseva G.V., Kravchenko L.V., Khotimchenko S.A., Tutelyan V.A. Toxicological assessment of nanosized colloidal silver stabilized with polyvinylpyrrolidone. III. Enzymological, biochemical markers, the state of the antioxidant defense system. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2016; 85 (2): 14–23. [In Russian].

12. Шумакова А.А., Шипелин В.А., Ефимочкина Н.Р., Минаева Л.П., Быкова И.Б., Маркова Ю.М.,

Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Гмошинский И.В., Ханферьян Р.А., Хотимченко С.А., Шевелева С.А., Тутельян В.А. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном. IV. Влияние на микробиоту кишечника, иммунологические показатели. *Вопр. питания*. 2016. 85 (3): 27–35.

Shumakova A.A., Shipelin V.A., Efimochkina N.R., Minaeva L.P., Bykova I.B., Markova Yu.M., Trushina E.N., Mustafina O.K., Gmoshinsky I.V., Hanferyan R.A., Khotimchenko S.A., Sheveleva S.A., Tutelyan V.A. Toxicological assessment nanosized colloidal silver stabilized with polyvinylpyrrolidone. IV. Influence on the intestinal microbiota, immunological parameters. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2016; 85 (3): 27–35. [In Russian].

13. Рабаданов Ш.Х. Комплексное лечение распространенного перитонита с использованием регионарной лимфотропной терапии и санацией брюшной полости Арговитом: автореф. дис... канд. мед. наук. Махачкала, 2017.

Rabadanov Sh.Kh. Complex treatment of advanced peritonitis using regional lymphotropic therapy and rehabilitation of the abdominal cavity with Argovitis. Abstract of thesis... cand. med. sci. Makhachkala, 2017. [In Russian].

14. Almonaci Hernández C.A., Juarez-Moreno K., Castañeda-Juarez M.E., Almanza-Reyes H., Pestryakov A., Bogdanchikova N. Silver nanoparticles for the rapid healing of diabetic foot ulcers. *Medical Nano Research*. 2017; 4 (1): 1–6. doi: 10.23937/2378-3664/1410019

15. Фидарова К.М., Семенов Ф.В., Бабичев С.А., Качанова О.А. Перспективы использования препарата, содержащего наночастицы серебра, для эмпирической терапии ЛОР-инфекций, вызванных *S. aureus*. *Рос. оториноларингол.* 2015; 78 (5): 127–129.

Fidarova K.M., Semenov F.V., Babichev S.A., Kachanova O.A. Prospects for the use of a drug containing silver nanoparticles for the empirical therapy of ENT infections caused by *S. aureus*. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*. 2015; 78 (5): 127–129. [In Russian].

16. Фидарова К.М., Семенов Ф.В. Местное применение препаратов на основе наночастиц серебра после операций в полости носа и околоносовых пазухах. *Рос. оториноларингол.* 2016; 82 (3): 147–151. doi: 10.18692/1810-4800-2016-3-147-151

Fidarova K.M., Semenov F.V. Local application of preparations based on silver nanoparticles after operations in the nasal cavity and paranasal sinuses. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*. 2016; 82 (3): 147–151. [In Russian]. doi: 10.18692/1810-4800-2016-3-147-151

17. Семенов Ф.В., Бабичев С.А., Качанова О.А., Фидарова К.М. Экспериментальное обоснование использования препаратов, содержащих наноча-

стицы серебра, в местной эмпирической терапии заболеваний лорорганов, вызванных *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* sp. *Рос. оториноларингол.* 2013; 66 (5): 88–90.

Semenov F.V., Babichev S.A., Kachanova O.A., Fidarova K.M. Experimental substantiation of the use of preparations containing silver nanoparticles in the local empirical therapy of ENT organ diseases caused by *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* sp. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*. 2013; 66 (5): 88–90. [In Russian].

18. Семенов Ф.В., Фидарова К.М. Лечение больных с хроническим воспалением трепанационной полости после saniрующих операций открытого типа на среднем ухе препаратом, содержащим наночастицы серебра. *Вестн. оториноларингол.* 2012; 6: 117–119.

Semenov F.V., Fidarova K.M. Treatment of patients with chronic inflammation of the trepanation cavity after open-type sanitizing operations on the middle ear with a drug containing silver nanoparticles. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*. 2012; 6: 117–119. [In Russian].

19. Бурмистров В.А., Рачковская Л.Н., Попова Т.В., Котлярова А.А., Королев М.А., Летагин А.Ю. Перспективы применения препаратов коллоидного серебра для активной санации организма от патогенных микробов. *Вестн. КРСУ*. 2018; 18 (9): 23–26.

Burmistrov V.A., Rachkovskaya L.N., Popova T.V., Kotlyarova A.A., Korolev M.A., Letyagin A.Yu. Prospects for the use of colloidal silver preparations for active sanitation of the body from pathogenic microbes. *Vestnik Kirgizsko-Rossiyskogo slavyanskogo universiteta = Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University*. 2018; 18 (9): 23–26. [In Russian].

20. Ураскулова Б.Б., Гюсан А.О. Клинико-бактериологическое исследование эффективности использования наночастиц серебра для лечения туберкулеза верхних дыхательных путей. *Вестн. оториноларингол.* 2017; 82 (3): 54–57. doi: 10.17116/otorino201782354-57

Uraskulova B.B., Gyusan A.O. Clinical and bacteriological study of the effectiveness of the use of silver nanoparticles for the treatment of upper respiratory tract tuberculosis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*. 2017; 82 (3): 54–57. [In Russian]. doi: 10.17116/otorino201782354-57

21. Гюсан А.О., Ураскулова Б.Б. Вопросы туберкулеза в оториноларингологии. *Рос. оториноларингол.* 2017; 89 (4): 32–38. doi: 10.18692/1810-4800-2017-4-32-38

Gyusan A.O., Uraskulova B.B. Questions of tuberculosis in otorhinolaryngology. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*. 2017; 89 (4): 32–38. [In Russian]. doi: 10.18692/1810-4800-2017-4-32-38

22. Калмантаева О.В., Фирстова В.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Потапов В.Д., Игнатов С.Г. Антибактериальная и иммуномодулирующая активность наночастиц серебра на модели экспериментального туберкулеза мышей. *Прикл. биохимия и микробиол.* 2020; 56 (2): 190–197. doi: 10.31857/S0555109920020087
- Kalmantaeva O.V., Firstova V.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Potapov V.D., Ignatov S.G. Antibacterial and immunomodulatory activity of silver nanoparticles on a model of experimental mouse tuberculosis. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology.* 2020; 56 (2): 190–197. [In Russian]. doi: 10.31857/S0555109920020087
23. Шкиль Н.Н., Нефедова Е.В. Влияние антибиотиков и наночастиц серебра на изменение чувствительности *E. coli* к антибактериальным препаратам. *Сиб. вестн. с.-х. науки.* 2020; 50 (2): 84–91. doi: 10.26898/0370-8799-2020-2-10
- Shkil N.N., Nefedova E.V. Influence of antibiotics and silver nanoparticles on changes in the sensitivity of *E. coli* to antibacterial drugs. *Sibirskiy vestnik sel'skhozaystvennoy nauki = Siberian Herald of Agricultural Science.* 2020; 50 (2): 84–91. [In Russian]. doi: 10.26898/0370-8799-2020-2-10
24. Vazquez-Muñoz R., Meza-Villezcás A., Fourrier P.G.J., Soria-Castro E., Juárez-Moreno K., Gallego-Hernández A.L., Bogdanchikova N., Vazquez-Duhalt R., Huerta-Saquero A. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the AgNPs impact on the cell membrane. *PLoS ONE.* 2019; 14 (11): e0224904. doi: 10.1371/journal.pone.0224904
25. Guerra J.D., Sandoval G., Patron A., Avalos-Borja M., Pestryakov A., Garibo D., Susarrey-Arce A., Bogdanchikova N. Selective antifungal activity of silver nanoparticles: A comparative study between *Candida tropicalis* and *Saccharomyces boulardii*. *Colloid and Interface Science Communications.* 2020; 37: 100280. doi: 10.1016/j.colcom.2020.100280
26. Valenzuela-Salas L.M., Blanco-Salazar A., Perrusquía-Hernández J.D., Nequiz-Avendaño M., Mier-Maldonado P.A., Ruiz-Ruiz B., Campos-Gallegos V., Arellano-García M.E., García-Ramos J.C., Pestryakov A., Villarreal-Gómez L.J., Toledano-Magaña Y., Bogdanchikova N. New protein-coated silver nanoparticles: characterization, antitumor and amoebicidal activity, antiproliferative selectivity, genotoxicity and biocompatibility evaluation. *Pharmaceutics.* 2021; 13 (1): 65. doi: 10.3390/pharmaceutics13010065
27. Рачковская Л.Н., Лetyagin А.Ю., Бурмистров В.А., Королев М.А., Гельфонд Н.Е., Бородин Ю.И., Коненков В.И. Модифицированные сорбенты для практического здравоохранения. *Сиб. науч. мед. ж.* 2015; 35 (2): 47–54.
- Rachkovskaya L.N., Letyagin A.Yu., Burmistrov V.A., Korolev M.A., Gelfond N.E., Borodin Yu.I., Konenkov V.I. Modified sorbents for practical health care. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2015; 35 (2): 47–54. [In Russian].
28. Попова Т.В., Толстикова Т.Г., Лetyagin А.Ю., Рачковская Л.Н. Исследование аллергогенных свойств нового серебросодержащего тонкодисперсного сорбента. *Сиб. науч. мед. ж.* 2016; 36 (2): 24–28.
- Popova T.V., Tolstikova T.G., Letyagin A.Yu., Rachkovskaya L.N. Investigation of the allergenic properties of a new silver-containing fine-dispersed sorbent. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2016; 36 (2): 24–28. [In Russian].
29. Попова Т.В., Толстикова Т.Г., Лetyagin А.Ю., Рачковская Л.Н., Бурмистров В.А. Экспериментальное исследование показателей гемодинамики при парентеральном введении серебросодержащего тонкодисперсного сорбента. *Хим.-фармац. ж.* 2016; 50 (3): 16–19.
- Popova T.V., Tolstikova T.G., Letyagin A.Yu., Rachkovskaya L.N., Burmistrov V.A. Experimental study of hemodynamic parameters during parenteral administration of a silver-containing fine sorbent. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2016; 50 (3): 16–19. [In Russian].
30. Rachkovskaya L.N., Popova T.V., Letyagin A.Yu., Tolstikova T.G., Korolyov M.A., Bogdanchikova N., Pestryakov A.N., Kotlyarova A.A., Burmistrov V.A., Konenkov V.I. Silver containing sorbents: Physicochemical and biological properties. *Resource-Efficient Technologies.* 2016. 2 (2): 43–49. doi: 10.1016/j.reffit.2016.06.001
31. Попова Т.В., Карабинцева Н.О., Рачковская Л.Н., Толстикова Т.Г., Котлярова А.А., Лetyagin А.Ю. Возможности создания полифункционального серебросодержащего препарата с детоксикационным эффектом. *Фармация и фармакол.* 2017; 5 (3): 242–253. doi: 10.19163/2307-9266-2017-5-3-243-253
- Popova T.V., Karabintseva N.O., Rachkovskaya L.N., Tolstikova T.G., Kotlyarova A.A., Letyagin A.Yu. The possibilities of creating a multifunctional silver-containing drug with a detoxifying effect. *Farmatsiya i farmacologiya = Pharmacy and Pharmacology.* 2017; 5 (3): 242–253. [In Russian]. doi: 10.19163/2307-9266-2017-5-3-243-253
32. Borrego B., Lorenzo G., Mota-Morales J.D., Almanza-Reyes H., Mateos F., López-Gil E., de la Llosa N., Burmistrov V.A., Pestryakov A.N., Brun A., Bogdanchikova N. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus *in vitro* and *in vivo*. *Nanomedicine.* 2016; 12 (5): 1185–1192. doi: 10.1016/j.nano.2016.01.021
33. Bogdanchikova N., Vázquez-Muñoz R., Huerta-Saquero A., Pena-Jasso A., Aguilar-Uzcanga G., Picos-Díaz P.L., Pestryakov A., Burmistrov V., Martynyuk O., Luna-Vazquez-Gomez R., Almanza H. Silver

nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *International Journal of Nanotechnology*. 2016; 13 (1–3): 227–237. doi: 10.1504/IJNT.2016.074536

34. Бурмистров В.А., Бурмистров А.В. Биосеребро – здоровью добро! Новосибирск, 2014. 140 с.

Burmistrov V.A., Burmistrov A.V. BioSilver – good for health! Novosibirsk, 2014. 140 p. [In Russian].

35. Moreno K.O., Mejía-Ruiz C.H., Herrera F.D., Díaz F., Reyna-Verdugo H., Re A.D., Vazquez-Felix E.F., Sánchez-Castrejón E., Mota-Morales J.D., Pestryakov A., Bogdanchikova N. Effect of silver nanoparticles on metabolic rate, hematological response and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*. 2017; 169: 716–724. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.054

36. Romo-Quirón C.R., Álvarez-Sánchez A.R., Álvarez-Ruiz P., Chávez-Sánchez M.C., Bogdanchikova N., Pestryakov A., Mejía-Ruiz C.H. Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp *Litopenaeus vannamei* against White Spot Syndrome Virus infection. *PeerJ*. 2020; 8: e8446. doi: 10.7717/peerj.8446

37. Миронова Т.Е., Афонюшкин В.Н., Козлова Ю.Н., Бобикова А.С., Коптев В.Ю., Черепушкина В.С., Сигарева Н.А., Колпаков Ф.А. Изучение защитных эффектов виروцидных препара-

тов на модели коронавирусной пневмонии. *Вет. и кормление*. 2020; (7): 35–38. doi: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-7-10

Mironova T.E., Afonyushkin V.N., Kozlova Yu.N., Bobikova A.S., Koptev V.Yu., Cherepushkina V.S., Sigareva N.A., Kolpakov F.A. Study of the protective effects of virocidal drugs on a model of coronavirus pneumonia. *Veterinariya i kormleniye = Veterinary and Feeding*. 2020; (7): 35–38. [In Russian]. doi: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-7-10

38. Носенко Н.А., Солошенко В.А., Гомбоев Д.Д., Мерзлякова О.Г., Чегодаев В.Г., Егоров С.В., Рогачев В.А., Магер С.Н., Коптев В.Ю., Леонова М.А., Скрябин В.А., Чиркин А.П., Михайлов Ю.И., Бурмистров В.А., Бурмистров А.В. Применение наносеребра в рационах сельскохозяйственных животных: научные рекомендации. Новосибирск: СФНЦА РАН, 2020. 90 с.

Nosenko N.A., Soloshenko V.A., Gomboev D.D., Merzlyakova O.G., Chegodaev V.G., Egorov S.V., Rogachev V.A., Mager S.N., Koptev V.Yu., Leonova M.A., Skryabin V.A., Chirkin A.P., Mikhailov Yu.I., Burmistrov V.A., Burmistrov A.V. Application of nanosilver in the diets of agricultural animals: scientific recommendations. Novosibirsk: SFNCARAS, 2020. 90 p. [In Russian].

Сведения об авторах:

Василий Александрович Бурмистров, к.х.н., ORCID: 0000-0002-7351-434X, e-mail: vector-vita@ngs.ru

Нина Евгеньевна Богданчикова, к.х.н., ORCID: 0000-0003-0929-3535, e-mail: nina@cnyn.unam.mx

Арсентий Оникович Гюсан, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-8792-5021, e-mail: gujsan@mail.ru

Белла Барадиновна Ураскулова, к.м.н., ORCID: 0000-0003-1596-0410, e-mail: uraskulova_bella@mail.ru

Орасио Альманса-Рейес, ORCID: 0000-0002-1874-3975, e-mail: almanzareyes@hotmail.com

Марта Альварado-Вера, ORCID: 0000-0003-2272-5427, e-mail: martha.alvarado24@gmail.com

Измаэль Пласенсия-Лопес, проф., ORCID: 0000-0003-2860-1417, e-mail: pismael76@gmail.com

Алексей Николаевич Пестряков, д.х.н., проф., ORCID: 0000-0002-9034-4733,

e-mail: pestryakov2005@yandex.ru

Любовь Никифоровна Рачковская, к.х.н., ORCID: 0000-0001-9622-5391, e-mail: noolit@niikel.ru

Андрей Юрьевич Лetyагин, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-9293-4083, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Information about the authors:

Vasily A. Burmistrov, candidate of chemical sciences, ORCID: 0000-0002-7351-434X, e-mail: vector-vita@ngs.ru

Nina E. Bogdanchikova, candidate of chemical sciences, ORCID: 0000-0003-0929-3535, e-mail: nina@cnyn.unam.mx

Arsentiy O. Gyusan, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-8792-5021, e-mail: gujsan@mail.ru

Bella B. Uraskulova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-1596-0410, e-mail: uraskulova_bella@mail.ru

Horacio Almanza-Reyes, ORCID: 0000-0002-1874-3975, e-mail: almanzareyes@hotmail.com

Marta Alvarado-Vera, ORCID: 0000-0003-2272-5427, e-mail: martha.alvarado24@gmail.com

Izmael Plascencia-Lopez, professor, ORCID: 0000-0003-2860-1417, e-mail: pismael76@gmail.com

Alexey N. Pestryakov, doctor of chemical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-9034-4733,

e-mail: pestryakov2005@yandex.ru

Lubov N. Rachkovskaya, candidate of chemical sciences, ORCID: 0000-0001-9622-5391, e-mail: noolit@niikel.ru

Andrey Yu. Letyagin, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-9293-4083,

e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.06.2021

После доработки 16.06.2021

Принята к публикации 30.07.2021

Received 07.06.2021

Revision received 16.06.2021

Accepted 30.07.2021

Микроциркуляторные и метаболические изменения в мягких тканях в динамике раневого процесса при взрывной травме в эксперименте

И.А. Шперлинг¹, М.В. Виноградов¹, Р.В. Семакин¹, Н.В. Шперлинг^{1,2}, А.В. Шулепов¹, С.О. Ростовцев³, А.С. Коуров⁴, М.В. Баженов¹

¹ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины
Минобороны России

195043, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4

² Медицинский университет «Реавиз»

198095, г. Санкт-Петербург, ул. Калинина, 8

³ Военная академия материально-технического обеспечения имени генерала армии А.В. Хрулева
Минобороны России

199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 8

⁴ Санкт-Петербургский НИИ скорой помощи имени И.И. Джанелидзе

192242, г. Санкт-Петербург, ул. Будапештская, 3, лит. А

Резюме

Целью исследования было оценить микроциркуляторные и метаболические изменения в поврежденных скелетных мышцах у крыс при экспериментальной взрывной травме с острой кровопотерей. **Материал и методы.** На экспериментальной модели взрывного повреждения мягких тканей тазовой конечности у крыс методом лазерной доплеровской флоуметрии и лазерной флуоресцентной диагностики с помощью прибора «ЛАКК-М» проведена оценка микроциркуляции и метаболической активности в мышцах области взрывной раны. **Результаты и их обсуждение.** В течение всего периода наблюдения (28 суток) в поврежденных мышцах формировались выраженные нарушения микроциркуляции и метаболизма. Тканевая перфузия была значительно снижена, что подтверждается изменением коэффициента вариации показателя микроциркуляции, величина которого во все сроки наблюдения была на 36–51 % меньше значений у животных из интактной группы ($p < 0,05$), причем максимальное снижение показателя наблюдалось к 28 суткам (6,7 (6,3; 7,4) %). Метаболизм тканей перестраивался в сторону активации анаэробного пути: наблюдалось статистически значимое уменьшение показателя удельного потребления кислорода тканью (в 2,3 раза), флуоресцентного показателя потребления кислорода тканями (на 60 %), интегрального показателя эффективности кислородного обмена (в среднем в 8,5 раза) относительно здоровых животных, что в целом свидетельствовало о слабой утилизации кислорода тканями. Указанные нарушения метаболизма и кислородопотребления тканями области повреждения сохранялись на протяжении всего эксперимента с незначительной положительной динамикой к концу периода наблюдения. **Заключение.** Полученные данные являются патогенетическим обоснованием разработки средств локальной коррекции микроциркуляторных и метаболических нарушений в мышцах при взрывной травме в посттравматическом периоде.

Ключевые слова: взрывная травма, минно-взрывное ранение, микроциркуляция, метаболизм, регенерация, лазерная доплеровская флоуметрия.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Виноградов М.В., e-mail: mikhail.vinogradov@mail.ru

Для цитирования: Шперлинг И.А., Виноградов М.В., Семакин Р.В., Шперлинг Н.В., Шулепов А.В., Ростовцев С.О., Коуров А.С., Баженов М.В. Микроциркуляторные и метаболические изменения в мягких тканях в динамике раневого процесса при взрывной травме в эксперименте. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 16–24. doi: 10.18699/SSMJ20210502

Microcirculatory and metabolic changes in soft tissues in the dynamics of the wound process in explosive trauma with acute blood loss in an experiment

I.A. Shperling¹, M.V. Vinogradov¹, R.V. Semakin¹, N.V. Shperling^{1,2}, A.V. Shulepov¹, S.O. Rostovtsev³, A.S. Kourov⁴, M.V. Bazhenov¹

¹ State Research and Testing Institute of Military Medicine of Minoborony of Russia
195043, Saint-Petersburg, Lesoparkovaya str., 4

² Medical University «Reaviz»
198095, St. Petersburg, Kalinin str., 8

³ Military Academy of Logistics named after Army General A.V. Khrulev of Minoborony of Russia
199034, Saint-Petersburg, Makarov emb., 8

⁴ Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Emergency Medicine named after I.I. Dzhaneldidze
192242, Saint-Petersburg, Budapest str., 3, lit. A

Resume

The aim of the study was to evaluate microcirculatory and metabolic changes in damaged skeletal muscles in rats with experimental explosive trauma with acute blood loss. **Material and methods.** An experimental model of explosive damage to the soft tissues of the pelvic limb in rats was used to assess microcirculation and metabolic activity in the muscles of the area of the explosive wound by laser Doppler flowmetry and laser fluorescence diagnostics using the LAKK-M device. **Results and discussion.** It was found that during the entire follow-up period (28 days), pronounced disorders of microcirculation and metabolism were formed in the damaged muscles. Tissue perfusion was significantly reduced, which is confirmed by a change in the coefficient of variation of the microcirculation index, the value of which was lower by 36–51 % ($p < 0.05$) in all follow-up periods in animals from the intact group, and the maximum decrease in the indicator was observed by 28 days (6.7 (6.3; 7.4) %, at $p < 0.05$). Tissue metabolism was rearranged in the direction of activation of the anaerobic pathway: there was a decrease in the index of specific oxygen consumption by the tissue – by 2.3 times ($p < 0.05$), the fluorescent index of oxygen consumption by the tissues – by 60 % ($p < 0.05$), the integral index of oxygen exchange efficiency by an average of 8.5 times ($p < 0.05$) relative to healthy animals, which generally indicated weak oxygen utilization by the tissues. These disorders of metabolism and oxygen consumption by the tissues of the damaged area persisted throughout the experiment with a slight positive dynamics by the end of the observation period. **Conclusion.** The obtained data are a pathogenetic justification for the development of means for the local correction of microcirculatory and metabolic disorders in the muscles in the case of explosive trauma in the post-traumatic period.

Key words: explosive trauma, mine-blast injury, microcirculation, metabolism, regeneration, laser Doppler flowmetry.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Vinogradov M.V., e-mail: mikhail.vinogradov@mail.ru

Citation: Shperling I.A., Vinogradov M.V., Semakin R.V., Shperling N.V., Shulepov A.V., Rostovtsev S.O., Kourov A.S., Bazhenov M.V. Microcirculatory and metabolic changes in soft tissues in the dynamics of the wound process in explosive trauma with acute blood loss in an experiment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 16–24. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210502

Введение

В последние десятилетия современная медицина столкнулась с проблемой лечения взрывных травм, что связано с возникновением локальных вооруженных конфликтов и многочисленными террористическими актами. После окончания активных боевых действий остается большое количество неразминированных территорий, в связи с чем в разных странах от взрывных поврежде-

ний страдает мирное население [1, 2]. Подрыв на взрывном устройстве или mine вызывает травму, характеризующуюся тяжелыми повреждениями мягких тканей (взрывные раны) и костей (переломы) в результате комбинированного действия таких факторов, как взрывная волна, высокая температура и элементы взрывного устройства. В результате развиваются локальные, сегментарные и общие патоморфологические изменения, раневые гнойно-некротические процессы,

ранние и поздние нейротрофические нарушения, расстройства [3].

Несмотря на наличие современных методов лечения, исходами взрывной травмы могут быть гибель, инвалидность, снижение качества жизни пострадавших. В связи с этим поиск механизмов, лежащих в основе повреждения тканей и последующего развития патологических нарушений при взрывной травме, является актуальным. Появление новых методов диагностики повреждения тканей позволяет на высоком уровне дифференцированно оценить изменения, происходящие в поврежденных сегментах. Учитывая важность микроциркуляторного звена в формировании метаболической активности тканей и обеспечении их регенеративной активности, исследование различных параметров тканевого кровотока позволит изучить глубину и направленность повреждений, что может быть использовано как для разработки новых методов лечения, так и для оценки эффективности существующих.

Цель исследования – оценить в динамике раневого процесса микроциркуляторные и метаболические изменения в скелетных мышцах тазовой конечности экспериментальных животных при взрывной травме с острой кровопотерей.

Материал и методы

Исследование выполнено на 42 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 350–400 г и возрастом 4–4,5 мес., полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл., Россия), которые находились в виварии при постоянной температуре со свободным доступом к пище и воде. Перед экспериментом они проходили карантин в течение 14 суток с ежедневным осмотром. Исследование одобрено локальным Комитетом по этике ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ (протокол № 11 от 05.11.2019), проведено в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС, Хельсинкской декларацией и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Все животные были разделены на группы: основную ($n = 31$), которым моделировали взрывную травму с повреждением мягких тканей тазовой конечности и острой кровопотерей, и интактную ($n = 11$) – здоровые животные без травмы.

Взрывную травму мягких тканей тазовой конечности животного с острой кровопотерей моделировали по методике, разработанной в ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины»

МО РФ (заявка на патент РФ (№ 2020134282 от 19.10.2020). За 10 мин до нанесения травмы с целью наркоза крысам внутримышечно вводили золетил-100™ (Virbac, Франция) в сочетании с ксилаветом (Pharmamagist Ltd, Венгрия) в дозах 15 и 10 мг/кг массы соответственно.

Перед установкой взрывного заряда в мягкие ткани тазовой конечности на латеральной поверхности бедра животного делали линейный разрез длиной 0,8–1,0 см параллельно длине бедренной кости. Тупым способом, с помощью зажима, формировали канал длиной 2,0–2,5 см, куда и устанавливали взрывной заряд таким образом, чтобы его часть от места запала выступала на 2 см над поверхностью кожи. Подрыв животного осуществляли в специальном контейнере с соблюдением требований техники безопасности. В качестве взрывного заряда использовали пиротехническое изделие бытового назначения – обыкновенные терочные петарды, изготовленные в производственных условиях (класс опасности II), которые состояли из картонного оболочечного контейнера (длина 4,8–5,0 см, радиус 0,8 см, толщина оболочки 1,2 мм), начиненного пиротехнической смесью.

Сразу после нанесения взрывной травмы животных извлекали из контейнера, размещали на столе, где с помощью автоматической пипетки (Ленпипет, Россия) собирали излившуюся из раны кровь в стерильную градуированную пробирку Microvette объемом 9 мл, содержащую К₃ЭДТА (Sarstedt, Германия). Необходимый дополнительный объем крови для моделирования острой кровопотери в размере 15 % объема циркулирующей крови (ОЦК) получали путем отсечения (ампутации) части хвоста после непродолжительного (1–2 мин) его прогревания в воде температурой 45–50 °С и/или протирания ксилолом. После забора крови рану культи хвоста прижигали перекисью водорода и перевязывали, на рану бедра накладывали асептическую марлевую повязку, имитирующую индивидуальный перевязочный пакет. ОЦК животного определяли из расчета 7 % от его массы [4]. Через 3 часа после нанесения травмы, под наркозом смесью золетила и ксилазина в дозе 3 мг/кг каждого препарата, производили первичную хирургическую обработку раны, накладывали асептическую повязку. В здоровую тазовую конечность внутримышечно вводили гентамицин из расчета 3 мг/кг массы животного.

В дальнейшем в течение 7 суток ежедневно делали перевязки раны с применением антисептических средств (0,02%-й раствор хлоргексидина) и наложением повязок с мазями на водорастворимой основе (левомеколь, мазь для наружного

применения), внутримышечным введением гентамицина в той же дозе (3 мг/кг ежедневно) [5, 6].

Через 7, 14 и 28 суток после нанесения взрывной травмы мягких тканей с острой кровопотерей проводили оценку общего состояния животных с определением сроков заживления ран, анализировали динамику показателей крови, состояние микроциркуляции и метаболизма в мягких тканях области повреждения. Показатели крови определяли с помощью гематологического анализатора Abacus Junior 30 (Diatron, Венгрия), измеряли количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, концентрацию гемоглобина и гематокрит.

Микроциркуляцию и метаболизм мягких тканей области повреждения исследовали методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с использованием лазерного анализатора кровотока «ЛАКК-М» (ООО НПП «Лазма», Россия) со специальным программным обеспечением для автоматического анализа показателей. Непосредственно перед исследованием крыс наркотизировали, внутримышечно вводили по 10 мг/кг массы животного золетила и ксилазина. Животных фиксировали, удаляли лоскут кожи в области бедра до слоя мышц, отступя 5–8 мм от края раны. С помощью подставки устанавливали оптико-волоконный зонд прибора диаметром 3 мм в красном канале лазерного излучения (длина волны 630 нм) перпендикулярно поверхности мышц в 2–3 мм от края раны (рис. 1), на хвосте фиксировали датчик пульсоксиметра. Продолжительность исследования составила 10 мин [7, 8].

В ходе исследования измеряли и анализировали показатели микроциркуляции:



Рис. 1. Оценка микроциркуляции и метаболизма в скелетных мышцах паравульнарной области при взрывной травме (датчик прибора установлен на мышце паравульнарной области)

Fig. 1. Evaluation of microcirculation and metabolism in skeletal muscles of the paravulnar region in explosive trauma (device sensor is installed on paravulnar region muscle)

1. Постоянную составляющую перфузии (M , измеряется в перфузионных единицах (пф. ед.) – среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции). Увеличение M свидетельствует об улучшении микроциркуляции.

2. Переменную составляющую перфузии (σ , пф. ед.) – среднее квадратичное отклонение амплитуды колебаний кровотока от среднего арифметического значения M . Показатель σ характеризует временную изменчивость перфузии, отражая среднюю модуляцию кровотока, его увеличение свидетельствует о более интенсивном функционировании механизмов активного контроля микроциркуляции.

3. Коэффициент вариации (K_v , %) (рассчитывается программой прибора по формуле:

$$K_v = (\sigma/M) \times 100 \%$$

Его увеличение в динамике отражает улучшение состояния микроциркуляции в исследуемой ткани [9–11].

С помощью спектрофотометрического канала прибора определяли показатель относительного уровня кислородной сатурации микроциркуляторного русла ткани (SO_2 , %), индекс перфузионной сатурации кислорода в крови (S_m , усл. ед.) ($S_m = SO_2/M$), показатель уровня кислородной сатурации артериальной крови (SpO_2 , %) и индекс удельного потребления кислорода в ткани (U , усл. ед.) ($U = SpO_2/SO_2$). Значение S_m характеризует связь между перфузией в микроциркуляторном русле и количеством неиспользованного тканями кислорода, его увеличение свидетельствует об уменьшении потребления кислорода тканями. Значение U отражает общее потребление кислорода на единицу ОЦК, а его увеличение указывает на высокую активность захвата кислорода тканью.

Методом лазерной флуоресценции определяли амплитуду флуоресценции NADH (A_{NADH} , усл. ед.) и FAD (A_{FAD} , усл. ед.). NADH и FAD – единственные способные к флуоресценции переносчики электронов, которые играют ключевую роль в реакциях энергетического обмена (гликолиз и окислительное фосфорилирование), причем основная масса NADH образуется при гликолизе, а FAD – при окислительном фосфорилировании. Для комплексной оценки метаболической активности тканей в ручном режиме рассчитывали флуоресцентный показатель потребления кислорода (ФПК, усл. ед.) по формуле:

$$\text{ФПК} = A_{NADH}/A_{FAD},$$

а для оценки метаболизма с учетом микроциркуляторных показателей (перфузия, потребление кислорода) определяли показатель эффективного кислородного обмена (ЭКО, отн. ед.) по формуле:

$$\text{ЭКО} = M \times U \times \text{ФПК}.$$

Увеличение ФПК и ЭКО отражало повышение метаболической активности тканей и потребления кислорода [7]. В качестве значений нормы служили данные, полученные у интактных животных.

На предварительном этапе статистического анализа данные оценивали на нормальность распределения с помощью критериев Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Переменные представлены при нормальном распределении в виде среднего арифметического и ошибки среднего ($M \pm m$), при распределении, отличном от нормального, – в виде медианы, нижнего и верхнего квартиля (Me (LQ; UQ)), для оценки различий использовали соответственно t-критерий Стьюдента и критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

В течение всего периода наблюдения (28 суток) гибели животных не было. В первые 3–5 суток после нанесения травмы крысы малоподвижные, вялые, большую часть времени лежат в углу клетки, мало потребляют воду и пищу. В дальнейшем, начиная с 7-х суток, состояние животных постепенно улучшалось, они становились подвижными, активно передвигались по клетке, пили воду и употребляли корм в необходимом объеме.

После нанесения взрывной травмы полученная рвано-лоскутная рана мягких тканей бедра имела дефект кожи, подкожно-жировой клетчатки, фасции и мышц в центре, была умеренно загрязнена продуктами неполного сгорания взрывного заряда и цементно-силикатной смеси, кусками оболочки заряда (картон), обрывками поврежденных тканей и шерстью. Площадь раны кожи и подкожно-жировой клетчатки со-



Рис. 2. Внешний вид экспериментальной взрывной раны у крысы

Fig. 2. Appearance of an experimental explosive wound in a rat

ставляла в среднем $6,9 \pm 0,3 \text{ см}^2$, а раны мышц и фасции – $1,1 \pm 0,2 \text{ см}^2$, раневой канал имел длину $1,5 \pm 0,1 \text{ см}$ (рис. 2).

Взрывная травма мягких тканей тазовой конечности с острой кровопотерей вызывала незначительные изменения показателей крови. Количество эритроцитов во все сроки наблюдения находилось в пределах нормальных значений, а содержание гемоглобина через 7 суток после нанесения травмы снижалось на 22 % ($p < 0,05$) с последующим восстановлением уже на 14-е сутки (табл. 1). Уменьшение концентрации гемоглобина при нормальном количестве эритроцитов характеризует легкую степень острой кровопотери, при которой количество эритроцитов не всегда успевает снизиться [12, 13]. Гематокрит на 7-е сутки после травмы незначительно возрастал ($p < 0,05$), что свидетельствовало о гемоконцентрации, связанной с потерей жидкой части крови через раневую поверхность, а затем,

Таблица 1. Количественные показатели крови у крыс с экспериментальной взрывной травмой мягких тканей тазовой конечности, $M \pm m$

Table 1. Quantitative blood parameters in rats with experimental explosive trauma of the soft tissues of the pelvic limb, $M \pm m$

Показатель	Интактная группа, $n = 11$	Основная группа, $n = 31$ (время после травмы)		
		7 суток	14 суток	28 суток
Содержание эритроцитов, $\times 10^{12}/\text{л}$	$8,8 \pm 0,8$	$8,9 \pm 0,9$	$8,9 \pm 0,9$	$8,8 \pm 0,8$
Содержание гемоглобина, г/л	$157,2 \pm 4,3$	$123,6 \pm 4,8^*$	$148,3 \pm 4,7$	$150,0 \pm 4,6$
Гематокрит, %	$45,7 \pm 2,5$	$59,3 \pm 2,8^*$	$45,7 \pm 2,1$	$46,8 \pm 2,9$
Содержание лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	$9,2 \pm 1,1$	$18,9 \pm 1,2^*$	$20,4 \pm 1,2^*$	$7,8 \pm 1,2$
Содержание тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	$359,4 \pm 8,9$	$979,7 \pm 9,5^*$	$806,1 \pm 9,2^*$	$587,0 \pm 8,9^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя интактных животных статистически значимо при $p < 0,05$.

на 14–28-е сутки, восстанавливался до нормальных значений. Взрывная травма с кровопотерей приводила к увеличению количества лейкоцитов в крови в 2,1 раза ($p < 0,05$), которое достигало максимальных значений на 7–14-е сутки, что указывало на системную противовоспалительную реакцию организма. Количество тромбоцитов крови было повышено во все сроки наблюдения с максимальным значением на 7-е сутки (в 2,7 раза, при $p < 0,05$) относительно интактных животных. Увеличение содержания тромбоцитов способствует повышению вязкости крови и риску возникновения тромбоза (см. табл. 1).

Состояние скелетных мышц поврежденной конечности у крыс в ранний посттравматический период характеризовалось существенным угнетением микроциркуляции в зоне поражения. Так, через 7 суток после нанесения травмы показатель постоянной составляющей перфузии (M) в поврежденных тканях животных был снижен на 41 % ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными, с последующим незначительным его восстановлением к 28-м суткам (табл. 2). Аналогичная динамика установлена при оценке переменной составляющей перфузии (σ) кровотока, величина которой была снижена во все сроки наблюдения, достигая минимальных значений (в 3,3 раза при $p < 0,05$) к 7-м суткам, что свидетельствовало о резком угнетении механизмов активного контроля микроциркуляции. Коэффициент вариации K_v во все сроки наблюдения был на 36–51 % ($p < 0,05$) меньше, чем у животных из интактной группы, причем минимальная величина показателя наблюдалась на 28-е сутки. Снижение значений показателей микроциркуляции в мышцах паравульнарной области свидетельствует об уменьшении микрокровотока в поврежденных и восстанавливаемых тканях (см. табл. 2).

Наиболее выраженные сдвиги выявлялись при оценке индекса S_m , отражающего отношение насыщенности кислородом тканей к состоянию микроциркуляции, а также индекса U в качестве критерия общего потребления кислорода на единицу ОЦК. В течение всего периода наблюдения отмечалось статистически значимое увеличение показателя S_m в 3,0–3,9 раза (при $p < 0,05$), причем к исходу 28-х суток он был на 25 % меньше ($p < 0,05$), чем в раннем посттравматическом периоде. Противоположная динамика наблюдалась в изменении индекса U (относительно показателя S_m), который был снижен относительно интактных животных в 2,3 и 2,0 раза ($p < 0,05$) на 7-е и 28-е сутки соответственно. К исходу периода наблюдения (28 суток) показатели, свидетельствующие о состоянии потребления кислорода тканями, не восстанавливались до нормальных значений (см. табл. 2).

Амплитудные характеристики излучения флуоресценции NADH и FAD, отражающие интенсивность метаболических процессов в тканях, показали, что в области повреждения мышц наблюдалось уменьшение ФПК в 1,6–2,5 раза ($p < 0,05$) на протяжении всего периода наблюдения (28 суток) с максимально низким его значением на 14-е сутки (см. табл. 2), что указывает на незначительную активность метаболических процессов в поврежденных мышцах в эти сроки. Аналогичная тенденция наблюдалась в динамике изменений интегрального показателя ЭКО, который в первые 14 суток снижался в среднем в 8,5 раза ($p < 0,05$), с последующим восстановлением до 16,9 (16,4; 17,6) отн. ед. к концу периода наблюдения, что в 4,8 раза меньше ($p < 0,05$), чем у интактных животных (см. табл. 2).

В целом ранний посттравматический период характеризовался выраженными нарушениями

Таблица 2. Показатели микроциркуляции, потребления кислорода, кислородного статуса и метаболизма в мышцах паравульнарной области у крыс после экспериментальной взрывной травмы мягких тканей тазовой конечности, Me (LQ; UQ)

Table 2. Parameters of microcirculation, oxygen consumption, oxygen status and metabolism in paravulnar region muscles in rats after experimental explosive trauma of pelvic limb soft tissues (Me (LQ; UQ))

Показатель	Интактная группа, $n = 11$	Основная группа, $n = 31$ (время после травмы)		
		7 суток	14 суток	28 суток
M , пф. ед.	11,9 (11,1; 12,8)	6,5* (6,1; 6,9)	7,9* (7,4; 8,6)	8,1* (7,6; 8,8)
σ , пф. ед.	1,62 (1,56; 1,70)	0,49* (0,46; 0,54)	0,69* (0,65; 0,76)	0,54* (0,51; 0,59)
K_v , %	13,6 (12,8; 14,6)	7,5* (7,0; 8,2)	8,7* (8,2; 9,5)	6,7* (6,3; 7,4)
S_m , усл. ед.	2,7 (2,5; 2,9)	10,6* (10,0; 11,2)	8,7* (8,2; 9,5)	8,0* (7,5; 8,6)
U , усл. ед.	3,10 (2,94; 3,41)	1,33* (1,27; 1,41)	1,39* (1,34; 1,47)	1,52* (1,40; 1,66)
ФПК, усл. ед.	2,20 (2,11; 2,26)	1,08* (1,02; 1,16)	0,88* (0,83; 0,94)	1,37* (1,28; 1,44)
ЭКО, отн. ед.	81,2 (79,9; 82,8)	9,3* (8,9; 9,8)	9,7* (9,3; 10,2)	16,9* (16,4; 17,6)

в поврежденных мышцах. Показатель перфузии (M) в поврежденных тканях животных, переменная составляющая перфузии (σ) значительно снижались. Превышение индекса перфузионной сатурации кислорода в микрокровотока (S_m) с одновременным уменьшением индекса удельного потребления кислорода тканью (U) отражало ухудшение обеспечения кислородом мышц в области повреждения. Флуоресцентный показатель потребления кислорода тканями (ФПК) и интегральный показатель эффективности кислородного обмена (ЭКО) существенно снижались, что свидетельствовало о слабой утилизации кислорода тканями и низком уровне метаболизма. Дополнительная кровопотеря, подтвержденная лабораторными исследованиями, приводила к уменьшению ОЦК и, следовательно, венозного возврата и сердечного выброса, что на фоне повреждения мягких тканей усугубляло гипоперфузию тканей. Выявленные нарушения микроциркуляции и метаболической активности в тканях сохранялись на протяжении всего периода эксперимента с незначительной положительной динамикой к 28-м суткам наблюдения.

Обсуждение

Раневой процесс при любой ране протекает по механизмам, включающим три обязательных компонента: воспаление, регенерация и эпителизация. Каждая стадия представляет собой комплекс последовательных локальных изменений и сочетанных с ними разнообразных общих реакций, при этом в очаге альтиерации и прилежащих к нему тканях происходит изменение микроциркуляции. Поступление кислорода в рану и окружающие ткани прекращается, в результате чего анаэробный гликолиз сменяет аэробный [14].

В настоящем исследовании установлено, что все изученные микроциркуляторные и метаболические показатели в мышцах области повреждения существенно изменяются после нанесения взрывной травмы мягких тканей с острой кровопотерей. Значительное уменьшение величины M в первые 7 суток может быть связано с уменьшением объема крови и концентрации эритроцитов в венах и артериолах (около 60 % в ЛДФ-сигнал дают эритроциты из веноулярного звена), которые обусловлены повреждением сосудов микроциркуляторного звена кровообращения и невыраженным ангиогенезом в мышечной ткани. Уменьшение величины σ свидетельствует об угнетении активных вазомоторных механизмов модуляции тканевого кровотока или преобладании в регуляции тонических симпатических влияний [7, 9], снижение показателя K_v – об ухудшении состояния микроциркуляции, что происходит за счет

уменьшения величины σ в результате подавления эндотелиальной секреции, нейрогенного и миогенного механизмов контроля при практически неизменяющейся величине M [9, 11]. После незначительного подъема повторное ухудшение микроциркуляции (по данным K_v) наблюдалось к исходу периода наблюдения за счет уменьшения значений показателя σ , которое, возможно, обусловлено особенностями вазомоторной регуляции микрокровотока в мышечно-соединительнотканном регенерате.

Повышение индекса S_m (в 3,9 раза) и снижение индекса U (в 2,3 раза), преимущественно в ранние сроки (7 суток), относительно значений у интактных животных отражают значительное ухудшение кислородного питания поврежденных мышц на фоне снижения перфузии тканей, которое приводит к накоплению в крови нереализованного тканями кислорода. Наблюдаемое существенное уменьшение (в 1,6–2,5 раза) ФПК во все сроки исследования с максимально низким значением данного показателя к 14 суткам свидетельствует о слабой утилизации тканями кислорода и преобладании процессов анаэробного окисления. Отсутствие соответствия между ухудшением микрокровотока в поврежденных мышцах, потреблением кислорода и активностью метаболизма указывает на инерцию при восстановлении окислительных процессов в тканях после возобновления микроциркуляции. В общем восстановлении поврежденных мышц при взрывной травме происходит медленно и, по данным показателя ЭКО, к исходу 28-х суток составляет всего 21 % от исходных значений, что соответствует представлению о том, что полного восстановления кровотока, метаболизма в мышечной ткани после ее повреждения не наблюдается [15].

Снижение содержания гемоглобина и повышение гематокрита при острой кровопотере приводят к уменьшению ОЦК и нарушению доставки кислорода к поврежденным тканям. На фоне повреждения микрососудистого русла в результате взрывной травмы это приводит к еще большим нарушениям микроциркуляции и окислительного метаболизма скелетных мышц.

Заключение

Проблема раннего местного лечения повреждений мягких тканей при взрывной травме сохраняет актуальность. Проведенное нами экспериментальное исследование показало, что раневой процесс при взрывной травме мягких тканей характеризуется длительными сроками заживления ран, разнонаправленными нарушениями микроциркуляции и метаболизма в тканях паравульнарной области. Это связано с выраженным

разрушением скелетных мышц и затянувшейся фазой воспаления с последующим формированием неполноценного мышечно-соединительно-тканного регенерата, в котором преобладает рубцовая ткань. Микроциркуляторные расстройства характеризуются синхронным снижением перфузии скелетной мускулатуры, прогрессирующим падением обеспечения и утилизации кислорода поврежденными тканями, угнетением активности окислительно-восстановительных процессов. Выраженные нарушения в поврежденных мышцах формируются в ранний посттравматический период (первые 7 суток) и сохраняются с незначительной позитивной динамикой вплоть до полного заживления. Полученные данные служат патогенетическим обоснованием разработки эффективных средств коррекции микроциркуляторных и метаболических нарушений в мышцах при взрывной травме в посттравматическом периоде.

Список литературы / References

1. Шаповалов В.М., Грицанов А.И., Сорокин А.А., Большаков О.В. Взрывные поражения при техногенных катастрофах и террористических актах. СПб.: Морсар АВ, 2001. 224 с.
Shapovalov V.M., Gritsanov A.I., Sorokin A.A., Bolshakov O.V. Explosive damage in man-made disasters and terrorist acts. Saint-Petersburg: Morsar AV, 2001. 224 p. [In Russian].
2. Магарамов М.А., Халилюлин Р.И., Исаханова М.М. Минно-взрывные поражения: учебно-методическое пособие. Махачкала, 2010. 54 с.
Magaramov M.A., Khalilyulin R.I., Isakhanova M.M. Mine explosive defeats: Study guide. Makhachkala, 2010. 54 p. [In Russian].
3. Нечаев Э.А., Грицанов А.И., Фомин Н.Ф., Миннулин И.П. Минно-взрывная травма. СПб.: Альд, 1994. 488 с.
Nechaev E.A., Gritsanov A.I., Fomin N.F., Minnullin I.P. Mine explosive trauma. Saint-Petersburg: Ald, 1994. 488 p. [In Russian].
4. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев: Вища школа, 1983. 383 с.
Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakhariya E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in the experiment. Kiev: Vishcha shkola, 1983. 383 p. [In Russian].
5. Ивануса С.Я., Зубарев П.Н., Рисман Б.В., Литвинов О.А. Современные принципы лечения гнойных ран: учебное пособие для слушателей факультета подготовки врачей и ординаторов по специальности «Хирургия». СПб.: Онли-Пресс, 2017. 20–33.
Ivanusa S.Ya., Zubarev P.N., Risman B.V., Litvinov O.A. Modern principles of treatment of purulent wounds: Study guide for students of the faculty of training doctors and residents in the specialty «Surgery». Saint-Petersburg: Onli-Press, 2017. 20–33. [In Russian].
6. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские национальные рекомендации. М., 2015. 111 с.
Surgical infections of the skin and soft tissues. Russian national recommendations. Moscow, 2015. 111 p. [In Russian].
7. Крупаткин А.И. Функциональная оценка периваскулярной иннервации конечностей с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. *Физиол. человека*. 2004; 30 (1): 99–104.
Krupatkin A. I. Functional evaluation of the perivascular innervation of the skin of the extremities using laser doppler flowmetry. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology (Hum. Physiol.)*. 2004; 30 (1): 99–104.
8. Дуванский В.А., Овсянников В.С., Бирюков А.Ю. Оценка микроциркуляции гнойных ран. *Лазер. мед.* 2016; 20 (3): 102. doi:10.37895/2071-8004-2016-20-3-102
Duvansky V.A., Ovsyannikov V.S., Biryukov A.Yu. Assessment of microcirculation of purulent wounds. *Lazernaya meditsina = Laser Medicine*. 2016; 20 (3): 102. [In Russian]. doi:10.37895/2071-8004-2016-20-3-102
8. Козлов В.И. Система микроциркуляции крови: клинко-морфологические аспекты изучения. *Регионар. кровообращ. и микроциркуляция*. 2006; 5 (1): 84–101.
Kozlov V.I. Blood microcirculation system: clinical and morphological aspects of the study. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya = Regional Blood Circulation and Microcirculation*. 2006; 5 (1): 84–101. [In Russian].
9. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: Руководство для врачей. Ред. А.И Крупаткин, В.В. Сидоров. М.: Медицина, 2005. 256 с.
Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation: Manual for doctors. Eds. A.I. Krupatkin, V.V. Sidorov. Moscow: Meditsina, 2005. 256 p. [In Russian].
10. Крупаткин А.И. Колебания кровотока – новый диагностический язык в исследовании микроциркуляции. *Регионар. кровообращ. и микроциркуляция*. 2014; 13 (1): 83–99. doi:10.24884/1682-6655-2014-13-1-83-99
Krupatkin A.I. Fluctuations of blood flow - a new diagnostic language in the study of microcirculation. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya = Regional Blood Circulation and Microcirculation*. 2014; 13 (1): 83–99. [In Russian]. doi:10.24884/1682-6655-2014-13-1-83-99
11. Рыжков И.А., Заржецкий Ю.В. Влияние циркуляторной и гемической гипоксии на микроциркуляцию в коже. *Регионар. кровообращ.*

и микроциркуляция. 2018; 17 (2): 64–70. doi: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-64-70

Ryzhkov I.A., Zarzhetsky Yu.V. Influence of circulatory and hemic hypoxia on cutaneous microcirculation. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya = Regional Blood Circulation and Microcirculation*. 2018; 17 (2): 64–70. [In Russian]. doi: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-64-70

12. Ермолов А.С., Сахарова Е.А., Худенко Н.В., Тихомирова Н.И., Хватов В.Б. Количественная оценка объема и степени тяжести интраоперационной кровопотери в хирургической практике. *Гематол. и трансфузиол.* 2005; 50 (4): 27–32.

Ermolov A.S., Sakharova E.A., Khudenko N.V., Tikhomirova N.I., Khvatov V.B. Quantitation of the volume and degree of severity of intraoperative blood loss in surgical practice. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology*. 2005; 50 (4): 27–32. [In Russian].

13. Цыбуляк Г.Н. Общая хирургия повреждений: Руководство для врачей. СПб.: Гиппократ, 2005. 648 с.

Tsybulyak G.N. General surgery of injuries: Guide for doctors. Saint-Petersburg: Gippokrat, 2005. 648 p. [In Russian].

14. Раны и раневая инфекция: Руководство для врачей. Ред. М.И. Кузин, Б.М. Костюченко. М.: Медицина, 1990. 592 с.

Wounds and wound infection: Guide for doctors. Ed. M.I. Kuzin, B.M. Kostyuchenok. Moscow: Meditsina, 1990. 592 p. [In Russian].

15. Одинцова И.А. Современные аспекты гистологического анализа раневого процесса. В кн.: Вопросы морфологии XXI века. СПб.: ДЕАН, 2015; (4): 51–53.

Odintsova I.A. Modern aspects of the histological analysis of the wound process. In: Questions of morphology of the XXI century. Saint-Petersburg: DEAN, 2015; (4): 51–53. [In Russian].

Сведения об авторах:

Игорь Алексеевич Шперлинг, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-7029-8602, e-mail: shperling1@yandex.ru

Михаил Владимирович Виноградов, ORCID: 0000-0001-5826-6061, e-mail: mikhail.vinogradov@mail.ru

Роман Владимирович Семакин, ORCID: 0000-0001-9991-714X, e-mail: rtrli@yandex.ru

Наталья Владимировна Шперлинг, д.м.н., ORCID: 0000-0002-7865-486X, e-mail: Shperling2@yandex.ru

Александр Васильевич Шулепов, к.м.н., ORCID: 0000-0002-6134-809X, e-mail: soash@mail.ru

Сергей Олегович Ростовцев, ORCID: 0000-0002-1037-5848, e-mail: chitah_serge@live.com

Антон Сергеевич Коуров, ORCID: 0000-0001-5905-2501, e-mail: anton.kourov@gmail.com

Михаил Васильевич Баженов, ORCID: 0000-0003-2201-3948, e-mail: bagen.mik@yandex.ru

Information about the authors:

Igor A. Shperling, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-7029-8602, e-mail: shperling1@yandex.ru

Mikhail V. Vinogradov, ORCID: 0000-0001-5826-6061, e-mail: mikhail.vinogradov@mail.ru

Roman V. Semakin, ORCID: 0000-0001-9991-714X, e-mail: rtrli@yandex.ru

Natalia V. Shperling, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-7865-486X, e-mail: Shperling2@yandex.ru

Alexander V. Shulepov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-6134-809X, e-mail: soash@mail.ru

Sergey O. Rostovtsev, ORCID: 0000-0002-1037-5848, e-mail: chitah_serge@live.com

Anton S. Kourov, ORCID: 0000-0001-5905-2501, e-mail: anton.kourov@gmail.com

Mikhail V. Bazhenov, ORCID: 0000-0003-2201-3948, e-mail: bagen.mik@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.05.2021

Принята к публикации 04.06.2021

Received 09.05.2021

Accepted 04.06.2021

Влияние окисленного декстрана на гепатоциты крыс при токсическом гепатозе смешанной этиологии

В.А. Шкурупий^{1,2}, М.А. Карпов^{1,2}, В.Д. Клочин¹

¹ *ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

² *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52*

Резюме

Цель исследования – изучить эффективность окисленного декстрана (ОД) в защите от повреждения паренхимы печени при сочетанном остром и хроническом токсическом воздействии растворов этилового спирта и тетрахлорметана. **Материал и методы.** 150 крысам-самцам породы Вистар интраперитонеально вводили токсиканты – 50%-й раствор CCl_4 на оливковом масле и 5%-й водный раствор окисленного декстрана (ОД) с молекулярной массой 40 кДа, перорально – 6,5%-й водный раствор этилового спирта. Тетрахлорметан вводили один раз в день, затем три дня по одному разу – только водный раствор этилового спирта, последний не вводили в дни назначения тетрахлорметана и ОД. Животные получали ОД с 1-го дня введения токсикантов в течение 60 суток. В следующие 30 дней не назначали токсиканты, но вводили ОД. **Результаты и их обсуждение.** У животных, которым вводили только токсиканты, наблюдали гепатоциты в состоянии вакуольной дистрофии, занимавшие несколько больше 40 % паренхимы органа, и гепатоциты в состоянии некроза, занимавшие от 37 до 28 % паренхимы в разные периоды наблюдений. Включение ОД в схему профилактики некротических осложнений уменьшало их в 3–4 раза по сравнению с животными, не получавшими ОД. Эти данные свидетельствуют о высокой гепатопротекторной эффективности ОД.

Ключевые слова: печень, токсический гепатоз, окисленный декстран, гепатопротекторы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Шкурупий В.А., e-mail: sck@centercem.ru

Для цитирования: Шкурупий В.А., Карпов М.А., Клочин В.Д. Влияние окисленного декстрана на гепатоциты крыс при токсическом гепатозе смешанной этиологии. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 25–30. doi: 10.18699/SSMJ20210503

Effect of oxidized dextran on rat hepatocytes in toxic hepatitis of mixed etiology

V.A. Shkurupiy^{1,2}, M.A. Karpov^{1,2}, V.D. Klochin¹

¹ *Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

² *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

Abstract

The aim of research was to study the oxidized dextran protection effect against hepatic parenchyma defect at combined acute and chronic toxicity of ethyl alcohol and tetrachloromethane solutions. **Materials and methods.** 150 male Wistar rats were injected by toxicants with intraperitoneal administration: 50 % CCl_4 in olive oil solution and 5 % oxidized dextran (OD) aqueous solution with molecular weight 40 kDa and peroral 6.5 % ethyl alcohol aqueous solution. Tetrachloromethane was injected once a day, and then only ethyl alcohol aqueous solution was administered 1 time per day during 3 days. The ethyl alcohol aqueous solution was not administered on the days of the of tetrachloromethane and OD injections. OD has been administered from the 1st day of the toxicants injection till 60 days. OD without toxicants has been injected for the next 30 days. **Results and discussion.** In animals that were injected only with toxicants, hepatocytes were in a state of vacuolar dystrophy, which occupied slightly more than 40 % of the organ parenchyma, and

hepatocytes in a state of necrosis, which occupied from 37 to 28 % of the parenchyma at different periods of observation. The OD inclusion in the scheme for the prevention of necrotic complications reduced them from 3 to 4 times more than in animals that did not receive OD. The data obtained indicate the OD high hepatoprotective effectiveness.

Key words: liver, toxic hepatitis, oxidized dextran, hepatoprotectors.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Shkurupiy V.A., e-mail: स्क@centercem.ru

Citation: Shkurupiy V.A., Karpov M.A., Klochin V.D. Effect of oxidized dextran on rat hepatocytes in toxic hepatitis of mixed etiology. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 25–30. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210503

Введение

Печень – основной орган гомеостазирования у млекопитающих, одна из важнейших выполняемых им функций – детоксикационная. Ее неэффективность сопряжена с развитием дистрофических и некротических процессов в гепатоцитах и, как следствие, постнекротического фиброирования органа. Постоянное увеличение количества промышленных токсикантов в сочетании с высоким уровнем потребления алкогольной продукции приводит к возрастанию частоты острых и хронических токсических поражений печени [1]. Около 2 млрд людей в мире кроме промышленных токсикантов потребляют различного рода спиртные напитки и около 76 млн страдают заболеваниями, связанными с их потреблением [2]. Длительное, повторяющееся повреждение печени токсическими веществами в 20 % случаев приводит к хронизации патологического процесса, фиброзу и циррозу [3]. Смертность от токсических поражений печени достигла 59 % и ежегодно растет [4]. В настоящее время эффективные методы профилактики и лечения цирроза отсутствуют, а процесс фиброза печени считается необратимым [5]. Гипотетически одним из вероятных способов профилактики фиброза и цирроза (кроме санитарно-гигиенических мероприятий) является профилактика деструктивных (некроз) изменений клеток в паренхиме печени. Решение этой проблемы представляется проблематичным, поскольку согласно канонам общей патологии клетки в состоянии дистрофии «обречены» на гибель механизмом некроза. Однако академик Д.С. Саркисов [6] не исключал возможность профилактики гибели клеток путем развития внутриклеточной регенерации. Очевидно одно: регенерировать могут живые клетки с поврежденными структурами цитоплазмы, т.е. в состоянии дистрофии. Но доказательная база этого представляется сложной.

В настоящее время существует широкий перечень гепатопротективных препаратов, обладающих защитными свойствами, механизм влияния которых недостаточно изучен [7]. Ранее

нами показано уменьшение некротических и дистрофических изменений гепатоцитов до 80 % и отсутствие токсичности окисленного декстрана (ОД) при его использовании в эксперименте [8, 9]. Цель настоящего исследования заключалась в изучении эффективности ОД в защите от повреждения паренхимы печени при сочетанном остром и хроническом токсическом воздействии растворов этилового спирта и тетрахлорметана.

Материал и методы

Исследование проводили на 150 крысах-самцах породы Wistar с массой тела 280–320 г, полученных из вивария ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики и принципами гуманного обращения с лабораторными животными. Крыс содержали при оптимальном температурном режиме, они имели свободный доступ к воде и пище.

Токсический гепатоз моделировали путем интраперитонеального введения 50%-го раствора четыреххлористого углерода в оливковом масле и перорального введения 6,5%-го водного раствора этилового спирта [10]. Модель была нами модифицирована с целью снижения числа летальных исходов: CCl_4 вводили 1 раз в 4 суток, на следующие сутки после введения тетрахлорметана крысы в течение трех дней получали *per os* этиловый спирт.

Растворы этилового спирта и CCl_4 в соотношении 1:1 вводили до 60-х суток поочередно: 1 день – CCl_4 , 3 дня – этилового спирта. Кроме того, интраперитонеально вводили 5%-й водный раствор ОД (молекулярная масса 40 кДа). Раствор этилового спирта не назначали в дни введения растворов CCl_4 и ОД. Животные были разделены на пять групп, по 10 особей на каждый срок.

В 1-ю группу вошли интактные крысы. Во второй группе (нелеченные) животным в первые сутки вводили раствор CCl_4 из расчета 1 мл/кг массы тела, на 2-е, 3-и и 4-е сутки – водно-спиртовой раствор из расчета 2 мл на особь из поилки.

Цикл и последовательность введения повторяли до 60-х суток, материал для исследования получали на 31-е, 61-е и 91-е сутки. Крысы третьей группы (леченные с первых суток) получали растворы CCl_4 и этилового спирта по аналогичным циклам до 60-го дня, дополнительно в те же дни, что и водно-спиртовой раствор – внутривенно 5%-й водный раствор ОД из расчета 2 мл на особь, материал для исследования забирали на 31-е и 61-е сутки. Животным 4-й группы (леченные с 30 суток) токсиканты вводили в том же режиме, что и крысам 3-й группы, раствор ОД назначали с 30-х суток по 60-е сутки, материал для исследования получали на 61-е и 91-е сутки. Крысы 5-й группы получали растворы CCl_4 , этилового спирта и ОД в аналогичном режиме, при этом с 60-х по 90-е сутки – дополнительно раствор ОД, материал для исследования получали на 91-е сутки.

Перед забором образцов печени животных вводили в состояние наркоза путем внутримышечного введения смеси растворов тилетамина и золазепама по 5 мг/мл (10 мкл / кг массы тела), после чего производили декапитацию. Образцы печени фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, обезжизняли в спиртах возрастающей концентрации и заключали в парафин. Из каждого образца на микроме Microm HM 355S (Ther-

mo Fisher Scientific, США) готовили по 4–6 срезов толщиной 5–6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином [11, 12]. Морфологическое и морфометрическое исследование печени проводили с использованием светового микроскопа AxioStar (Carl Zeiss, Германия); при помощи тестовой системы из 25 точек (16 квадратов) подсчитывали численные плотности двуядерных гепатоцитов (Nai), в единице тестовой площади 1600 мкм² определяли объемные плотности (Vv) гепатоцитов в состоянии дистрофии и некрозов [13, 14].

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При исследовании результатов у крыс из 2-й группы (нелеченные) обнаружили гепатоциты в состоянии вакуольной дистрофии, которые занимали от 42 до 47 % паренхимы печени в разные периоды исследования (таблица). Некротизированные гепатоциты располагались в паренхиме печени диссеминированно, так же как и дистро-

Таблица. Структурные преобразования в паренхиме печени крыс, леченных ОД, при остром и хроническом токсическом гепатозах

Table. Structural changes in the liver parenchyma of rats treated with oxidized dextran in acute and chronic toxic hepatitis

Показатель	Группа	Время после начала токсического воздействия, сут		
		30	60	90
Объемная плотность (Vv) дистрофически измененных гепатоцитов, %	1-я группа	1,6 ± 0,29	–	–
	2-я группа	42,2 ± 0,41	42,3 ± 1,15	47,4 ± 1,38
	3-я группа	58,3 ± 1,64*	62,9 ± 1,37*	–
	4-я группа	–	60,4 ± 1,32*	71,1 ± 1,18*
	5-я группа	–	–	57,9 ± 1,51*
Объемная плотность (Vv) некротизированных гепатоцитов, %	1-я группа	0,3 ± 0,13	–	–
	2-я группа	36,9 ± 1,51	27,2 ± 1,31	28,2 ± 1,17
	3-я группа	12,9 ± 1,14*	13,7 ± 0,96*	–
	4-я группа	–	9,6 ± 0,65*	7,3 ± 0,67*
	5-я группа	–	–	10,4 ± 1,05*
Количество (Nai) двуядерных гепатоцитов	1-я группа	0,6 ± 0,08	–	–
	2-я группа	0,5 ± 0,07	0,6 ± 0,08	0,3 ± 0,06
	3-я группа	0,6 ± 0,07	0,4 ± 0,05*	–
	4-я группа	–	1,0 ± 0,12*	0,6 ± 0,08*
	5-я группа	–	–	0,8 ± 0,14*

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0,05$.

фически измененные гепатоциты, таких клеток было меньше (37, 27 и 28 % паренхимы органа на 30-е, 60-е и 90-е сутки эксперимента соответственно) (см. таблицу). Эти данные свидетельствуют о том, что не все дистрофически измененные клетки некротизируются даже через достаточно большой срок после воздействия повреждающих факторов. У животных, получавших токсиканты и ОД, наблюдали гепатоциты в состоянии вакуольной дистрофии, которые были крупнее, чем гепатоциты в норме, и у крыс, получавших токсиканты, – видимо, поскольку они пиноцитировали большое количество лизосомотропного [15, 16] ОД, такие клетки занимали от 60 до 70 % паренхимы органа (см. таблицу). При этом объемная плотность некротически измененных гепатоцитов у животных, получавших с токсикантами ОД, была в 3–4 раза меньше, чем у крыс, которым ОД не вводили (см. таблицу).

Из приведенных данных очевидно, что ОД обладает выраженными гепатопротекторными свойствами и способствует стимуляции процессов внутриклеточной репаративной регенерации, о возможности которой у млекопитающих писал академик Д.С. Саркисов [6]. О том, что это не результат активации деления гепатоцитов, косвенно свидетельствует отсутствие увеличения численной плотности двуядерных гепатоцитов (см. таблицу) – результата эндомиозов.

Очевидно, что эти свойства ОД сопряжены с его лизосомотропностью [17]. Ранее нами показано, что ОД способен стимулировать репаративные процессы в печени при профилактическом его введении мышам, зараженным вирусами птичьего гриппа [17], а также в составе противотуберкулезной композиции [9], но механизмы этого плохо изучены. Для исследования развития процессов внутриклеточной репаративной регенерации нужна поврежденная, но живая клетка. Этим условиям отвечают гепатоциты в состоянии вакуольной дистрофии. Используемые в настоящем эксперименте токсиканты метаболизируются ферментами (оксигеназы смешанных функций) гепатоцитов, расположенными в гладком эндоплазматическом ретикулеуме. Продукты метаболизма токсикантов инициируют образование липидных перекисей в мембранах гладкого эндоплазматического ретикулума, и в первую очередь повреждают его мембраны, проницаемость которых увеличивается. Это и формирует «картину» вакуольной дистрофии. Данные соединения в своих патогенных эффектах «короткодистантны». Нами показано (электронно-микроскопически), что на ранних стадиях действия CCl_4 гранулярный эндоплазматический ретикулум, где произ-

водится синтез «для» гепатоцитов и на «экспорт», повреждается позднее гладкого [15].

Следует обратить внимание на еще один феномен, связанный с лизосомотропностью ОД. В связи с медленной биodeградируемостью (по результатам с тритиевой меткой) [9] ОД выводится из организма через 7 суток. Ранее в макрофагах мы наблюдали явление, названное нами феноменом пролонгированной персистенции лизосомотропных факторов разной природы, избирательно накапливающихся в вакуолярно-лизосомальном аппарате клеток в связи с медленным деградированием или при отсутствии такового [16]. Длительное (6 месяцев) лечение мышей противотуберкулезной композицией изониазида с ОД приводило к гипертрофии эпителиоидных клеток типа А в связи с гиперплазией их внутриклеточных мембран в 2 раза, прикрепленных рибосом – в 2 раза и свободных рибосом в полисомах – в 3 раза [18]. Поглощение перитонеальными макрофагами синтетических наноалмазов увеличивало их прорегенеративный потенциал, повышало экспрессию и секрецию лизосомальных протеаз – катепсина В и D, матриксных металлопротеиназ 1 и 9 [19]. ОД усиливает альтернативную активацию макрофагов [20]. Эти данные свидетельствуют о том, что феномен пролонгированной персистенции в вакуолярном аппарате клеток лизосомотропных веществ, если они не обладают деструктивными свойствами в отношении поглотивших их клеток, может проявляться неспецифической стимуляцией активности пластических процессов в них. Возможно, что данный феномен имел место и в гепатоцитах животных, получавших ОД на всем протяжении эксперимента, а не только в фагоцитирующих клетках.

Заключение

ОД обладает свойствами гепатопротектора и способностью стимулировать процессы внутриклеточной репаративной регенерации гепатоцитов после токсических повреждений печени. Эти свойства, видимо, могут проявиться способностью ОД профилактировать постдеструктивные фибротические осложнения в печени, но механизмы данного феномена требуют дальнейших исследований.

Список литературы / References

1. Альтшулер В.Б. Алкоголизм. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 264 с.
- Al'tshuler V.B. Alcoholism. Moscow: GJeO-TAR-Media, 2010. 264 p. [In Russian].

2. Global status report on alcohol 2004. Geneva: WHO, Department of Mental Health and Substance Abuse, 2004. 94 p.
3. Азжаргал Б., Батбаатар Г., Бира Н. Сравнительный анализ некоторых лабораторных показателей при алкогольном и вирусных гепатитах. *Сиб. мед. ж. (Иркутск)*. 2013; 118 (3): 38–40.
- Azzhargal B., Batbaatar G., Bira N. Comparative analysis of some laboratory parameters in alcoholic and viral hepatitis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2013; 118 (3): 38–40. [In Russian].
4. Shield K.D., Rylett M., Rehm J. Успехи и упущенные возможности общественного здравоохранения. Тенденции в потреблении алкоголя и смертности, относимой на счет алкоголя, в Европейском регионе ВОЗ, 1990–2014 гг. М.: Европейский офис ВОЗ по профилактике неинфекционных заболеваний и борьбе с ними, 2015. 81с.
- Shield K.D., Rylett M., Rehm J. Public health successes and missed opportunities trends in alcohol consumption and attributable deaths in the European Region WHO, 1990–2014. Moscow: WHO European Office for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases, 2015. 81 p. [In Russian].
5. Буко В., Лукивская О., Белоновская Е. Перспективы противofiброзной терапии хронических заболеваний печени. *Наука и инновации*. 2013; 130 (12): 56–60.
- Buko V., Lukivskaja O., Belonovskaja E. Prospects for anti-fibrotic therapy of chronic liver diseases. *Nauka i innovatsii = Science and Innovation*. 2013; 130 (12): 56–60. [In Russian].
6. Саркисов Д.С. Очерки по структурным основам гомеостаза. М.: Медицина, 1977. 351 с.
- Sarkisov D.S. Essays on the structural foundations of homeostasis. Moscow: Meditsina, 1977. 351 p. [In Russian].
7. Матвеев А.В. Анализ международных исследований по препаратам группы лекарств для печени. Симферополь: АРИАЛ, 2013. 384 с.
- Matveev A.V. Analysis of international studies on drugs in the group of drugs for the liver. Simferopol: ARIAL, 2013. 384 p. [In Russian].
8. Шкурупий В.А., Потапова О.В., Шаркова Т.В., Шестопалов А.М., Троицкий А.В. Влияние профилактического введения окисленного декстрана на процессы повреждения и репаративной регенерации в печени мышей после их инфицирования вирусом гриппа А/Н5N1. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2014; 158 (10): 485–490.
- Shkurupy V.A., Potapova O.V., Sharkova T.V., Shestopalov A.M., Troitskii A.V. Effects of preventive administration of oxidized dextran on liver injury and reparative regeneration in mice infected with influenza A/H5N1 virus. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 158: 483–488.
9. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. М.: РАМН, 2007. 536 с.
- Shkurupy V.A. Tuberculous granulomatosis. Cytophysiology and targeted therapy. Moscow: RAMN, 2007. 536 p. [In Russian].
10. Волчек В.С., Сотникова В.В., Колесникова К.И., Дохов О.В. Использование токсического действия тетрахлорметана при индуцировании экспериментального цирроза печени у кроликов и крыс. *Актуал. науч. исслед. в соврем. мире*. 2018; 43 (6): 124–128.
- Volchek V.S., Sotnikova V.V., Kolesnikova K.I., Dokhov O.V. The use of the toxic effect of carbon tetrachloride in the induction of experimental liver cirrhosis in rabbits and rats. *Aktual'nyye nauchnyye issledovaniya v sovremennom mire = Actual Scientific Research in the Modern World*. 2018; 43 (6): 124–128. [In Russian].
11. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника. М.: Медицина, 1996. 544 с.
- Sarkisov D.S., Perov Ju.L. Microscopic technique. Moscow: Meditsina, 1996. 544 p. [In Russian].
12. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: учебное пособие. *Арх. патол.* 2004; 66 (3): 61.
- Avtandilov G.G. Basic lines of quantitative pathological anatomy. Guide. *Arkhiv patologii = Archive of Pathology*. 2004; 66 (3): 61. [In Russian].
13. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
- Avtandilov G.G. Medical morphometry. Manual. Moscow: Meditsina, 1990. 384 p. [In Russian].
14. Weibel E.L. Stereological methods. London: Academ, 1979. 415 p.
15. Шкурупий В.А. Ультраструктура клеток печени при стрессе. Новосибирск: Наука, 1989. 140 с.
- Shkurupij V.A. Ultrastructure of liver cells under stress. Novosibirsk: Nauka, 1989. 140 p. [In Russian].
16. Шкурупий В.А., Курунов Ю.Н., Яковченко Н.Н. Лизосомотропизм – проблемы клеточной физиологии и медицины. Новосибирск, 1999. 289 с.
- Shkurupij V.A., Kurunov Ju.N., Jakovchenko N.N. Lysosomotropism – problems of cell physiology and medicine. Novosibirsk, 1999. 289 p. [In Russian].
17. Шкурупий В.А. Цитоморфологические аспекты патогенеза вирусного гриппа и его неспецифической профилактики. Новосибирск: Наука, 2019. 259 с.
- Shkurupij V.A. Cytomorphological aspects of viral influenza pathogenesis and its nonspecific prophylaxis. Novosibirsk: Nauka, 2019. 259 p. [In Russian].
18. Шкурупий В.А., Козяев М.А., Надеев А.П. Ультраструктура эпителиоидных клеток типа А при БЦЖ-гранулематозе и введении лизосомотропной формы изониазида. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2006; 141 (4): 474–477.

Shkurupiy V.A., Kozyaev M.A., Nadeev A.P. Ultrastructural characteristics of type A epithelioid cells during BCG-granulomatosis and treatment with lysosomotropic isoniazid. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006; 141: 487–490.

19. Нешадим Д.В., Архипов С.А., Шкурупий В.А. Ахраменко А.В., Троицкий А.В., Карпов М.А. Исследования влияния наноалмазов на прорегенеративный потенциал макрофагов *in vitro*. *Фундам. исслед.* 2015; 6 (2): 1222–1226.

Neshchadim D.V., Arkhipov S.A., Shkurupiy V.A. Akhramenko A.V., Troitsky A.V., Karpov M.A. Investigation of the effect of nanodiamonds on the regenerative potential of macrophages *in vitro*. *Fundamen-*

tal'nye issledovaniya = Fundamental research. 2015; 6 (2): 1222–1226. [In Russian].

20. Чечушков А.В., Кожин П.М., Зайцева Н.С., Лемза А.Е., Меньщикова Е.Б., Троицкий А.В., Шкурупий В.А. Окисленный декстран усиливает альтернативную активацию макрофагов мышей противоположных линий. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2015; 160 (12): 749–753.

Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Zaitseva N.S., Lemza A.E., Men'shchikova E.B., Troitskii A.V., Shkurupiy V.A. Oxidized dextran enhances alternative activation of macrophages in mice of opposite lines. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016; 160 (6). 783–786.

Сведения об авторах:

Вячеслав Алексеевич Шкурупий, проф., академик РАН, ORCID: 0000-0002-5078-4216, e-mail: sck@centercem.ru

Михаил Александрович Карпов, к.м.н., ORCID: 0000-0002-8200-3998, e-mail: karpov-ma@mail.ru

Виталий Дмитриевич Клочин, ORCID: 0000-0002-5418-1375, e-mail: klo4in@yandex.ru

Information about the authors:

Viacheslav A. Shkurupiy, professor, academician of the RAS, ORCID: 0000-0002-5078-4216, e-mail: sck@centercem.ru

Mikhail A. Karpov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-8200-3998, e-mail: karpov-ma@mail.ru

Vitalii D. Klochin, ORCID: 0000-0002-5418-1375, e-mail: klo4in@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.07.2021

Принята к публикации 19.09.2021

Received 31.07.2021

Accepted 19.09.2021

Изучение противовирусной активности рекомбинантного человеческого интерферона лямбда 1 на культуре клеток конъюнктивы человека

Н.А. Кихтенко¹, Т.Н. Ильичёва², А.Г. Дурьманов², А.Ж. Фурсова¹, П.Г. Мадонов¹

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

² Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Резюме

Цель исследования – определить эффективность рекомбинантного человеческого интерферона лямбда 1 (ИФН-λ1) в отношении аденовируса человека 5 серотипа на культуре клеток конъюнктивы человека Chang conjunctiva clone 1-5c-4. **Материал и методы.** Дизайн исследования представлял собой три экспериментальные схемы, отражающие профилактический и два варианта лечебно-профилактического режима лечения (с постоянным присутствием вируса в культуральной среде и с удалением его после адсорбции). Противовирусную активность ИФН-λ1 определяли по количеству жизнеспособных клеток после воздействия вируса (МТТ-тест). **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что ИФН-λ1 обладает противовирусной активностью в отношении аденовируса человека *in vitro* при введении по профилактической и лечебно-профилактической схеме и дозе инфицирования 1 и 10 ТЦИД₅₀ (50%-я тканевая цитопатическая инфекционная доза), но не 100 ТЦИД₅₀. Противовирусный эффект применения ИФН-λ1 в лечебно-профилактическом режиме при дозе инфицирования 1 ТЦИД₅₀ был сопоставим с таковым у ИФН-α. При этом оба интерферона не оказывали токсического действия на культуру клеток даже в концентрации 84 и 58 мкг/мл соответственно. Противовирусная активность и отсутствие цитотоксического действия создают основу для дальнейшего изучения возможности создания лекарственного препарата на основе ИФН-λ1 с целью лечения вирусных заболеваний конъюнктивы глаза.

Ключевые слова: интерферон лямбда, аденовирус, конъюнктура человека.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90002/20.

Автор для переписки: Кихтенко Н.А., e-mail: dr.kikhtneko@gmail.com

Для цитирования: Кихтенко Н.А., Ильичёва Т.Н., Дурьманов А.Г., Фурсова А.Ж., Мадонов П.Г. Изучение противовирусной активности рекомбинантного человеческого интерферона лямбда 1 на культуре клеток конъюнктивы человека. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 31–36. doi: 10.18699/SSMJ20210504

Investigation of the antiviral activity of the recombinant human interferon lambda 1 in human conjunctiva cell culture

N.A. Kikhtenko¹, T.N. Ilyicheva², A.G. Durymanov², A.Zh. Fursova¹, P.G. Madonov¹

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

² Novosibirsk State University
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 1

Abstract

The aim of the study was to determine the efficacy of recombinant human interferon lambda 1 (IFN-λ1) against human adenovirus serotype 5 in a culture of human conjunctival cells Chang conjunctiva clone 1-5c-4. **Material and methods.** The study design consisted of three experimental schemes, reflecting a prophylactic and two options for a therapeutic and prophylactic treatment regimen (with the constant presence of the virus in the culture medium and with its removal after adsorption). The antiviral activity of IFN-λ1 was determined by the number of viable cells after exposure to the

virus (MTT test). **Results and discussion.** It has been established that IFN- λ 1 has antiviral activity against human adenovirus *in vitro* under a prophylactic and therapeutic-prophylactic scheme of administration at an infection dose of 1 and 10 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose), but not at an infection dose of 100 TCID₅₀. The antiviral effect of the use of IFN- λ 1 in a therapeutic and prophylactic regimen at an infection dose of 1 TCID₅₀ was comparable to that of IFN- α . At the same time, both interferons did not have a toxic effect on the cell culture even at a concentration of 84 and 58 μ g/ml, respectively. The antiviral activity and the absence of cytotoxic action provide the basis for further study of the possibility of development of based on IFN- λ 1 drug for eye conjunctiva viral diseases treatment.

Key words: interferon lambda, adenovirus, human conjunctiva.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 20-315-90002\20.

Correspondence author: Kikhtenko N.A., e-mail: dr.kikhtenko@gmail.com

Citation: Kikhtenko N.A., Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Fursova A.Zh., Madonov P.G. Investigation of the antiviral activity of the recombinant human interferon lambda 1 in human conjunctiva cell culture. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 31–36. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210504

Введение

В настоящее время известно о семи основных видах аденовирусов человека (HAdV) с более чем 90 различными субтипами, при этом постоянно продолжают обнаруживаться новые типы аденовирусов [1]. HAdV вызывают широкий спектр заболеваний, одними из самых распространенных являются респираторные инфекции. Человек, инфицированный HAdV, чрезвычайно заразен в течение инкубационного периода, который обычно составляет от 4 до 8 дней, но может длиться и 24 дня в зависимости от серотипа HAdV [2].

Поражение глазного яблока может быть как самостоятельным заболеванием, так и осложнением респираторной инфекции. Частота аденовирусных поражений среди пациентов с клиническим диагнозом инфекционного конъюнктивита может варьировать от 15 до 70 % [3, 4], при этом особенностью течения аденовирусного конъюнктивита является высокая частота поражения роговицы и развитие кератоконъюнктивита, что может приводить к необратимому снижению зрительных функций. HAdV обнаруживается в конъюнктиве больных через 10 дней после начала заболевания, при этом больше половины пациентов еще контагиозны, а некоторые остаются носителями вируса [5]. В случае острого геморрагического конъюнктивита аденовирусы серотипов 2, 3, 4, 5 и 19 также могут быть обнаружены в конъюнктиве через несколько месяцев после начала заболевания [6].

В настоящее время нет зарегистрированных и применяющихся в клинической практике этиотропных препаратов для лечения аденовирусной инфекции, в том числе при поражении глаза. В США разработана живая аттенуированная пероральная вакцина, которая используется только

для вакцинации военнослужащих [7]. Одной из стратегий терапии и профилактики вирусных заболеваний является применение лекарственных препаратов на основе рекомбинантных интерферонов (ИФН). В настоящее время активно изучается противовирусное действие ИФН III типа (ИФН- λ). Показано, что ИФН- λ 1 типа (ИФН- λ 1) представляют собой «сторожевые молекулы» анатомических эпителиальных барьеров и проявляют активность сразу после контакта клеток с вирусом. В настоящее время установлено, что ИФН- λ 1 могут успешно применяться для лечения вирусного гепатита, вирусного энцефалита, коронавирусной инфекции и др. [8, 9]. Выполнены исследования по применению ИФН- λ для лечения герпес-вирусного кератита [10, 11], однако нам не встретилось публикаций о работах, посвященных возможности использования ИФН- λ 1 при инфицировании HAdV эпителия передней поверхности глаза.

Цель настоящего исследования – изучение противовирусной активности рекомбинантного человеческого ИФН- λ 1 в отношении аденовируса человека серотипа 5 *in vitro* на культуре клеток конъюнктивы человека Chang conjunctiva clone 1-5c-4.

Материал и методы

В работе использовали HAdV серотипа 5 из коллекции ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора («Вектор»), размножение которого осуществляли в клетках линии HeLa (карцинома шейки матки человека) из коллекции культур клеток «Вектор». Для определения противовирусной активности использовали линии клеток нормальной конъюнктивы человека Chang conjunctiva clone 1-5c-4, полученные из

коллекции культур клеток «Вектор» и Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (НИЦЭМ). Клетки выращивали в среде следующего состава: среда DMEM (Gibco, США) с 5 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и антибиотиками (Anti-Anti, Gibco, США). Поддерживающая среда отличалась только количеством фетальной сыворотки (2 %). Для отмывания клеток использовали раствор Хенкса («Вектор»).

В качестве объекта исследования был использован рекомбинантный человеческий ИФН- $\lambda 1$ (АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии») в концентрации 0,84 мг/мл, в качестве препарата сравнения – рекомбинантный человеческий ИФН- $\alpha 2b$ (АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии») в концентрации 0,58 мг/мл (препараты на его основе применяются в офтальмологической практике). Степень чистоты препаратов > 97 % (хроматограф жидкостный ActaPurifier100, GE Healthcare, США).

Противовирусную активность определяли по количеству жизнеспособных клеток после воздействия вируса и различных схем введения препарата в МТТ-тесте. Метод основан на способности живых клеток поглощать и накапливать суправитальный краситель нейтральный красный в лизосомах благодаря электростатическому притяжению. Повреждение лизосомальных мембран приводит к снижению накопления красителя, поэтому окрашивание происходит пропорционально количеству жизнеспособных клеток.

Дизайн исследования представлял собой три экспериментальные схемы, отражающие модель профилактического режима и два варианта лечебно-профилактического режима лечения. Первый этап был одинаков для всех схем: лунки 96-луночного планшета засевали культурой клеток с посевной дозой 2×10^4 клеток на лунку. После формирования 80%-го монослоя в культуральную среду вносили разведения (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560) тестируемых препаратов, используя по три лунки на каждое разведение. Клетки инкубировали 24 часа при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂. Затем культуральную среду удаляли и вносили HAdV серотипа 5 в дозах 1, 10 и 100 ТЦИД₅₀ (50%-я тканевая цитопатическая инфекционная доза) на лунку в объеме 100 мкл. Далее схемы различались.

Схема 1. Через 30 мин после заражения клеток в лунки вновь вносили исследуемый образец (разведения от 1:10 до 1:2560) в 100 мкл поддерживающей среды и инкубировали при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂ в течение 72 ч. В этом случае вирус после адсорбции не удаляли, клетки инку-

бировали в культуральной среде с исследуемым препаратом или препаратом сравнения.

Схема 2. Через 30 мин после заражения клетки отмывали раствором Хенкса, чтобы удалить вирус, после чего вновь вносили исследуемый образец (разведения от 1:10 до 1:2560) в 100 мкл поддерживающей среды и инкубировали при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂ в течение 72 ч. В этом случае вирус после адсорбции удаляли, клетки инкубировали в культуральной среде с исследуемым препаратом или препаратом сравнения.

Схема 3. Через 30 мин после заражения клетки отмывали раствором Хенкса, после чего вносили поддерживающую среду без исследуемых образцов и инкубировали при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂ в течение 72 ч. В этом случае вирус после адсорбции удаляли, клетки инкубировали в культуральной среде без препаратов.

Контроль вируса осуществляли путем проведения тех же манипуляций, но без добавления препаратов интерферонов. В качестве контроля среды использовали среду с незараженными вирусом клетками без добавления препаратов.

Через трое суток после заражения клетки окрашивали нейтральным красным и определяли оптическую плотность при длине волны 490 нм. Эффективную дозу противовирусной активности (ED₅₀) рассчитывали как дозу препарата, в которой он ингибирует вирусную репродукцию на 50 %.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$.

Результаты и их обсуждение

ИФН- $\lambda 1$ и ИФН- $\alpha 2b$ даже при минимальном разведении 1:10 (соответственно 84 и 58 мкг/мл) не оказывали токсического действия на клетки Chang conjunctiva clone 1-5c-4.

В таблице представлена противовирусная активность ИФН- $\lambda 1$ и ИФН- $\alpha 2b$ при заражении клеток HAdV в дозе 1, 10 и 100 ТЦИД₅₀ на лунку. Схема 1 отражает лечебно-профилактический режим введения интерферонов при аденовирусной инфекции конъюнктивы глаза и представляет собой модельный эксперимент постоянного присутствия вируса и лекарственного препарата в клеточной культуре на протяжении 72 ч после инфицирования. Как видно из таблицы, при дозе заражения 1 ТЦИД₅₀ оба препарата обладают антивирусной активностью. В экспериментах по схеме 2 (моделирует лечебно-профилактический режим введения препаратов, когда не проникший в клетки вирус элиминирован, но воз-

Таблица. Антивирусная активность препаратов интерферонов в отношении HAdV на культуре клеток Chang conjunctiva clone 1-5c-4 при различных схемах эксперимента**Table.** Antiviral activity of interferon preparations against HAdV in the cell culture Chang conjunctiva clone 1-5c-4 under various experimental schemes

Схема	Доза вируса, ТЦИД ₅₀	Препарат, мкг/мл		Источник клеток
		ИФН-λ1	ИФН-2αb	
1	1	42,3 ± 2,9	7,3 ± 0,5	«Вектор»
		42,0 ± 9,3	7,3 ± 0,5	«НИЦЭМ»
	10	> 42	14,5 ± 3,9	«Вектор»
	100	> 42	25,0 ± 3,7	«Вектор»
2	1	3,3 ± 0,7	2,1 ± 0,4	«Вектор»
		3,2 ± 0,5	2,0 ± 0,2	«НИЦЭМ»
	10	22,0 ± 4,9	5,1 ± 1,1	«Вектор»
	100	> 42	29,0 ± 4,2	«Вектор»
3	1	3,0 ± 0,8	2,2 ± 0,6	«Вектор»
		3,0 ± 0,6	1,8 ± 0,4	«НИЦЭМ»
	10	23,0 ± 5,1	4,0 ± 0,6	«Вектор»
	100	> 42	29 ± 3,7	«Вектор»

действие интерферонов на клетки продолжается) и 3 (отражает профилактический режим введения препаратов) 24-часовая экспозиция клеток конъюнктивы препаратами интерферонов перед заражением вирусом в дозе 1 ТЦИД₅₀ также обеспечивала хорошую противовирусную защиту. С определенной долей допущения можно сказать, что при дозе заражения 1 ТЦИД₅₀ по схемам 2 и 3 ИФН-λ1 проявил антивирусную активность на уровне препарата ИФН-α2b. Кроме того, по схемам 2 и 3 для каждого препарата получены схожие результаты, из чего можно сделать вывод, что внесение в культуральную среду препаратов после адсорбции вируса, по-видимому, не влияет на уровень их противовирусного действия.

Тестирование антивирусной активности интерферонов при десятикратном увеличении дозы аденовируса (10 ТЦИД₅₀ на лунку) в эксперименте по схеме 1 показало, что выраженным противовирусным действием обладал только препарат сравнения ИФН-α2b. В то же время при проведении экспериментов по схемам 2 и 3 ИФН-λ1 оказывал противовирусное действие, хотя и в более высоких концентрациях, чем ИФН-α2b. При увеличении дозы аденовируса до 100 ТЦИД₅₀ на лунку противовирусную активность, практически одинаковую при всех трех схемах проведения эксперимента, демонстрировал только ИФН-α2b (см. таблицу).

Поскольку выраженную противовирусную активность ИФН-λ1 проявлял лишь при инфицирующей дозе 1 ТЦИД₅₀ на лунку, тестирование на второй культуре клеток Chang conjunctiva clone 1-5c-4, полученной из коллекции НИЦЭМ, мы

провели только с этой дозой вируса (см. таблицу). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что эффективная противовирусная доза препаратов ИФН-λ1 и ИФН-α2b достигает сходных значений при тестировании на клетках Chang conjunctiva clone 1-5c-4, полученных из разных коллекций культур.

Закключение

В результате проведенных экспериментов показано, что для рекомбинантного человеческого ИФН-λ1 характерна выраженная противовирусная активность в клетках конъюнктивы человека при заражении HAdV серотипа 5 в дозе 1 ТЦИД₅₀ и 10 ТЦИД₅₀, но при эскалации инфицирующей дозы в 10 раз (100 ТЦИД₅₀) ИФН-λ1 не проявляет противовирусной активности, что согласуется с недавно опубликованными данными [12]. При инфицирующей дозе HAdV 1 и 10 ТЦИД₅₀ ИФН-λ1 способен реализовать свой эффект при профилактическом и лечебно-профилактическом режиме воздействия, в последнем случае при дозе 1 ТЦИД₅₀ эффективность ИФН-λ1 и ИФН-α сопоставима (рисунок).

Тот факт, что в лечебном режиме ИФН-λ1 оказывал противовирусное действие в более высоких концентрациях по сравнению с ИФН-α2b, был ожидаем, поскольку из ранних исследований известно о преимущественной противовирусной активности интерферонов альфа по сравнению с интерферонами лямбда. Их принципиальная разница проявляется в скорости реализации противовирусного эффекта, а также в количестве побочных эффектов, что особенно важно при дли-

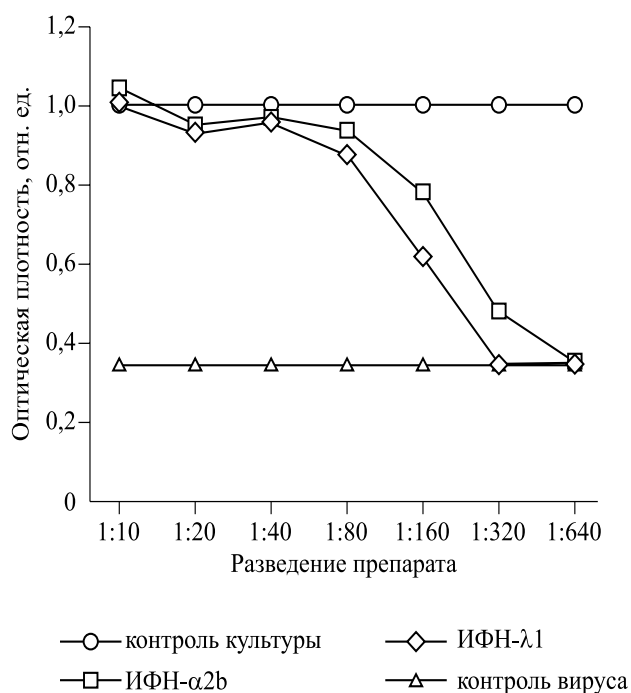


Рис. Определение противовирусной активности препаратов интерферона при дозе вируса 1 ТЦИД₅₀
Fig. Antiviral activity of interferon drugs against HAdV in a dose of 1 TCID₅₀

тельных курсах лечения [9, 13]. Таким образом, в проведенном исследовании установлена фактическая противовирусная активность ИФН-λ1 в отношении HAdV на клетках конъюнктивы человека при дозах заражения 1 и 10 ТЦИД₅₀ и отсутствие его цитотоксического действия на эту культуру даже при концентрации 84 мкг/мл. Это обстоятельство, в свою очередь, и объясняет интерес к разработке лекарственных препаратов на основе интерферонов лямбда, в том числе для офтальмологической практики.

Список литературы / References

1. Hashimoto S., Gonzalez G., Harada S., Oosako H., Hanaoka N., Hinokuma R., Fujimoto T. Recombinant type Human mastadenovirus D85 associated with epidemic keratoconjunctivitis since 2015 in Japan. *J. Med. Virol.* 2018; 90 (5): 881–889. doi: 10.1002/jmv.25041
2. Crenshaw B.J., Jones L.B., Bell C.R., Kumar S., Matthews Q.L. Perspective on adenoviruses: epidemiology, pathogenicity, and gene therapy. *Biomedicines*. 2019; 7 (3): 61. doi: 10.3390/biomedicines7030061
3. Sambursky R., Tauber S., Schirra F., Kozich K., Davidson R., Cohen E.J. The RPS adeno detector for diagnosing adenoviral conjunctivitis. *Ophthalmol-*

ogy. 2006; 113 (10): 1758–1764. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.06.029

4. Lee C.S., Lee A.Y., Akileswaran L., Stroman D., Najafi-Tagol K., Kleiboeker S., Chodosh J., Margaret A., Wald A., van Gelder R.N.; BAYnovation Study Group. Determinants of outcomes of adenoviral keratoconjunctivitis. *Ophthalmology*. 2018; 125 (9): 1344–1353. doi: 10.1016/j.ophtha.2018.02.016

5. Jonas R.A., Ung L., Rajaiya J., Chodosh J. Mystery eye: Human adenovirus and the enigma of epidemic keratoconjunctivitis. *Prog. Retin. Eye Res.* 2020; 76: 100826. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.100826

6. Труфанов С.В., Маложен С.А., Крахмалева Д.А., Пивин Е.А. Аденовирусный эпидемический кератоконъюнктивит. *Рос. мед. ж. Клини. офтальмол.* 2016; 16 (3): 144–150.

Trufanov S.V., Malozhen S.A., Krakhmaleva D.A., Pivin E.A. Adenoviral epidemic keratoconjunctivitis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal. Klinicheskaya oftal'mologiya = Medical Journal of the Russian. Clinical Ophthalmology*. 2016; 16 (3): 144–150. [In Russian].

7. Choudhry A., Mathena J., Albano J.D., Yacovone M., Collins L. Safety evaluation of adenovirus type 4 and type 7 vaccine live, oral in military recruits. *Vaccine*. 2016; 34: 4558–4564. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.07.033

8. Ye L., Schnepf D., Staeheli P. Interferon-λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2019; 19 (10): 614–625. doi: 10.1038/s41577-019-0182-z

9. Lazear H.M., Schoggins J.W., Diamond M.S. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*. 2019; 50 (4): 907–923. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.025

10. Jaggi U., Bhela S., Rouse B.T. Role of interferon lambda (il-28a) in herpes stromal keratitis. *J. Immunol. Res. Ther.* 2018; 3 (1): 135–144.

11. Antony F., Pundkar C., Sandey M., Jaiswal A.K., Mishra A., Kumar A., Channappanavar R., Suryawanshi A. IFN-λ regulates neutrophil biology to suppress inflammation in herpes simplex virus-1-induced corneal immunopathology. *J. Immunol.* 2021; 206 (8): 1866–1877. doi: 10.4049/jimmunol.2000979

12. Plotnikova M., Lozhkov A., Romanovskaya-Romanko E., Baranovskaya I., Sergeeva M., Kaa K., Klotchenko S., Vasin A. IFN-λ1 displays various levels of antiviral activity *in vitro* in a select panel of RNA viruses. *Viruses*. 2021; 13 (8): 1602. doi: 10.3390/v13081602

13. Hermant P., Michiels T. Interferon-λ in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *J. Innate Immun.* 2014; 6 (5): 563–574. doi: 10.1159/000360084

Сведения об авторах:

Николай Андреевич Кихтенко, ORCID: 0000-0003-1446-7229 e-mail: dr.kikhtenko@gmail.com
Татьяна Николаевна Ильичёва, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0002-2354-7688, e-mail: t.ilicheva@g.nsu.ru
Александр Гаврилович Дурыманов, ORCID: 0000-0001-5634-1785, e-mail: durymanov_ag@mail.ru
Анжелла Жановна Фурсова, д.м.н., ORCID: 0000-0001-6311-5452 e-mail: anzhellafursova@yandex.ru
Павел Геннадьевич Мадонов, д.м.н., ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Information about the authors:

Nikolay A. Kikhtenko, ORCID: 0000-0003-1446-7229 e-mail: dr.kikhtenko@gmail.com
Tatyana N. Ilyicheva, doctor of biological science, professor, ORCID: 0000-0002-2354-7688,
e-mail: t.ilicheva@g.nsu.ru
Alexander G. Durymanov, ORCID: 0000-0001-5634-1785, e-mail: durymanov_ag@mail.ru
Anzhella Zh. Fursova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6311-5452 e-mail: anzhellafursova@yandex.ru
Pavel G. Madonov, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.09.2021
После доработки 15.09.2021
Принята к публикации 15.09.2021

Received 01.09.2021
Revision received 15.09.2021
Accepted 15.09.2021

Повышение внутриклеточного уровня НАД⁺ и разнонаправленные изменения экспрессии CD38 в клетках гиппокампа при экспериментальной болезни Альцгеймера

А.А. Семёнова¹, Я.В. Горина¹, Е.Д. Хилажева¹, Е.В. Харитоновна¹, А.Б. Салмина^{1,2}

¹ Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

² Научный центр неврологии Минобрнауки России 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, 80

Резюме

Целью исследования являлась оценка уровня НАД⁺ в головном мозге мышей, подвергшихся введению бета-амилоида (Аβ), а также определение активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 и количества CD38-иммунопозитивных клеток нейрональной, астроцитарной и эндотелиальной природы. **Материал и методы.** Модель болезни Альцгеймера воспроизводилась путем интрагиппокампального введения Аβ мышам линии C57BL/6. Содержание НАД⁺ во внеклеточной жидкости головного мозга и в ткани гиппокампа определяли спектрофотометрически, ферментативную активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 – флуориметрическим методом, количество CD38-иммунопозитивных клеток – методом иммуногистохимии. **Результаты и их обсуждение.** Уровень НАД⁺ был значительно повышен в ткани гиппокампа у мышей после введения Аβ, при этом концентрация внеклеточного НАД⁺ не изменялась. Активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 в ткани гиппокампа осталось прежним, однако число CD38-иммунопозитивных нейронов снизилось, а количество CD38⁺ эндотелиоцитов увеличилось в гиппокампе мышей после введения Аβ. **Заключение.** Разнонаправленные изменения экспрессии АДФ-рибозилциклазы/CD38 в нейронах и эндотелиоцитах соответствуют разному метаболическому состоянию этих типов клеток и наряду с увеличением внутриклеточного пула НАД⁺ при экспериментальной болезни Альцгеймера отражают адаптивный стрессовый ответ на введение Аβ.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, ангиопатия, НАД⁺, CD38.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при государственной финансовой поддержке Президента РФ ведущих научных школ РФ (проект НШ-2547.2020.7) на базе НИИ молекулярной медицины и патофизиологии, с использованием оборудования ЦКП «Молекулярные и клеточные технологии».

Автор для переписки: Семёнова А.А., e-mail: alina_shamsutdin@mail.ru

Для цитирования: Семёнова А.А., Горина Я.В., Хилажева Е.Д., Харитоновна Е.В., Салмина А.Б. Повышение внутриклеточного уровня НАД⁺ и разнонаправленные изменения экспрессии CD38 в клетках гиппокампа при экспериментальной болезни Альцгеймера. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2021; 41 (5): 37–46. doi: 10.18699/SSMJ20210505

Rising of intracellular NAD⁺ level and oppositely directed changes in CD38 expression in hippocampal cells in experimental Alzheimer's disease

A.A. Semenova¹, Ya.V. Gorina¹, E.D. Khilazheva¹, E.V. Kharitonova¹, A.B. Salmina^{1,2}

¹ Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of Minzdrav of Russia 660022, Krasnoyarsk, Partisan Zheleznyak str., 1

² Research Center of Neurology 125367, Moscow, Volokolamskoe highway, 80

Abstract

The aim of the study was to assess the level of NAD⁺ in the brain of mice treated with beta-amyloid (A β), as well as to determine the activity of ADP-ribosyl cyclase/CD38 and the number of CD38-immunopositive neurons, astrocytes and endothelial cells. **Material and methods.** The Alzheimer's disease model was reproduced by intrahippocampal administration of A β to C57BL/6 mice. Determination of the NAD⁺ level in the extracellular fluid of the brain and in the hippocampal tissue was carried out by spectrophotometric analysis. Evaluation of the enzymatic activity of ADP-ribosyl cyclase/CD38 was carried out by the fluorimetric method, determination of the number of CD38-immunopositive cells by the immunohistochemistry method. **Results and discussion.** The level of NAD⁺ was significantly increased in the hippocampal tissue in mice after administration of A β , while the level of extracellular NAD⁺ did not change. The activity of ADP-ribosyl cyclase/CD38 in the hippocampal tissue did not change, but the number of CD38-immunopositive neurons decreased, and the number of CD38⁺ endothelial cells increased in the hippocampus of mice after administration of A β . **Conclusion.** Opposite changes in the expression of ADP-ribosyl cyclase / CD38 in neurons and endothelial cells correspond to different metabolic states of these types of cells and, along with an increased intracellular pool of NAD⁺ in experimental Alzheimer's disease, reflect an adaptive stress response to A β administration.

Key words: Alzheimer's disease, beta amyloid, angiopathy, NAD⁺, CD38.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. This work was carried out with the state financial support of the President of the Russian Federation of the leading scientific schools of the Russian Federation (project NSh-2547.2020.7) on the basis of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry using equipment from the Center for Collective Use «Molecular and Cellular Technologies».

Correspondence author: Semenova A.A., e-mail: alina_shamsutdin@mail.ru

Citation: Semenova A.A., Gorina Ya.V., Khilazheva E.D., Kharitonova E.V., Salmina A.B. Rising of intracellular NAD⁺ level and oppositely directed changes in CD38 expression in hippocampal cells in experimental Alzheimer's disease. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 37–46. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210505

Введение

В настоящее время болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой старческого слабоумия [1]. Патогенез нейродегенерации альцгеймеровского типа включает в себя нарушения протеолиза белка-предшественника амилоида, аккумуляцию бета-амилоида во внеклеточном пространстве, накопление гиперфосфорилированного тау-белка, развитие кальциевого дисбаланса, дисфункции митохондрий, индукцию гибели нейронов, нарушения функциональной активности астроглии и микроглии с развитием нейровоспаления, изменения нейрогенеза и церебрального ангиогенеза, нарушения метаболического сопряжения клеток головного мозга, развитие окислительного стресса [2–4]. Важным компонентом патогенеза нейродегенерации при старении и БА может быть истощение внутриклеточного уровня НАД⁺ [5, 6], сенсором и регулятором которого, по мнению ряда авторов [7, 8], выступает молекула CD38.

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин, НАД⁺-гликогидролазу/АДФ-рибозилциклазу, конвертирующую НАД⁺ в циклическую АДФ-рибозу (цАДФР). цАДФР может выполнять функцию мобилизатора Ca²⁺ из внутриклеточных депо, в частности, через связы-

вание с рианодиновыми рецепторами эндоплазматического ретикулума [9, 10]. Особенности регуляции активности АДФ-рибозилциклазы в электровозбудимых клетках позволили предположить, что этот фермент может выполнять роль внутриклеточного редокс-сенсора и НАД⁺-сенсора, реагирующего на биодоступность субстрата (НАД⁺), осцилляции концентраций которого в цитозоле, митохондриях и ядре отражают функциональную активность и состояние реакций энергетического обмена в клетках [8, 10–13]. Несубстратным лигандом CD38 является CD31, экспрессируемый клетками эндотелия, благодаря их взаимодействию осуществляется адгезия CD38⁺ лейкоцитов к CD31⁺ клеткам эндотелия сосудов, например, при воспалении [14, 15]. Известно, что благодаря олигомерной структуре CD38 ведет себя как каталитически активный транспортер, ответственный за генерацию и вход цАДФР в клетку, причем дополнительно такую же функциональную нагрузку может нести экспрессируемый в цитоплазматической мембране коннексин 43 (Cx43), обычно функционально сопряженный с CD38 [16, 17].

К. Nayaakawa et al. [18] ранее показали, что астроциты могут высвобождать функциональные митохондрии, которые поступают в поврежденные нейроны при инсульте, причем этот механизм

в клетках астроглии регулируется активностью CD38. Экспрессия CD38 характерна для разных видов клеток, входящих в состав нейроваскулярной единицы головного мозга – нейронов, астроцитов, микроглии [19]. В литературе отсутствуют данные об экспрессии CD38 на клетках церебрального эндотелия, хотя по аналогии с эндотелиальными клетками сердца [20] это весьма вероятно. Целью настоящего исследования явилась оценка уровня НАД⁺, активности АДФ-рибозилциклазы и экспрессии CD38-позитивных клеток в гиппокампе животных с моделью нейродегенерации альцгеймеровского типа. Чтобы оценить вклад внутриклеточного пула НАД⁺, мы исследовали содержание НАД⁺ в межклеточной жидкости головного мозга, собранной методом микродиализа.

Материал и методы

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. Моделирование БА осуществляли введением олигомеров Aβ1-42 в СА1 зону гиппокампа билатерально по 1 мкл (стереотаксические координаты ML ± 1,3 мм, в AP – 2,0 мм, DV – 1,9 мм) [21]. Контрольная группа – ложнооперированные животные после введения растворителя для Aβ, фосфатно-солевого буфера (PBS). Признаки БА оценивали начиная с 10 суток [22], канюлю для микродиализа вводили на 11-е сутки после оперативного вмешательства. Верификацию модели БА осуществляли окраской тиюфлавином S. После введения амилоида в ткани головного мозга наблюдались флуоресцирующие амилоидные бляшки зеленого цвета. Контрольная группа состояла из 20 мышей: у 4 мышей проводился забор межклеточной жидкости головного мозга (микродиализ), с дальнейшей транскардиальной перфузией и забором мозга для иммуногистохимического исследования (ИГХ), у 16 мышей выделяли гиппокамп и получали гомогенат для определения уровня НАД⁺ ($n = 7$) и активности АДФ-рибозилциклазы ($n = 9$). Опытная группа ($n = 17$): микродиализ и ИГХ ($n = 6$), содержание НАД⁺ ($n = 4$) и активность АДФ-рибозилциклазы ($n = 7$).

Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС).

Для осуществления методики микродиализа головного мозга направляющую канюлю (зонд) устанавливали с использованием стереотаксического аппарата. Зонд вводили в левый желудочек головного мозга по следующим координатам: ML 1 мм, в AP – 0,46 мм, DV 2,2 мм, фиксировали

стоматологическим цементом, после чего рану зашивали. После операции животное помещали в клетку на 5 суток для полного восстановления со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре 21 ± 1 °C и регулярном световом цикле 12 ч день / 12 ч ночь. Диализат (20 мкл) собирали в течение 24 ч у свободнодвижущегося животного, подключенного через капилляры к направляющей канюле, с использованием установки для микродиализа (Eicom Corporation, США). Экспериментальные пробы диализата собирали со скоростью 0,3 мкл/мин в микропланшет, расположенный в коллекторе с системой охлаждения до 2 °C. Собранную межклеточную жидкость замораживали при –20 °C до момента востребования.

Целевые компоненты межклеточной жидкости головного мозга собирали с использованием искусственной спинномозговой жидкости, которую готовили в пробирке с герметичной крышкой следующим образом. В деионизированной воде (5 мл) растворяли 0,36525 г NaCl, 0,0093 г KCl, 0,0075 г NaH₂PO₄, к 0,5 мл полученного раствора добавляли 0,01092 г NaHCO₃, 0,009 г кристаллической глюкозы, 0,01 г CaCl₂, 0,0025 г MgCl₂ и доводили общий объем аликвоты до 5 мл, фильтровали.

Через 60 минут после окончания проведения микродиализа осуществляли транскардиальную перфузию 4%-м параформальдегидом с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине, после чего погружали в 20%-й раствор сахарозы. С помощью микротомы Microm HM 650 (Thermo Fisher Scientific, США) изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Изучали экспрессию маркеров методом непрямого ИГХ для свободно плавающих срезов [23]. После промывки в PBS срезы блокировали 3%-м козьим сывороточным альбумином в PBS и 1%-м Triton X-100 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим инкубированием в течение ночи с первичными антителами к нейронспецифической энolahе (NSE; GeneTex, GTX85462, chicken polyclonal) 1:1000, глияльному фибриллярному белку (GFAP; MyBioSource.com, MBS8241552, mouse monoclonal) 1:1000, CD31 (MyBioSource.com, MBS532307, rat monoclonal) 1:1000 и CD38 (GeneTex, GTX37752, rabbit polyclonal) 1:1000 с 3%-м BSA в PBS и 0,2%-м Triton X-100 при 4 °C. После инкубации с первичными антителами срезы промывали и инкубировали со вторичными антителами Alexa Fluor 555 (Abcam, ab150074), Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150171), Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150115), Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150159) в разведении 1:1000 в течение 2 ч при комнатной температуре. Изображения получали

с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i (Olympus Corporation, Япония). В срезах головного мозга подсчитывали абсолютное количество клеток в поле зрения, экспрессирующих молекулы CD38 в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы на различных уровнях в гиппокампе (Lateral 1,90 mm, 2,40 mm, 2,90 mm). Оценивали не менее пяти полей зрения в зубчатой извилине, в областях гиппокампа CA1 и CA3.

Содержание NAD^+ во внеклеточной жидкости головного мозга и в ткани гиппокампа определяли спектрофотометрически согласно протоколу производителя, представленного в наборе NAD Quantification Kit (Colorimetric/Fluorometric) (Sigma-Aldrich, США, MAK038). Ферментативную активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 нейронов оценивали флуориметрически с использованием флуорогенного субстрата никотинамидгуанидинуклеотида (HGD^+) согласно стандартному протоколу. Образцы ткани гомогенизировали при 4°C , в полученном гомогенате определяли концентрацию белка по стандартному протоколу (MicroLowry test, Sigma-Aldrich) и активность фермента путем инкубации 100 мкл гомогената ткани с реакционной смесью, содержащей 100 мкм HGD^+ в 20 мМ трис- HCl (pH 7,4) в течение 20 мин при 37°C . Интенсивность флуоресценции супернатанта регистрировали на 0 и 20 мин инкубации на спектрофлуориметре CM2203 (Solar, Белоруссия) при длине волны возбуждения

300 нм и длине волны испускания 410 нм. Активность фермента вычисляли по разнице амплитуды флуоресценции на 20 и 0 минут инкубации, отнесенной к 1 мг белка ткани в минуту.

Статистическую обработку результатов проводили методом непараметрической статистики, для оценки различий между группами использовали критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05. Результаты в тексте представлены в виде медианы и интерквартильных размахов (Me [Q1; Q3]), на рисунках для наглядности – в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Результаты

В гомогенатах гиппокампа мышей с интрагиппокампальным введением $\text{A}\beta$ уровень NAD^+ был значительно выше (18,24 [9,40; 21,28] %), чем в контрольной группе (5,64 [5,06; 8,02] %) ($p = 0,024$, рис. 1, а). Межклеточная жидкость у ложнооперированных мышей, собранная методом микродиализа, содержала NAD^+ в количестве (4,11 [3,25; 4,98] %) нмоль/мкг белка, в группе мышей с экспериментальной нейродегенерацией содержание NAD^+ составило (1,73 [1,51; 5,63] %) нмоль/мкг белка ($p = 0,53$, рис. 1, б). Таким образом, нейротоксическое действие $\text{A}\beta$ привело к увеличению концентрации NAD^+ в ткани гиппокампа, преимущественно во внутриклеточном компартменте. Примечательно, что активность

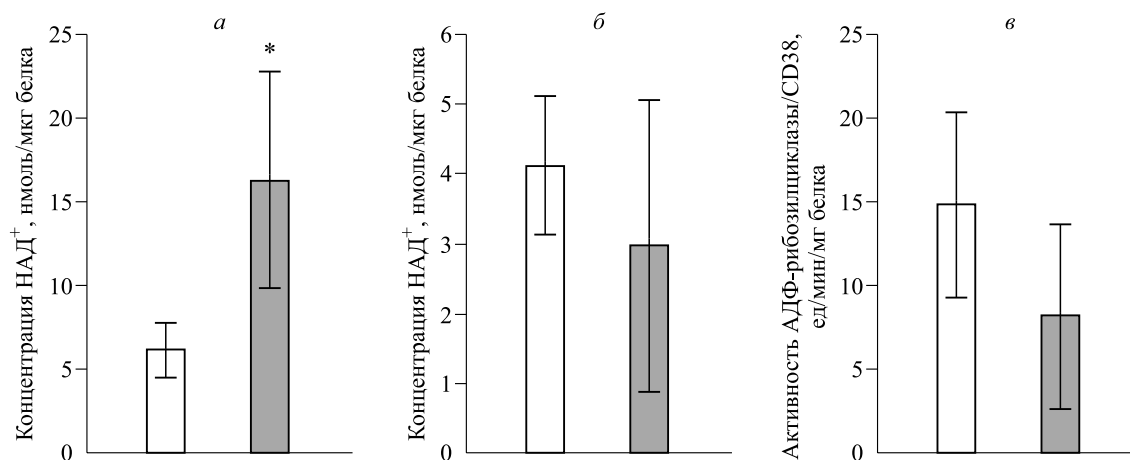


Рис. 1. Уровень NAD^+ в ткани гиппокампа (а) и внеклеточной жидкости головного мозга (б), активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 в ткани гиппокампа (в) животных контрольной группы (белые столбики) и с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера (серые столбики); $n = 4-7$ (а, б), $n = 7-9$ (в); * – отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$

Fig. 1. NAD^+ content in hippocampus tissue (а) and the extracellular fluid of the brain (б), ADP-ribosyl cyclase/CD38 activity in hippocampus tissue of animals of the control group (white bars) and with an experimental model of Alzheimer's disease (grey bars); $n = 4-7$ (а, б), $n = 7-9$ (в); * – $p < 0,05$ compared to control

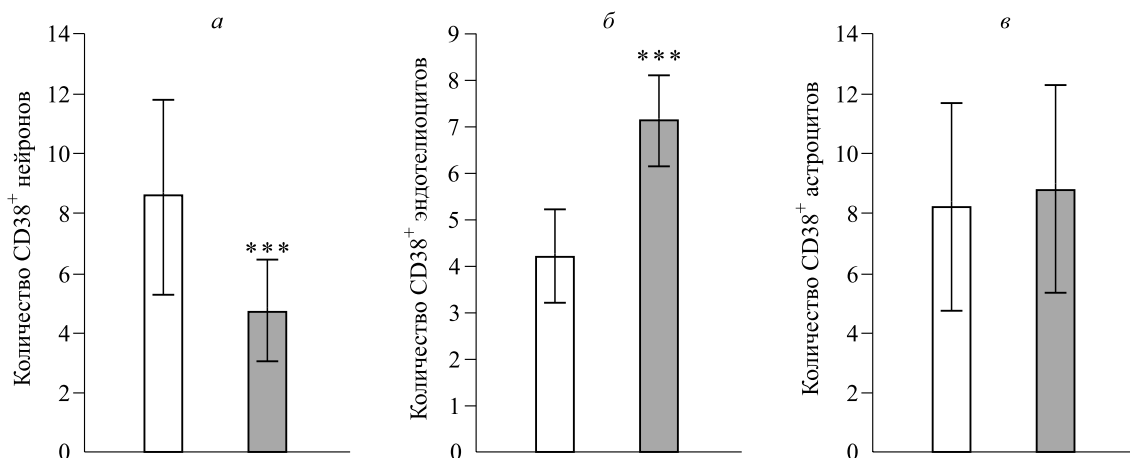


Рис. 2. Экспрессия CD38 в гиппокампе на нейронах (а), эндотелиоцитах (б), астроцитах (в) ложнооперированных животных (белые столбики) и после интрагиппокампального введения Аβ (серые столбики); *** – отличие от величины соответствующего показателя контрольной группы статистически значимо при $p < 0,001$

Fig. 2. Expression of CD38 in the hippocampus on neurons (a), on endothelial cells (b), on astrocytes (c) of sham-operated animals (white bars) and after intrahippocampal administration of amyloid beta (grey bars); *** – $p < 0,001$ compared to control

АДФ-рибозилциклазы/CD38 в ткани гиппокампа значимо не различалась у животных обеих групп (контроль – 14,17 [11,05; 15,62], опыт – 8,16 [3,77; 12,35] ед/мин/мг белка) (рис. 1, в).

Вместе с тем мы обнаружили статистически значимое снижение экспрессии CD38 на нейронах в гиппокампе головного мозга (рис. 2, а; рис. 3) животных с интрагиппокампальным введением Аβ (4,50 [4,00; 6,00] %) по сравнению с ложнооперированными животными (9,00 [7,00; 11,00] %) ($p = 0,0003$). В клетках эндотелиальной природы (рис. 2, б; рис. 4), напротив, отмечалось увеличение количества CD38⁺ клеток у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера относительно группы контроля: (7,00 [4,00; 8,00] %) и (4,00 [3,00; 5,50] %) ($p < 0,0001$) соответственно. Статистически значимых различий экспрессии CD38 на астроцитах головного мозга (рис. 2, в; рис. 5) животных опытной и контрольной групп не обнаружено: (8,00 [6,00; 12,00] %) и (7,00 [5,75; 11,00] %) ($p = 0,5845$) соответственно. Таким образом, на фоне увеличения внутриклеточного уровня НАД⁺ в гиппокампе клетки эндотелия церебральных микрососудов демонстрируют значительное увеличение, а клетки нейрональной природы – существенное снижение экспрессии CD38 при развитии нейродегенерации. Суммарное определение активности фермента в таком случае не отражает характера его функциональной активности в клетках каждого типа в ткани.

Обсуждение

Молекула НАД⁺ является ключевым кофактором, например, для дегидрогеназ гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и субстратом для ряда НАД⁺-конвертирующих ферментов (CD38, сиртуины, поли(АДФ-рибозил)полимераза, моно(АДФ-рибозил)трансферазы) [10]. Оценка уровня НАД⁺ дает представление об эффективности окислительно-восстановительных процессов и митохондриального дыхания в клетке. Поскольку множество исследований отмечает снижение содержания НАД⁺ с возрастом, а также при нейродегенерациях [5, 6, 24], найденный нами повышенный уровень НАД⁺ в клетках гиппокампа мышей с экспериментальной БА, по-видимому, характеризует развитие метаболического ответа на токсическое действие Аβ.

Исходя из полученных нами данных, логично предположить, что результатом токсического эффекта Аβ на клетки гиппокампа в раннем периоде после его интрагиппокампального введения является активизация механизмов стресс-ответа клеток, что приводит к увеличению концентрации НАД⁺ в ткани гиппокампа в связи с регенерацией НАД⁺ в реакциях гликолиза и/или окислением НАДН в дыхательной цепи митохондрий [25]. Недавно показано, что клетки готовы «пожертвовать» митохондриальным дыханием в том случае, если потребность в НАД⁺ в них выше,

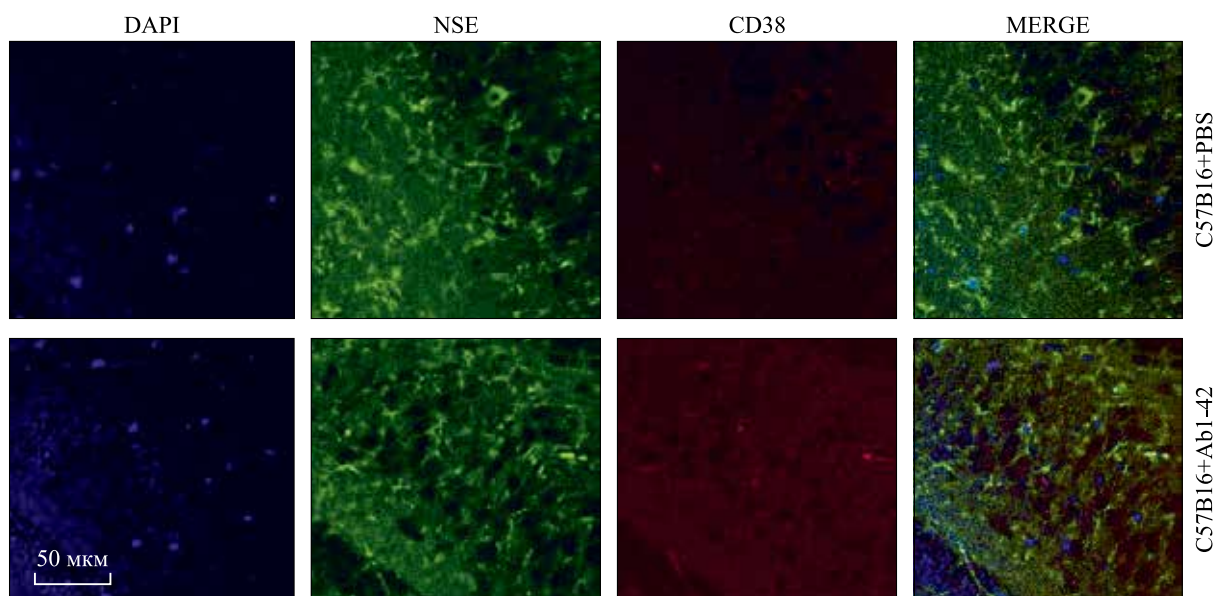


Рис. 3. Экспрессия CD38 на нейронах в гиппокампе ложнооперированных животных (C57BL/6+PBS) и после интрагиппокампального введения $A\beta$ (C57BL/6+Ab1-42)

Fig. 3. Expression of CD38 on neurons in the hippocampus of sham-operated animals. (C57BL/6 + PBS) and after intrahippocampal administration of amyloid beta (C57BL/6 + Ab1-42)

чем потребность в АТФ, например, при инициации митоза [26]. Действительно, интенсивный синтез NAD^+ сопровождается защитными клеточными ответами [27], а введение предшественников NAD^+ восстанавливает сниженный с возрастом уровень NAD^+ в тканях мышей [28], редуцирует неврологические проявления БА [29], аутизма [30].

Увеличение биодоступности NAD^+ является вероятной причиной повышения экспрессии CD38, который в силу своей NAD^+ -гликогидролазной/АДФ-рибозилциклазной активности может эффективно конвертировать NAD^+ в продукты с кальций-мобилизующей активностью [9]. С другой стороны, NAD^+ служит

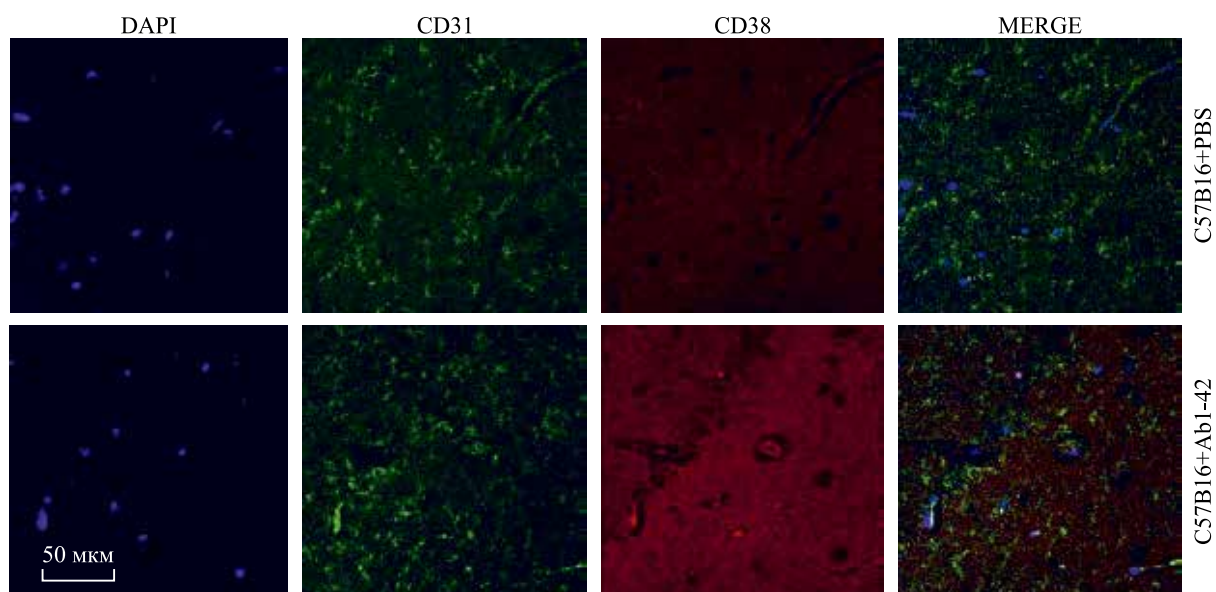


Рис. 4. Экспрессия CD38 на эндотелиоцитах в гиппокампе ложнооперированных животных (C57BL/6+PBS) и после интрагиппокампального введения $A\beta$ (C57BL/6+Ab1-42)

Fig. 4. Expression of CD38 on endothelial cells in the hippocampus of sham-operated animals. (C57BL/6 + PBS) and after intrahippocampal administration of amyloid beta (C57BL/6 + Ab1-42)

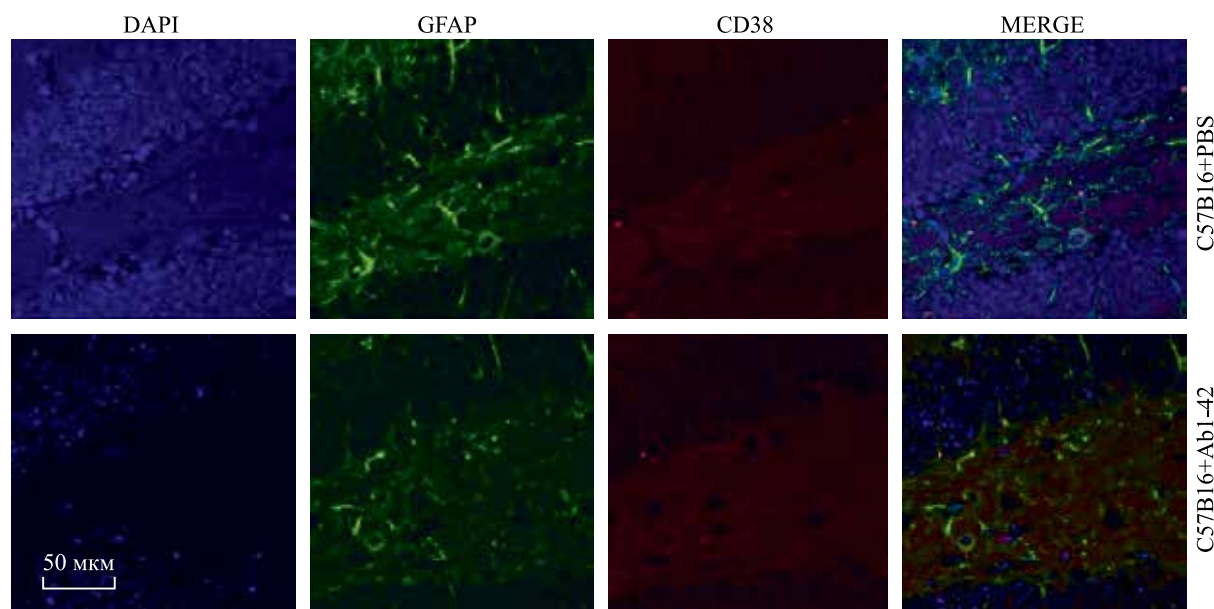


Рис. 5. Экспрессия CD38 на астроцитах в гиппокампе ложнооперированных животных (C57BL/6+PBS) и после интрагиппокампального введения Аβ (C57BL/6+Ab1-42)

Fig. 5. Expression of CD38 on astrocytes in the hippocampus of sham-operated animals. (C57BL/6 + PBS) and after intrahippocampal administration of amyloid beta (C57BL/6 + Ab1-42)

кофактором ферментов, обеспечивающих защиту клетки от последствий окислительного повреждения ДНК – поли(АДФ-рибозил)полимеразы и сиртуинов [31]. В таком случае активация процесса регенерации молекул НАД⁺ в реакциях интенсивного гликолиза на фоне подавления митохондриальной активности клеток гиппокампа приведет к «конкуренции» CD38 и ферментов репарации ДНК за субстрат. Примечательно, что мы не обнаружили изменений внеклеточного уровня НАД⁺, что свидетельствует о том, что процессы транспорта НАД⁺ из клеток, например, за счет активности паннексинов и коннексиновых полуканалов [32], заторможены для сохранения НАД⁺ в клетках, либо процессы клеточной гибели, сопровождающиеся высвобождением НАД⁺ во внеклеточное пространство, не активны. Известно, что содержание НАД⁺ в клетках всегда значительно больше, чем во внеклеточном пространстве [33], причем часть внеклеточного НАД⁺ может захватываться клетками для восполнения его внутриклеточной концентрации, что, например, необходимо для предотвращения гибели клеток [34].

Зарегистрированные нами разнонаправленные изменения экспрессии CD38 в нейронах и эндотелиоцитах гиппокампа, вероятно, отражают различный метаболический профиль этих клеток:

нейроны преимущественно используют митохондриальное дыхание, тогда как клетки эндотелия помимо высокой митохондриальной активности утилизируют гликолитические процессы для продукции лактата [35], обладающего, например, выраженным проангиогенным эффектом [36]. Таким образом, гликолитически активные клетки церебрального эндотелия увеличивают экспрессию CD38, тогда как нейроны с доминирующей митохондриальной активностью снижают экспрессию этого фермента в условиях развивающейся нейродегенерации. Известно, что у мышей, дефицитных по CD38, регистрируется повышение уровня НАД⁺ во многих тканях, включая мозг [11], поэтому логично предположить, что обнаруженное нами снижение экспрессии CD38 в нейронах гиппокампа оказывается значимым регулирующим фактором для увеличения в них внутриклеточного содержания НАД⁺, необходимого для предотвращения последствий токсического действия Аβ. Логично предположить, что клетки церебрального эндотелия с увеличенной экспрессией CD38 демонстрируют таким образом интенсификацию своей гликолитической активности на фоне торможения митохондриального дыхания, что нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

Заключение

Развитие нейродегенерации при введении Аβ в ткань гиппокампа экспериментальных животных характеризуется увеличением внутриклеточного пула НАД⁺ и разнонаправленными изменениями экспрессии НАД⁺-рибозилциклазы/CD38 в клетках гиппокампа: снижением экспрессии в нейронах и увеличением экспрессии в клетках церебрального эндотелия, что соответствует их разному метаболическому профилю и необходимо для реализации стресс-ответа клеток на токсическое действие Аβ.

Список литературы / References

1. Kurakin A., Bredesen D.E. Alzheimer's disease as a systems network disorder: chronic stress/dyshomeostasis, innate immunity, and genetics. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12 (18): 17815–17844. doi: 10.18632/aging.103883
2. Fernandez-Fernandez S., Almeida A., Bolaños J.P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* 2012; 443 (1): 3–11. doi: 10.1042/BJ20111943
3. Kerr J.S., Adriaanse B.A., Greig N.H., Mattson M.P., Cader M.Z., Bohr V.A., Fang E.F. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms. *Trends Neurosci.* 2017; 40 (3): 151–166. doi: 10.1016/j.tins.2017.01.002
4. Rose J., Brian C., Woods J., Pappa A., Panayiotidis M.I., Powers R., Franco R. Mitochondrial dysfunction in glial cells: Implications for neuronal homeostasis and survival. *Toxicology*. 2017; 391: 109–115. doi: 10.1016/j.tox.2017.06.011
5. Dong Y., Brewer G.J. Global metabolic shifts in age and alzheimer's disease mouse brains pivot at NAD⁺/NADH redox sites. *J. Alzheimers Dis.* 2019; 71 (1): 119–140. doi: 10.3233/JAD-190408
6. Katsyuba E., Romani M., Hofer D., Auwerx J. NAD⁺ homeostasis in health and disease. *Nat. Metab.* 2020; 2 (1): 9–31. doi: 10.1038/s42255-019-0161-5
7. Camacho-Pereira J., Tarragó M.G., Chini C.C.S., Nin V., Escande C., Warner G.M., Puranik A.S., Schoon R.A., Reid J.M., Galina A., Chini E.N. CD38 dictates age-related NAD decline and mitochondrial dysfunction through an sirt3-dependent mechanism. *Cell Metab.* 2016; 23 (6): 1127–1139. doi: 10.1016/j.cmet.2016.05.006
8. Chini E.N. CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15 (1): 57–63. doi: 10.2174/138161209787185788
9. Horenstein A.L., Faini A.C., Morandi F., Bracci C., Lanza F., Giuliani N., Paulus A., Malavasi F. The circular life of human cd38: from basic science to clinics and back. *Molecules*. 2020; 25 (20): 4844. doi: 10.3390/molecules25204844
10. Салмина А.Б., Инжутова А.И., Моргун А.В., Окунева О.С., Малиновская Н.А., Лопатина О.Л., Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Кувачева Н.В. НАД⁺-конвертирующие ферменты в клетках нейрональной и глиальной природы: CD38 как новая молекула-мишень для нейропротекции. *Вестн. РАМН*. 2019; 67 (10): 29–37. doi: 10.15690/vramn.v67i10.413
- Salmina A.B., Inzhutova A.I., Morgun A.V., Okuneva O.S., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Petrova M.M., Taranushenko T.E., Fursov A.A., Kuvacheva N.V. NAD⁺-converting enzymes in neuronal and glial cells: CD38 as a novel target for neuroprotection. *Vestnik Rossiiskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012; 67 (10): 29–37. [In Russian]. doi: 10.15690/vramn.v67i10.413
11. Aksoy P., White T.A., Thompson M., Chini E.N. Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 345 (4): 1386–1392. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.042
12. Deaglio S., Morra M., Mallone R., Ausiello C.M., Prager E., Garbarino G., Dianzani U., Stockinger H., Malavasi F. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J. Immunol.* 1998; 160 (1): 395–402.
13. Higashida H., Salmina A.B., Olovyanikova R.Y., Hashii M., Yokoyama S., Koizumi K., Jin D., Liu H.X., Lopatina O., Amina S., Islam M.S., Huang J.J., Noda M. Cyclic ADP-ribose as a universal calcium signal molecule in the nervous system. *Neurochem. Int.* 2007; 51 (2-4): 192–199. doi: 10.1016/j.neuint.2007.06.023
14. Deaglio S., Mallone R., Baj G., Arnulfo A., Surico N., Dianzani U., Mehta K., Malavasi F. CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem. Immunol.* 2000; 75: 99–120.
15. Malavasi F., Deaglio S., Funaro A., Ferrero E., Horenstein A.L., Ortolan E., Vaisitti T., Aydin S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.* 2008; 88 (3): 841–886. doi: 10.1152/physrev.00035.2007
16. Franco L., Guida L., Bruzzone S., Zocchi E., Usai C., de Flora A. The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB J.* 1998; 12 (14): 1507–1520. doi: 10.1096/fasebj.12.14.1507
17. Song E.K., Rah S.Y., Lee Y.R., Yoo C.H., Kim Y.R., Yeom J.H., Park K.H., Kim J.S., Kim U.H., Han M.K. Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca²⁺-mobilizing activity by NAD⁺/cyclic ADP-ribose transport. *J. Biol.*

- Chem.* 2011; 286 (52): 44480–44490. doi: 10.1074/jbc.M111.307645
18. Hayakawa K., Esposito E., Wang X., Terasaki Y., Liu Y., Xing C., Ji X., Lo E.H. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*. 2016; 535 (7613): 551–555. doi: 10.1038/nature18928
19. Guerreiro S., Privat A.L., Bressac L., Toulorge D. CD38 in neurodegeneration and neuroinflammation. *Cells*. 2020; 9 (2): 471. doi: 10.3390/cells9020471
20. Boslett J., Hemann C., Christofi F.L., Zweier J.L. Characterization of CD38 in the major cell types of the heart: endothelial cells highly express CD38 with activation by hypoxia-reoxygenation triggering NAD(P)H depletion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018; 314 (3): 297–309. doi: 10.1152/ajpcell.00139.2017
21. Epelbaum S., Youssef I., Lacor P.N., Chaurand P., Duplus E., Brugg B., Duyckaerts C., Delatour B. Acute amnesic encephalopathy in amyloid- β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion *in vivo*. *Neurobiol. Aging*. 2015; 36 (6): 2043–2052. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005
22. Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2007; 147 (1): 28–36. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.011
23. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol.* 2008; 85C: 243–272. doi: 10.1016/S0091-679X(08)85011-X
24. Zhu X.H., Lu M., Lee B.Y., Ugurbil K., Chen W. *In vivo* NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112 (9): 2876–2881. doi: 10.1073/pnas.1417921112
25. Xie N., Zhang L., Gao W., Huang C., Huber P.E., Zhou X., Li C., Shen G., Zou B. NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct. Target Ther.* 2020; 5 (1): 227. doi: 10.1038/s41392-020-00311-7
26. Luengo A., Li Z., Gui D.Y., Sullivan L.B., Zagorulya M., Do B.T., Ferreira R., Naamati A., Ali A., Lewis C.A., Thomas C.J., Spranger S., Matheson N.J., Vander Heiden M.G. Increased demand for NAD⁺ relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Mol. Cell*. 2021; 81 (4): 691–707. doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.012
27. Braidly N., Berg J., Clement J., Khorshidi F., Poljak A., Jayasena T., Grant R., Sachdev P. Role of nicotinamide adenine dinucleotide and related precursors as therapeutic targets for age-related degenerative diseases: rationale, biochemistry, pharmacokinetics, and outcomes. *Antioxid. Redox Signal.* 2019; 30 (2): 251–294. doi: 10.1089/ars.2017.7269
28. Mills K.F., Yoshida S., Stein L.R., Grozio A., Kubota S., Sasaki Y., Redpath P., Migaud M.E., Apte R.S., Uchida K., Yoshino J., Imai S.I. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice. *Cell Metab.* 2016; 24 (6): 795–806. doi: 10.1016/j.cmet.2016.09.013
29. Wang X., Hu X., Yang Y., Takata T., Sakurai T. Nicotinamide mononucleotide protects against β -amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death. *Brain Res.* 2016; 1643: 1–9. doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.060
30. Gerasimenko M., Cherepanov S.M., Furuhashi K., Lopatina O., Salmina A.B., Shabalova A.A., Tsuji C., Yokoyama S., Ishihara K., Brenner C., Higashida H. Nicotinamide riboside supplementation corrects deficits in oxytocin, sociability and anxiety of CD157 mutants in a mouse model of autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1): 10035. doi: 10.1038/s41598-019-57236-7
31. Choi J.E., Mostoslavsky R. Sirtuins, metabolism, and DNA repair. *Curr. Opin Genet. Dev.* 2014; 26: 24–32. doi: 10.1016/j.gde.2014.05.005
32. Bruzzone S., Guida L., Zocchi E., Franco L., de Flora A. Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J.* 2001; 15 (1): 10–12. doi: 10.1096/fj.00-0566fje
33. Clement J., Wong M., Poljak A., Sachdev P., Braidly N. The plasma NAD⁺ metabolome is dysregulated in «normal» aging. *Rejuvenation Res.* 2019; 22 (2): 121–130. doi: 10.1089/rej.2018.2077
34. Billington R.A., Travelli C., Ercolano E., Galli U., Roman C.B., Grolla A.A., Canonico P.L., Condorelli F., Genazzani A.A. Characterization of NAD uptake in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (10): 6367–6374. doi: 10.1074/jbc.M706204200
35. Leung S.W.S., Shi Y. The glycolytic process in endothelial cells and its implications. *Acta Pharmacol. Sin.* 2021. doi: 10.1038/s41401-021-00647-y
36. Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015; 64: 174–184. doi: 10.1016/j.biocel.2015.04.005

Сведения об авторах:

Алина Асатовна Семёнова, к.б.н., ORCID: 0000-0002-2682-8979, e-mail: alina_shamsutdin@mail.ru

Яна Валерьевна Горина, к.фарм.н., ORCID: 0000-0002-3341-1557, e-mail: yana_20@bk.ru

Елена Дмитриевна Хилажева, ORCID: 0000-0002-9718-1260, e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

Екатерина Викторовна Харитонова, к.фарм.н., ORCID: 0000-0002-1359-9249,

e-mail: ekaterinav1201@gmail.com

Алла Борисовна Салмина, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0003-4012-6348, e-mail: allasalmina@mail.ru

Information about the authors:

Alina A. Semenova, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2682-8979,

e-mail: alina_shamsutdin@mail.ru

Yana V. Gorina, candidate of pharmaceutical sciences, ORCID: 0000-0002-3341-1557, e-mail: yana_20@bk.ru

Elena D. Khilazheva, ORCID: 0000-0002-9718-1260, e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

Ekaterina V. Kharitonova, candidate of pharmaceutical sciences, ORCID: 0000-0002-1359-9249,

e-mail: ekaterinav1201@gmail.com

Alla B. Salmina, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0003-4012-6348, e-mail: allasalmina@mail.ru

Поступила в редакцию 17.06.2021

После доработки 07.08.2021

Принята к публикации 27.08.2021

Received 17.06.2021

Revision received 07.08.2021

Accepted 27.08.2021

Изучение влияния экстракта *Astragalus vulpinus* на процессы перекисного окисления липидов в гипоталамической области на модели липополисахаридного иммунного стресса

М.А. Самотруева, А.А. Цибизова, М.У. Сергалиева

Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России
414000, г. Астрахань, ул. Бакинская 121

Резюме

Экспериментальное исследование посвящено изучению влияния экстракта *Astragalus vulpinus* на процессы перекисного окисления липидов в гипоталамической области в условиях липополисахаридного иммунного стресса. **Материал и методы.** Эксперименты выполнены на белых крысах – самцах 6–8-месячного возраста. Во всех сериях экспериментов животные были разбиты на группы ($n = 10$): первая – контрольные особи, получавшие дистиллированную воду в эквивалентном объеме; вторая – крысы с моделью иммунного стресса; третья – животные, получавшие на фоне иммунного стресса экстракт *Astragalus vulpinus*. Исследуемый экстракт и дистиллированную воду вводили один раз в сутки внутривентрикулярно с помощью зонда в дозе 50 мг/кг в течение 14 дней. Иммунный стресс формировали путем однократного внутрибрюшинного введения липополисахарида – пирогенала, выделенного из микробных клеток *Salmonella typhi*. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления изучали по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), спонтанной и аскорбатзависимой скорости перекисного окисления липидов, а также определяли активность каталазы. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что иммунный стресс сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления, о чем свидетельствует повышение концентрации ТБК-РП и активности фермента антиоксидантной защиты организма – каталазы. Оценка влияния экстракта травы *Astragalus vulpinus* на интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов в гипоталамической области на фоне действия липополисахарид-индуцированного иммунного стресса показала, что он проявляет выраженные стресспротекторные и антиоксидантные свойства, характеризующиеся изменением интенсивности процессов липидной перекисной окисления и увеличением активности каталазы в ткани гипоталамической области головного мозга. **Заключение.** Доказано, что экстракт травы *Astragalus vulpinus* проявляет антиоксидантное действие, восстанавливая интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов.

Ключевые слова: липополисахарид, иммунный стресс, перекисное окисление липидов, *Astragalus vulpinus*, белые крысы, гипоталамическая область.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Сергалиева М.У., e-mail: charlina_astr@mail.ru

Для цитирования: Самотруева М.А., Цибизова А.А., Сергалиева М.У. Изучение влияния экстракта *Astragalus vulpinus* на процессы перекисного окисления липидов в гипоталамической области на модели липополисахаридного иммунного стресса. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 47–52. doi: 10.18699/SSMJ20210506

Study of effect of *Astragalus vulpinus* extract on lipid peroxidation processes in hypothalamic region on lipopolysaccharide immune stress model

M.A. Samotrueva, A.A. Tsibizova, M.U. Sergaliev

Astrakhan State Medical University of Minzdrav of Russia
414000, Astrakhan, Bakinskaya str., 121

Abstract

An experimental study is devoted to the study of the effect of *Astragalus vulpinus* extract on lipid peroxidation processes in the hypothalamic region under conditions of lipopolysaccharide immune stress. **Material and methods.** Experiments

were performed on white male rats 6-8 months of age. In all series of experiments, animals were divided into groups ($n = 10$): 1st – control individuals receiving distilled water in an equivalent volume; 2nd – rats with immune stress model; 3rd – individuals treated with *Astragalus vulpinus* extract against the background of immune stress. The test extract and distilled water were administered once a day intragastrically with a 50 mg/kg probe for 14 days. Immune stress was formed by single intraperitoneal administration of lipopolysaccharide pyrogenal isolated from *Salmonella typhi* microbial cells. The intensity of free radical oxidation processes was studied by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content, spontaneous and ascorbate-dependent lipid peroxidation rate and catalase activity were also determined. **Results.** According to the results of the experiment, it was revealed that immune stress is accompanied by the activation of free-radical oxidation processes, as evidenced by an increase in the concentration of products of this process and the activity of the body's antioxidant protection enzyme catalase. Assessment of the effect of *Astragalus vulpinus* herb extract on the free radical potential in the hypothalamic region against the background of the action of lipopolysaccharide-induced immune stress showed that the studied extract exhibits pronounced stress-protective and antioxidant properties characterized by changing the intensity of lipid peroxidation processes and by increase of catalase activity in the tissue of the hypothalamic brain region. **Conclusions.** *Astragalus vulpinus* herb extract has been proven to exhibit antioxidant effects by restoring activity of free radical processes.

Key words: lipopolysaccharide, immune stress, lipid peroxidation, *Astragalus vulpinus*, white rats, hypothalamic region.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Sergaliev M.U., e-mail: charlina_ast@mail.ru

Citation: Samotrueva M.A., Tsibizova A.A., Sergaliev M.U. Study of effect of *Astragalus vulpinus* extract on lipid peroxidation processes in hypothalamic region on lipopolysaccharide immune stress model. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 47–52. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210506

Введение

На сегодняшний день доказано, что любые неблагоприятные изменения окружающей среды вызывают стресс-реакцию в организме, которая выражается изменением клеточного метаболизма [1–3], активности генетического аппарата, необратимыми процессами [4], ведущими к гибели клетки (свободнорадикальное окисление, снижение синтеза белков) и другими эффектами [5–7]. Одним из основных проявлений нарушения клеточного метаболизма при стрессе является чрезмерная активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая сопровождается деструкцией клеточных мембран [8–10], и, как следствие, может быть причиной развития или обострения сердечно-сосудистых заболеваний, нарушения функции иммунной системы, поражения центральной нервной системы, воспалительных процессов и т.д. [11–13]. Установлено, что для оптимального жизнеобеспечения организма количество продуктов ПОЛ в тканях поддерживается на определенном уровне с помощью антиоксидантной системы, регулирующей функциональную активность всех систем организма [14, 15].

Учитывая вышесказанное, возникает необходимость поиска и изучения средств профилактики и коррекции изменений антиоксидантного статуса организма, возникающих под воздействием различных стрессогенных факторов. Часто в качестве средств коррекции применяются препараты на основе растительных источников, как

правило, хорошо переносимые, содержащие комплекс биологически активных веществ и обладающие весьма незначительным числом побочных эффектов [16, 17]. Особое внимание привлекают представители растений крупнейшего рода Астрагал (*Astragalus*). К настоящему времени в научной литературе имеются данные, доказывающие, что извлечения из отдельных видов растений рода *Astragalus* обладают антидепрессивной, антистрессорной, иммунокорригирующей, противомикробной и другими видами активности [18]. Одним из перспективных представителей данного рода является Астрагал лисий (*Astragalus vulpinus* Willd), произрастающий в Астраханской области. Ранее проведенные исследования доказали наличие в данном растении комплекса биологически активных веществ, основными компонентами которого являются сапонины, флавоноиды и органические кислоты. Установлено, что именно перечисленные соединения обеспечивают разностороннюю фармакологическую активность экстрактов *Astragalus vulpinus* [19].

Целью исследования явилось изучение влияния экстракта травы *Astragalus vulpinus* Willd на интенсивность процессов ПОЛ в гипоталамической области в условиях индуцированного липополисахаридом иммунного стресса.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на белых крысах – самцах 6–8-месячного возраста в соответствии с Приказом Минздрава России № 199н от

01.04.2016 «Об утверждении Правил лабораторной практики» и одобрены локальным этическим комитетом Астраханского государственного медицинского университета (протокол заключения № 6 от 27 ноября 2018 года). Во всех сериях экспериментов животные были разбиты на группы ($n = 10$): первая – контрольные особи, получавшие дистиллированную воду в эквивалентном объеме; вторая – крысы с моделью иммунного стресса; третья – животные, получавшие на фоне иммунного стресса экстракт Астралага лисьего, содержащего комплекс биологически активных веществ.

Трава Астралага лисьего была собрана на территории Астраханской области в период активного цветения (май, 2020 г.) с последующей сушкой воздушно-теньевым способом. Исследуемый экстракт и дистиллированную воду вводили один раз в сутки внутривентрально с помощью зонда в дозе 50 мг/кг в течение 14 дней. Липополисахаридный иммунный стресс (модель ЛПС-индуцированной патологии) формировали путем однократного внутривентрального введения пирогенала – ЛПС, выделенного из микробных клеток *Salmonella typhi* в дозе 100 мкг/кг (производитель – филиал «Медгамал» ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», Россия).

Для подтверждения формирования стресс-реакции определяли наличие «стрессорной триады»: исследовали слизистую оболочку желудка с целью выявления эрозивно-язвенных образований, определяли массу надпочечников с последующим расчетом относительного коэффициента их массы (мг/г массы тела), подсчитывали количество эозинофилов на мазках периферической крови, окрашенных по Романовскому – Гимзе, и выражали в процентах от числа лейкоцитов. Состояние слизистой оболочки желудка оценивали после его продольного разреза вдоль большой кривизны и визуального контроля с использованием бинокулярной лупы с 6-кратным увеличением, обращая при этом внимание на складчатость, рельеф слизистой оболочки, наличие язв, эрозий, кровоизлияний.

Изучали интенсивность окислительно-восстановительных процессов в гомогенате гипоталамической области головного мозга, полученной после иссечения тканей переднего и заднего мозга с сохранением вентральной части промежуточного; в качестве объекта исследования гипоталамическая область выбрана с учетом ее роли в регулировании адаптационных механизмов организма в ответ на стресс-реакцию. Спектрофотометрическим методом определяли содержание продуктов, образующих розовый

триметиновый комплекс при взаимодействии с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты, ТБК-РП); регистрировали три показателя – содержание ТБК-РП (нмоль ТБК-РП на 1 г ткани), скорость спонтанного ПОЛ (нмоль ТБК-РП на 1 л за 1 час инкубации с ТБК) и скорость аскорбатзависимого ПОЛ (нмоль МДА на 1 л за 1 час инкубации с ТБК и аскорбиновой кислотой). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ПЭ-5400В (Россия) при длине волны 532 нм.

В ткани гипоталамической области головного мозга также измеряли активность антиоксидантного фермента каталазы с применением метода, в основе которого лежит способность фермента расщеплять перекись водорода, образующую с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ПЭ-5400В при длине волны 410 нм, результаты представляли в процентах от контроля (пробы без гомогенатов).

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений, достоверными считались результаты при $p < 0,05$. Связь между различными признаками в исследуемой выборке определялась с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

Результаты и их обсуждение

По результатам исследования у особей, подвергшихся ЛПС-воздействию, было подтверждено формирование стресс-реакции (развитие «стрессорной триады») в виде увеличения массы надпочечников на 53 % (рис. 1, а), снижения числа эозинофилов на 53 % (рис. 1, б) и повышения выраженности язвенного поражения слизистой оболочки желудка на 71 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными (рис. 1, в). Применение экстракта Астралага лисьего на фоне ЛПС-иммунного стресса привело к статистически значимому снижению относительного коэффициента массы надпочечников и степени эрозивно-язвенного поражения слизистой оболочки желудка на 33 и 50 % соответственно (см. рис. 1, а) на фоне повышения доли эозинофилов в периферической крови на 70 % (см. рис. 1, б) по отношению к стрессированным животным.

Изучение влияния иммунного стресса на процессы ПОЛ в гомогенате ткани гипоталамической области показало увеличение уровня ТБК-РП в

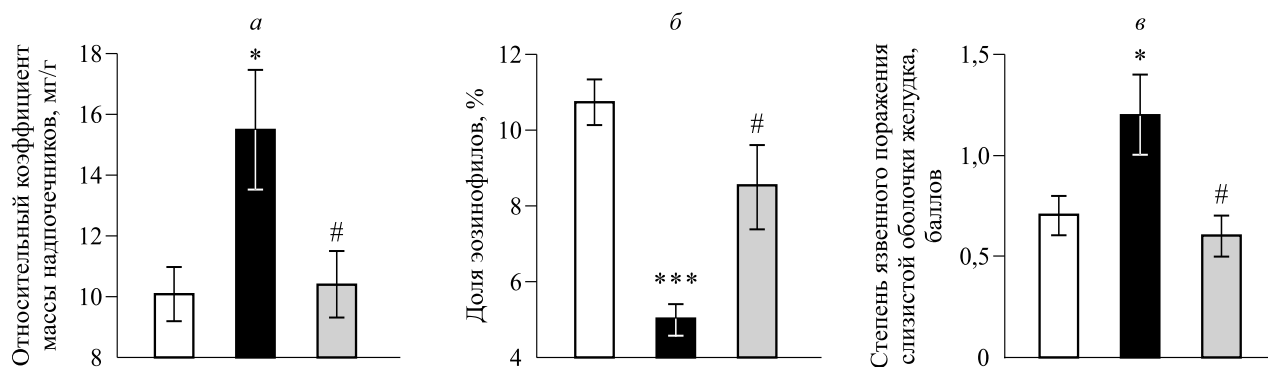


Рис. 1. Влияние экстракта травы *Astragalus vulpinus* Willd на показатели «стрессорной триады» в условиях ЛПС-индуцированного иммунного стресса: относительный коэффициент массы надпочечников (а), относительное число эозинофилов (б), степень язвенного поражения слизистой оболочки желудка (в). Белые столбики – контроль, черные столбики – иммунный стресс, серые столбики – иммунный стресс + экстракт астрагала. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей группы контроля (* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$) и группы иммунного стресса (# – $p < 0,05$).

Fig. 1. Effect of *Astragalus vulpinus* Willd herb extract on «stress triad» scores in LPS-induced immune stress setting: relative coefficient of adrenal gland mass, mg/g body weight (a); relative number of eosinophils, % (б); degree of gastric mucosa ulcerative lesion, scores (в). White bars – control, black bars – immune stress, grey bars – immune stress + *Astragalus vulpinus*. Statistically significant differences from the values of the corresponding indicators of the control group (* – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$) and the immune stress group (# – $p < 0.05$) are designated

3,2 раза (рис. 2, а) и скорости спонтанного ПОЛ на 29 % (рис. 2, в) по сравнению с контрольными животными. На скорость аскорбатзависимого окисления липидов стресс влияния практически не оказал ($p > 0,05$) (рис. 2, з). Введение экстракта Астрагала лисьего стрессированным животным сопровождалось достоверным понижением ин-

тенсивности процессов липидной пероксидации в ткани гипоталамической области по сравнению с крысами второй группы: содержания ТБК-РП на 34 % (см. рис. 2, а), скорости спонтанного и аскорбатзависимого ПОЛ на 28 % (см. рис. 2, в) и более чем на 40 % ($p < 0,01$) соответственно (см. рис. 2, з). Активность каталазы в гомогенатах

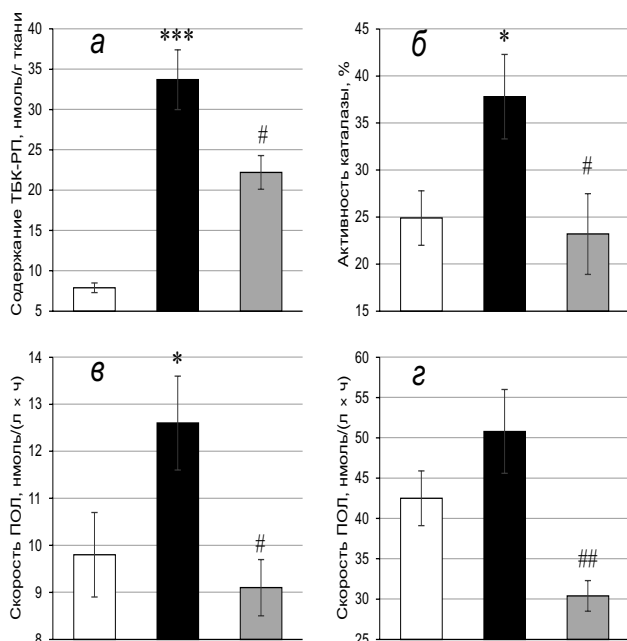


Рис. 2. Влияние экстракта травы *Astragalus vulpinus* Willd на интенсивность процессов свободнорадикального окисления в гипоталамической области крыс в условиях ЛПС-индуцированного иммунного стресса: содержание ТБК-РП (а), активность каталазы (б), скорость спонтанного (в) и аскорбат-зависимого ПОЛ (з). Белые столбики – контроль, черные столбики – иммунный стресс, серые столбики – иммунный стресс + экстракт астрагала. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей группы контроля (* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$) и группы иммунного стресса (# – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$)

Fig. 2. Effect of *Astragalus vulpinus* Willd herb extract on free radical oxidation activity in hypothalamic region in LPS-induced immune stress setting: TBARS content (а), catalase activity (б), spontaneous (в) and ascorbate-dependent lipid peroxidation rate (з). White bars – control, black bars – immune stress, grey bars – immune stress + *Astragalus vulpinus*. Statistically significant differences from the values of the corresponding indicators of the control group (* – at $p < 0.05$, *** – at $p < 0.001$) and the immune stress group (# – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$) are designated

те ткани гипоталамической области стрессированных животных, статистически значимо возросшая по отношению к контрольным особям (на 40 %), при введении экстракта астрагала в условиях иммунного стресса достоверно уменьшилась относительно группы «стресс» (на 39 %) (см. рис. 2, б). Очевидно, повышение активности каталазы у стрессированных крыс следует рассматривать как проявление компенсаторной стимуляции эндогенной антиоксидантной защиты организма животных в ответ на индуцированное стресс-реакцией повышение интенсивности свободнорадикальных окислительных процессов, а назначение Астрагала лисьего, уменьшающего выраженность последних, отменяет и необходимость увеличения активности каталазы.

Оценка влияния экстракта травы Астрагала лисьего на активность свободнорадикальных окислительных процессов в гипоталамической области на фоне действия ЛПС-индуцированного иммунного стресса показала, что изучаемый экстракт проявляет выраженные стресспротекторные и антиоксидантные свойства, характеризующиеся изменением интенсивности процессов ПОЛ и восстановлением активности каталазы в гомогенате изучаемой структуры головного мозга.

Заключение

Таким образом, установлено, что иммунный стресс сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления, о чем свидетельствует повышение концентрации продуктов данного процесса и активности фермента антиоксидантной защиты организма – каталазы. Внутривенное введение экстракта Астрагала лисьего оказало выраженное антиоксидантное действие, что подтверждается уменьшением параметров ПОЛ в гомогенате гипоталамической области, а также восстановлением активности каталазы до контрольных значений. Результаты проведенного исследования показали, что стресспротекторное действие экстракта травы Астрагала лисьего определяется регулирующим влиянием на гипоталамическую область головного мозга.

Список литературы / References

1. Андрианова Е.В., Егорова Е.Н. Оксидативный стресс в патогенезе заболеваний. *Молодежь и медицинская наука*: сб. тр. V Межвуз. науч.-практ. конф. молодых ученых, Тверь, 23 ноября 2017. Тверь: Тверская ГМА, 2018. 30–34.

Andrianova E.V., Egorova E.N. Oxidative stress in the pathogenesis of diseases. *Youth and medical science*: sb. labor. V Inter-University. scientific and prac-

tical. conf. young scientists, Tver, November 23, 2017. Tver: TSMA, 2018. 30–34. [In Russian].

2. Колесникова Л.Р. Стресс-индуцированные изменения жизнедеятельности организма. *Вестн. Смол. гос. мед. акад.* 2018; 17 (4): 30–36.

Kolesnikova L.R. Stress-induced changes in the body's vital activity. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj meditsinskoy akademii = Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*. 2018; 17 (4): 30–36. [In Russian].

3. Панина Н.О. Нейрогуморальная регуляция стресс-реакций. *Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития отечественного агропромышленного комплекса*: мат. Национальной науч.-практ. конф., Рязань, 12 декабря 2019. Ч. I. Рязань, 2020. 134.

Panina N.O. Neurogumoral regulation of stress responses. *Scientific and innovative technologies as a factor in the sustainable development of the domestic agro-industrial complex*: mats of the National Scientific and Practical Society. conf., Ryazan, December 12, 2019. Pt. I. Ryazan, 2020. 134. [In Russian].

4. Токарев А.Р. Нейро-цитокиновые механизмы острого стресса (обзор литературы). *Вестн. нов. мед. технол.* 2019; 13 (3): 194–204.

Tokarev A.R. Neuro-cytokine mechanisms of acute stress (literature review). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*. 2019; 13 (3): 194–204. [In Russian].

5. Galluzzi L., Yamazaki T., Kroemer G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018; 19 (11): 731–745. doi: 10.1038/s41580-018-0068-0

6. Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2019; 24 (8): 1583. doi: 10.3390/molecules24081583

7. Yaribeygi H., Panahi Y., Sahraei H., Johnston T.P., Sahebkar A. The impact of stress on body function: A review. *EXCLI J.* 2017; 16: 1057–1072. doi: 10.17179/excli2017-480

8. Кузник Б.И., Чалисова Н.И., Цыбиков Н.Н., Линькова Н.С., Давыдов С.О. Стресс, старение и единая гуморальная защитная система организма. Эпигенетические механизмы регуляции. *Успехи физиол. наук.* 2020; 51 (3): 51–68. doi: 10.31857/S030117982002006X

Kuznik B.I., Chalisova N.I., Tsybikov N.N., Linkova N.S., Davydov S.O. Stress, aging and a single humoral protective system of the body. Epigenetic mechanisms of regulation. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Successes of Physiological Sciences*. 2020; 51 (3): 51–68. [In Russian]. doi: 10.31857/S030117982002006X

9. Лысенко В.И. Оксидативный стресс как неспецифический фактор патогенеза органических повреждений (обзор литературы и собственных исследований). *Мед. неотлож. состояний.* 2020; 16 (1): 24–35. doi: 10.22141/2224-0586.16.1.2020.196926

Lysenko V.I. Oxidative stress as a non-specific factor in the pathogenesis of organ lesions (review of literature and own studies). *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy = Emergency Medicine*. 2020; 16 (1): 24–35. [In Russian]. doi: 10.22141/2224-0586.16.1.2020.196926

10. Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Новоселова Т.В., Хренов М.О., Парфенюк С.Б., Лунин С.М., Смолихина Т.И., Виноградова Е.В. Окислительный стресс и антиоксиданты при патологиях, сопровождаемых иммунодефицитом. *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*: сб. ст. Междунар. конф., Пушино, 22–25 мая 2017. Пушино: Fix-Print, 2017. 543–548.

Novoselova E.G., Glushkova O.V., Novoselova T.V., Khrenov M.O., Parfenyuk S.B., Lunin S.M., Smolikhina T.I., Vinogradova E.V. Oxidative stress and antioxidants in pathologies accompanied by immunodeficiency. *Receptors and intracellular signaling*: sb. art. International. conf., Pushchino, May 22–25, 2017. Pushchino: Fix-Print, 2017. 543–548. [In Russian].

11. Прохоренко И.О., Германова В.Н., Сергеев О.С. Стресс и состояние иммунной системы в норме и патологии. Краткий обзор литературы. *Вестн. мед. ин-та «РЕАВИЗ»*. 2017; 1 (25): 82–90.

Prokhorenko I.O., Germanova V.N., Sergeev O.S. Stress and state of the immune system in normal and pathology. A brief review of the literature. *Vestnik meditsinskogo instituta «REAVIZ»: reabilitatsiya, vrach i zdorov'ye = Bulletin of the Medical Institute «REAVIZ»: Rehabilitation, Physician and Health*. 2017; 1 (25): 82–90. [In Russian].

12. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 482 (3): 419–425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086

13. Ходос М.Я., Казаков Я.Е., Видревич М.Б., Брайнина Х.З. Окислительный стресс и его роль в патогенезе. *Вестн. Урал. мед. акад. науки*. 2017; 14 (4): 381–398. doi: 10.22138/2500-0918-2017-14-4-381-398

Khodos M.Ya., Kazakov Ya.E., Vidrevich M.B., Brainina H.Z. Oxidative stress and its role in pathogenesis. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*. 2017; 14 (4): 381–398. [In Russian]. doi: 10.22138/2500-0918-2017-14-4-381-398

14. Фурман Ю.В., Артюшкова Е.Б., Аниканов А.В. Окислительный стресс и антиоксиданты. *Актуальные проблемы социально-гуманитарного и научно-технического знания*. 2019; 17 (1): 1–3.

Furman Yu.V., Artyushkova E.B., Anikanov A.V. Oxidative stress and antioxidants. *Aktual'nye problemy sotsial'no-gumanitarnogo i nauchno-tekhnicheskogo znaniya = Topical Problems of Social, Humanitarian and Scientific and Technical Knowledge*. 2019; 17 (1): 1–3. [In Russian].

15. Franco R., Vargas M.R. Redox biology in neurological function, dysfunction, and aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2018; 28 (18): 1583–1586. doi: 10.1089/ars.2018.7509

16. Panossian A. Understanding adaptogenic activity: specificity of the pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals. *Ann. NY Acad. Sci.* 2017; 1401 (1): 49–64. doi: 10.1111/nyas.13399

17. Panossian A., Brendler T. The role of adaptogens in prophylaxis and treatment of viral respiratory infections. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; 13 (9): 236. doi: 10.3390/ph13090236

18. Ross S.M. Resistance for strength: the role of phytomedicine adaptogens in stress management. *Holist. Nurs. Pract.* 2020; 34 (5): 314–317. doi: 10.1097/HNP.0000000000000408

19. Adesso S., Russo R., Quaroni A., Autore G., Marzocco S. *Astragalus membranaceus* extract attenuates inflammation and oxidative stress in intestinal epithelial cells via NF-κB activation and Nrf2 response. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (3): 800. doi: 10.3390/ijms19030800

Сведения об авторах:

Марина Александровна Самотруева, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-5336-4455, e-mail: ms1506@mail.ru
Александра Александровна Цибизова, к.фарм.н., ORCID: 0000-0002-9994-4751, e-mail: sasha3633@yandex.ru
Мариям Утежановна Сергалиева, к.б.н., ORCID: 0000-0002-9630-2913, e-mail: charlina_astr@mail.ru

Information about the authors:

Marina A. Samotrueva, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-5336-4455, e-mail: ms1506@mail.ru
Aleksandra A. Tsibizova, candidate of pharmaceutical sciences, ORCID: 0000-0002-9994-4751, e-mail: sasha3633@yandex.ru
Mariyam U. Sergaliev, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-9630-2913, e-mail: charlina_astr@mail.ru

Поступила в редакцию 21.06.2021

После доработки 06.09.2021

Принята к публикации 23.09.2021

Received 21.06.2021

Revision received 06.09.2021

Accepted 23.09.2021

Влияние культивирования мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином на их морфофункциональные свойства

А.П. Лыков^{1,2}, М. Хевор³, М.А. Суровцева^{1,2}, Н.А. Бондаренко^{1,2}, И.И. Ким^{1,2},
О.В. Повещенко^{1,2}

¹ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² НМИЦ имени академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

³ Институт медицины и психологии им. В. Зельмана Новосибирского государственного университета
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Резюме

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) рассматриваются как перспективный инструмент для лечения воспалительно-дегенеративных заболеваний, но их эффективность связана с выживаемостью клеток в неблагоприятном микроокружении. Эритропоэтин проявляет антиапоптотический эффект для негемопоэтических клеток организма человека и животных. Целью исследования стала оценка морфофункциональных свойств МСК, культивированных с эритропоэтином. **Материал и методы.** МСК получены из аспирата костного мозга больных хронической сердечной недостаточностью. Первичную культуру МСК-ЭПО получали культивированием МСК 4-го пассажа в течение 7–8 дней с эритропоэтином в дозе 33 МЕ/мл. Исследовали фенотип МСК, их дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлении, пролиферацию, миграцию и продукцию клетками оксида азота. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что культивирование МСК с эритропоэтином способствует увеличению экспрессии основных поверхностных молекул, характеризующих принадлежность клеток к истинным МСК, большей выраженности дифференцировки МСК в адипоциты и остеобласты, изменению уровня экспрессии молекул адгезии, снижению выраженности апоптоза, усилению миграции клеток при индукции окислительного стресса и гипергликемии. **Заключение.** Культивирование МСК с эритропоэтином способствует увеличению устойчивости клеток к неблагоприятным факторам микроокружения.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки костного мозга, эритропоэтин, пролиферация, колониеобразование, миграция, молекулы адгезии, клеточный цикл, апоптоз/некроз, оксид азота.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Лыков А.П., e-mail: aplykov2@mail.ru

Для цитирования: Лыков А.П., Хевор М., Суровцева М.А., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Повещенко О.В. Влияние культивирования мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином на их морфофункциональные свойства. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 53–61. doi: 10.18699/SSMJ20210507

Effect of mesenchymal stem cells cultivation with erythropoietin on their morphofunctional properties

A.P. Lykov^{1,2}, M. Khevor³, M.A. Surovtseva^{1,2}, N.A. Bondarenko^{1,2}, I.I. Kim^{1,2},
O.V. Poveshchenko^{1,2}

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –
Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

² Meshalkin National Medical Research Center of Minzdrav of Russia
630055, Novosibirsk, Reshkunovskaya str., 15

³ V. Zelman Institute of Medicine and Psychology of Novosibirsk State University
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 1

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are considered as a promising tool for the treatment of inflammatory and degenerative diseases, but their effectiveness is associated with the survival of cells in an unfavorable microenvironment. Erythropoietin exhibits an anti-apoptotic effect for non-hematopoietic cells of the human and animal body. The aim of the study was to evaluate the morphofunctional properties of MSCs cultured with erythropoietin. **Material and methods.** MSCs were obtained from bone marrow aspirate of patients with chronic heart failure. The primary culture of MSCs-EPO was obtained by growth MSCs of the 4th passage for 7-8 days with erythropoietin at a dose of 33 IU/mL. The phenotype, differentiation in the adipogenic and osteogenic directions, proliferation, migration, and production of nitric oxide of MSCs were studied. **Results and discussion.** The study revealed that the cultivation of MSCs with erythropoietin contributes to an increase in the expression of the main surface molecules that characterize the cells belonging to true MSCs, possess to differentiated of MSCs into adipocytes and osteoblasts, a change in the expression levels of adhesion molecules, a decrease in the level of apoptosis, increased cell migration during the induction of oxidative stress and hyperglycemia. **Conclusion.** Cultivation of MSCs with erythropoietin increases the resistance of cells to adverse microenvironment factors.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells, erythropoietin, proliferation, colony formation, migration, adhesion molecules, cell cycle, apoptosis/necrosis, nitric oxide.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Lykov A.P., e-mail: aplykov2@mail.ru

Citation: Lykov A.P., Khevor M., Surovtseva M.A., Bondarenko N.A., Kim I.I., Poveshchenko O.V. Effect of mesenchymal stem cells cultivation with erythropoietin on their morphofunctional properties. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 53–61. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210507

Введение

Мезенхимные стволовые клетки (МСК), производные мезодермы, представляют собой популяцию клеток человека и животных, вовлеченных в формирование каркаса паренхиматозных органов, и относятся к стволовым в силу способности к самообновлению, дифференцировке в различные типы клеток соединительной ткани [1]. Способность МСК стимулировать процессы репарации и регенерации поврежденных органов и тканей при воспалительно-дегенеративных процессах в организме человека и животных делает их привлекательными для использования в качестве альтернативного инструмента при лечении различных патологических процессов воспалительно-дегенеративного генеза [2]. Однако при старении и хронических заболеваниях человека и животных уменьшается пул стволовых клеток, они теряют свои функциональные свойства, такие как пролиферация, миграция и продукция биоактивных соединений, что может привести к значительному снижению регенеративного потенциала клеток [3]. Эритропоэтин (ЭПО) помимо активации эритропоэза способен оказывать антиапоптотическое действие на другие клетки организма человека и животных [4]. Требуется разработка методов повышения устойчивости МСК к неблагоприятным факторам микроокружения в патологическом очаге с использованием биологически активных молекул, в том числе с использованием ЭПО.

Цель работы – сравнительное изучение морфофункциональных свойств МСК, полученных от больных ишемической болезнью сердца и росших в отсутствие и в присутствии ЭПО.

Материал и методы

Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, от всех участников получено информированное согласие. Из аспирата костного мозга больных хронической сердечной недостаточностью на градиенте плотности фиколла-верографина получали обогащенную фракцию моноклеаров костного мозга, клетки вносили в питательной среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Hyclone, США), 2 mM L-глутамин («Биолот») и гентамицина сульфата («Дальхимфарм», Россия) в культуральные матрасы на 2–3 суток. Удаляли неприлипшие к пластику клетки и обновляли питательную среду каждые 3–4 дня до получения монослоя в 80–90 % конfluence. Пересев клеток осуществляли раствором трипсина и ЭДТА (1:1; «Биолот»). В работе использованы клетки 4-го пассажа. Культивирование МСК с эритропоэтином («Рекормон», Швейцария) в дозе 33 МЕ/мл осуществляли в течение 7 дней, далее клетки снимали с пластика и исследовали их морфофункциональные свойства (МСК-ЭПО).

Принадлежность полученных клеток к истинным МСК оценивали по фенотипу, дифферен-

цировке в соединительнотканном направлении. Фенотип МСК определяли на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD) по экспрессии на них CD90, CD73 (BD). Для дифференцировки МСК и МСК-ЭПО в остеогенном направлении использовали питательную среду, состоящую из DMEM с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфера (Sigma, США), 80 мкг/мл гентамицина сульфата, 10^{-9} М дексаметазона («Эллара», Россия), 10 mM β -глицерофосфата (Merck, США) и 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфата (Merck), клетки инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 21 дня в 6-луночных культуральных планшетах (TPP, Швейцария). Каждые 3–4 дня меняли питательную среду. Для дифференцировки МСК и МСК-ЭПО в адипогенном направлении использовали питательную среду, состоящую из DMEM с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина сульфата, 10^{-7} М дексаметазона и 0,5 mM изобутилметилксантина (Merck), клетки инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 21 дня в 6-луночных планшетах (TPP). Каждые 3–4 дня меняли питательную среду. После окрашивания клеток масляным красным О (Serva, Германия), по Фон Косса (депозиты кальция выявляли с использованием 1%-го раствора азотнокислого серебра и 5%-го раствора тиосульфата натрия; Merck) с последующим окрашиванием фиксатор-красителем Май – Грюнвальда («Абрис»+, Россия) делали фотографии на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Экспрессию поверхностных молекул адгезии на МСК и МСК-ЭПО исследовали с использованием моноклональных антител к CD18 (интегрин бета-2), CD29 (интегрин бета-1), CD44 (интегральный клеточный гликопротеин, рецептор гиалуроновой кислоты), CD49a (интегрин альфа-1), CD54 (межклеточная молекула адгезии-1) и CD146 (молекула адгезии клеток меланомы), а также рецепторов к ЭПО (ЭПОР), β -субъединицы нескольких высокоаффинных цитокиновых рецепторов I CD131 и ко-экспрессию ЭПОР/CD131 на МСК и МСК-ЭПО исследовали с использованием соответствующих моноклональных антител (BD) на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD).

Клеточный цикл МСК и МСК-ЭПО оценивали с использованием пропидиума йодида (20 мкг/мл; BD), при анализе гистограммы распределения клеток выделяли фазы subG₀G₁ (количество хромосом < 2n), G₀G₁ (количество хромосом 2n), G₂/M (количество хромосом 2n–4n), S (количество хромосом > 4n). Параметры апоптоза и некроза МСК и МСК-ЭПО исследовали с ис-

пользованием аннексина V и пропидида йодида (Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit, BD, США), выделяя гейт мертвых (некротических) клеток, окрашенных только пропидида йодидом; раннего апоптоза клеток, окрашенных только аннексином V; апоптотических клеток, окрашенных аннексином V и пропидида йодидом.

Пролиферацию МСК и МСК-ЭПО оценивали по включению клетками 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (MTT; Merck). Для этого МСК или МСК-ЭПО в количестве 10^4 на лунку вносили в триплетах в 96-луночный планшет (TPP) в питательной DMEM (25 мкг/мл D-глюкозы) с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии и в отсутствие перекиси водорода (100 мкг/мл; Merck), 64 мкг/мл D-глюкозы и ЭПО (33 МЕ/мл) и инкубировали в течение 72 часов при 37 °C и 5 % CO₂. За 4 часа до окончания эксперимента планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут на центрифуге с охлаждением Eppendorf (Германия), надосадочную жидкость удаляли и вносили 100 мкл DMEM без дополнительных ингредиентов, 10 мкл MTT (5 г/л; Sigma, США) и инкубировали в течение 4 часов при 37 °C и 5 % CO₂. Далее надосадочную жидкость удаляли, в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (Merck) с последующей оценкой оптической плотности продукта реакции в лунках на спектрофотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) при длине волны $\lambda = 492$ нм, результат выражали в условных единицах оптической плотности (ед. оп. плот.).

Трансмембранную миграцию МСК и МСК-ЭПО костного мозга больных хронической сердечной недостаточностью изучали с использованием камер Бойдена (BD Falcon TM, США) с микропорами в мембране 8 мкм. Для этого МСК или МСК-ЭПО в количестве 10^4 на лунку вносили в триплетах в камеры Бойдена, которые были вставлены в лунки 24-луночного планшета (TPP), в лунки вносили питательную среду DMEM с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии и в отсутствие перекиси водорода (100 мкг/мл; Merck), 64 мкг/мл D-глюкозы и ЭПО (33 МЕ/мл) и инкубировали в течение 24 часов при 37 °C и 5 % CO₂. По окончании срока эксперимента камеры Бойдена извлекали из лунок, удаляли жидкость, протирали верхнюю часть мембраны ватными тампонами для удаления клеток, окрашивали фиксатор-красителем Май – Грюнвальда в течение 15 минут, промывали, подсушивали, оценивали количество мигрировавших клеток в направлении градиента ростовых факторов на микроскопе Axio Observer Z1 (Zeiss AG, Германия).

Таблица 1. Фенотип МСК

Table 1. Phenotype of mesenchymal stem cells

Параметр	МСК	МСК-ЭПО
CD73, %	64,07 ± 1,29	91,93 ± 0,58*
CD90, %	90,33 ± 0,47	94,00 ± 1,41*
CD18, %	2,30 ± 0,57	5,83 ± 4,09
CD18/CD54, %	0,33 ± 0,05	1,01 ± 0,16*
CD54, %	19,30 ± 3,23	7,90 ± 0,78*
CD29, %	91,73 ± 0,93	96,20 ± 0,45*
CD44, %	92,53 ± 1,26	92,93 ± 0,4
CD49a, %	13,07 ± 1,24	13,97 ± 0,81
CD146, %	10,13 ± 0,05	10,13 ± 0,05
ЭПОР, %	7,23 ± 1,92	10,37 ± 1,94
CD131, %	3,67 ± 1,91	5,70 ± 2,74
ЭПОР/CD131, %	2,37 ± 0,9	2,77 ± 0,56

Примечание. Здесь и далее * – отличие от величины соответствующего показателя МСК статистически значимо при $p < 0,05$.

Для оценки колониеобразующих единиц (КОЕ) 10^3 МСК или МСК-ЭПО помещали в культуральный флакон Т75 на 14 суток в питательной среде, состоящей из DMEM с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамина, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина без добавления и с добавлением перекиси водорода (100 мкМ; Merck), 64 мкМ/л D-глюкозы и ЭПО (33 МЕ/мл), инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂. Каждые 3–4 дня меняли питательную среду. На 15-е сутки питательную среду удаляли, клетки промывали и красили 1%-м спиртовым раствором метиленового синего, подсчитывали количество КОЕ, содержащих более 50 клеток, на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1.

Производство МСК или МСК-ЭПО стойких метаболитов оксида азота (нитритов) определяли спектрофотометрически ($\lambda = 492$ нм) с использованием реактива Грисса в кондиционных средах [5], строили калибровочную кривую с использованием 1 mM нитрита натрия, выражали в мкмоль/мл.

Нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро – Уилка, в таблицах данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$), статистическую значимость различий между образцами оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с использованием поправки Бонферрони и принимали при $p < 0,05$. Наличие взаимосвязей между явлениями исследовали с использованием коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (R).

Таблица 2. Клеточный цикл, апоптоз и некроз МСК

Table 2. Cell cycle, apoptosis and necrosis of the mesenchymal stem cells

Параметр	МСК	МСК-ЭПО
subG ₀ G ₁ , %	2,02 ± 0,18	2,03 ± 0,78
G ₀ G ₁ , %	76,20 ± 7,22	80,03 ± 9,89
S, %	9,37 ± 3,34	10,00 ± 0,82
G ₂ /M, %	15,67 ± 4,19	5,00 ± 0,49
Ранний апоптоз, %	6,67 ± 3,86	6,03 ± 3,7
Апоптоз, %	11,70 ± 1,75	6,57 ± 2,36*
Некроз, %	8,90 ± 3,97	5,00 ± 0,49

Результаты

Выделенные из костного мозга больных МСК относятся к истинным МСК, так как экспрессируют CD73, CD90 и дифференцируются в адипогенном и остеогенном направлении. Культивирование МСК 4-го пассажа в течение 7–8 дней с ЭПО значимо увеличивало экспрессию CD73, CD90 на их мембране (табл. 1), способствовало большей дифференцировке клеток в адипоциты и остеобласты (рис. 1), увеличивало представленность на мембране клеток молекул адгезии (CD18/CD54, CD29), но снижало экспрессию CD54 по сравнению с МСК (см. табл. 1). Отмечена тенденция к увеличению экспрессии на МСК-ЭПО рецепторов к ЭПО и CD131 ($p > 0,05$). Также установлено, что культивирование МСК с ЭПО значимо снижает количество клеток в апоптозе, несколько увеличивает пул клеток в фазе покоя и синтеза клеточного цикла (G₀G₁, S), уменьшает пул клеток в фазе митоза клеточного цикла (G₂/M) и долю некротических клеток ($p > 0,05$) (табл. 2).

Следующим этапом работы стало сравнительное изучение функционального потенциала МСК и МСК-ЭПО при индукции неблагоприятного микроокружения (окислительного стресса и гипергликемии). Нами не выявлено существенного влияния ЭПО на пролиферативный потенциал МСК как в базальных условиях, так и при индукции окислительного стресса, гипергликемии и их комбинации (рис. 2, а; $p > 0,05$), в то же время пролиферация клеток в обеих группах в неблагоприятном микроокружении значимо уменьшалась по сравнению с базальным уровнем, так же как их колониеобразующий потенциал, при этом МСК-ЭПО по сравнению с МСК формируют больше колоний как в стандартных условиях роста, так и при индукции гипергликемии (рис. 2, б, рис. 3).

Окислительный стресс и гипергликемия снижали миграцию МСК и МСК-ЭПО, но более значимо в группе «МСК» (рис. 2, в). Установлено,

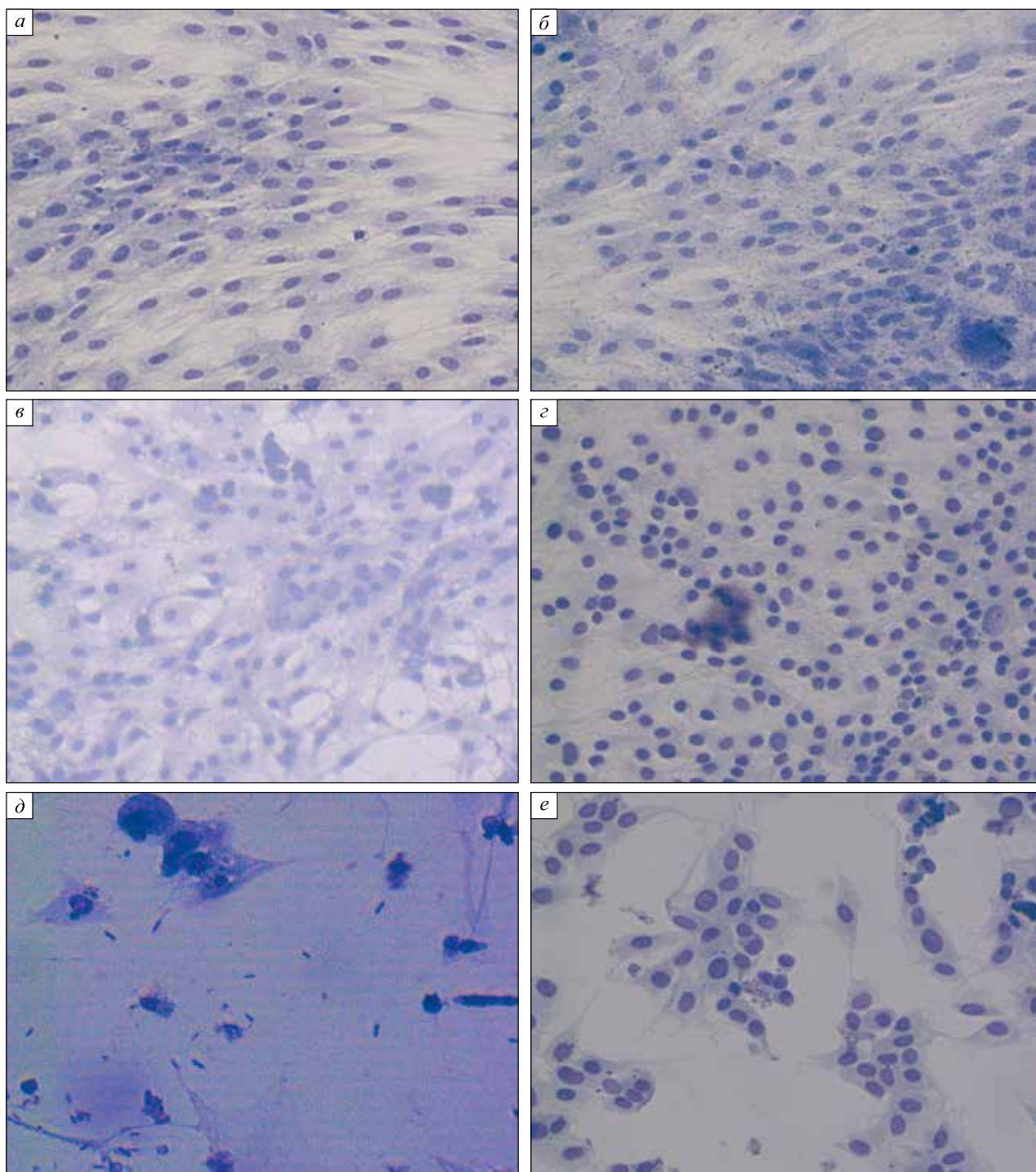


Рис. 1. МСК, росшие в стандартных условиях культивирования (а) и при добавлении ЭПО (б) (33 МЕ/мл), окраска по Май – Грюнвальду, $\times 40$; адипогенная дифференцировка МСК, росших в стандартных условиях культивирования (в) и при добавлении ЭПО (г), окраска масляным красным О и по Май – Грюнвальду, $\times 40$; остеогенная дифференцировка клеток, росших в стандартных условиях культивирования (д) и при добавлении ЭПО (е), окраска по Фон Косса и Май – Грюнвальду, $\times 40$

Fig. 1. Mesenchymal stem cells that grew under standard cultivation conditions (a) and in the presence of erythropoietin (b) (33 IU/ml), May – Grunwald stain, $\times 40$; adipogenic differentiation of cells that grew under standard cultivation conditions (в) and in the presence of erythropoietin (г), oil red O and May – Grunwald stain, $\times 40$; osteogenic differentiation of cells that grew under standard cultivation conditions (д) and in the presence of erythropoietin (е), Von Kossa and May – Grunwald stain, $\times 40$

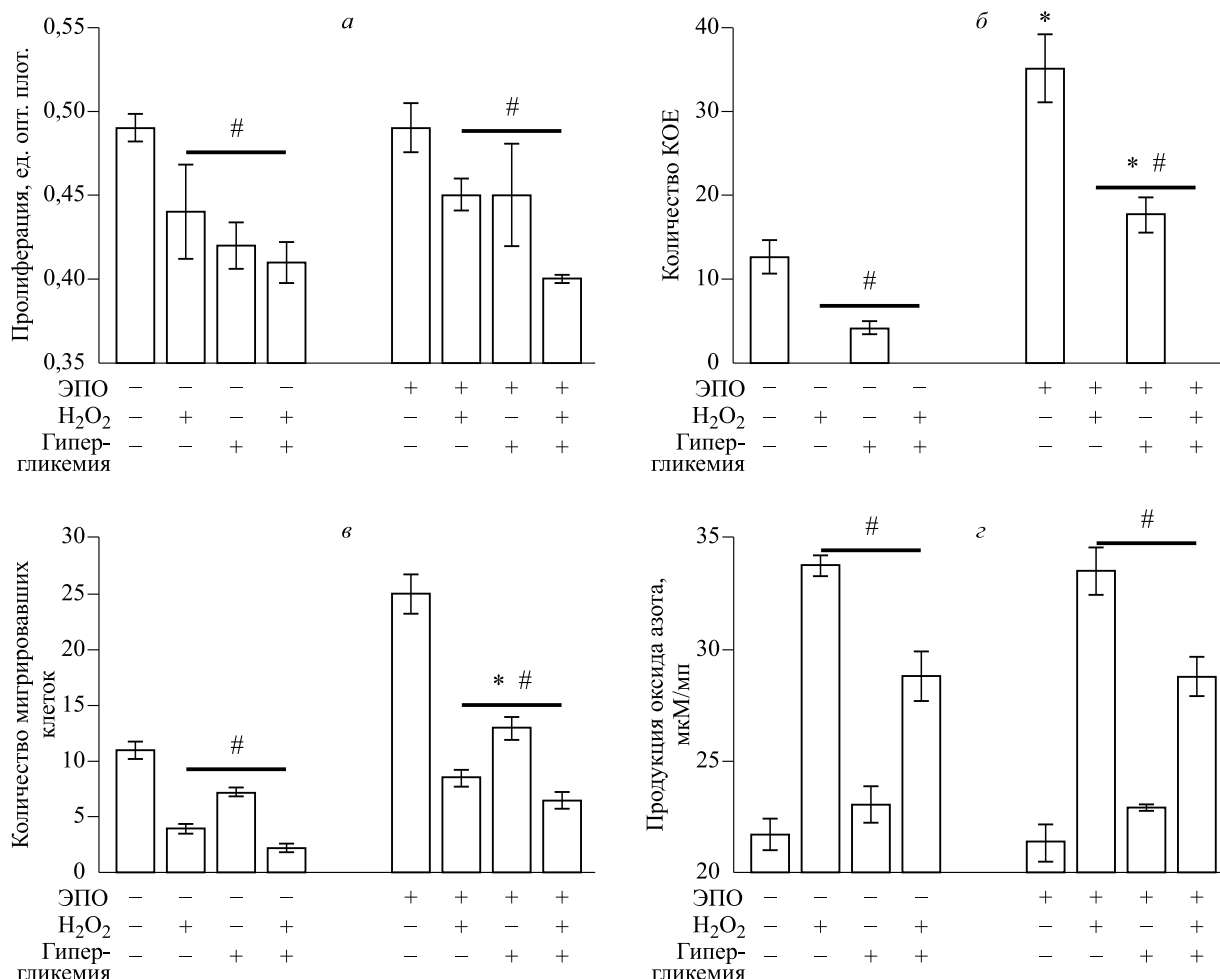


Рис. 2. Влияние окислительного стресса и гипергликемии на пролиферацию (а), колониюобразование (б), миграционный потенциал (в) и продукцию МСК оксида азота (г); # – отличие от величины соответствующего базального уровня статистически значимо при $p < 0,05$

Fig. 2. The effect of oxidative stress and hyperglycemia on proliferation (а), colony formation (б), migration potential (в) and nitric oxide production by mesenchymal stem cells; * – $p < 0.05$ compared to mesenchymal stem cells without erythropoietin, # – $p < 0.05$ compared to basal level

что культивирование МСК с ЭПО способствует большей сохранности миграции клеток при индукции неблагоприятного микроокружения. По уровню базальной продукции оксида азота МСК и МСК-ЭПО значимо не различались (рис. 2, г; $p > 0,05$), но для обеих групп характерен прирост уровня оксида азота в кондиционной среде в условиях окислительного стресса, гипергликемии и их комбинации относительно базального уровня.

Корреляционный анализ полученных данных в группе «МСК» выявил наличие сопряженности базального пролиферативного потенциала клеток с экспрессией CD90, CD18, CD54 ($R = 0,97$; $p = 0,005$), количеством ЭПОР и ранним апоптозом ($R = 0,89$; $p = 0,04$), экспрессией CD131 и долей клеток в фазе синтеза ($R = -0,89$; $p = 0,04$), что может указывать на важность данных маркеров в процессе деления клеток. Кроме этого коло-

ниеобразующая способность МСК в стандартных условиях роста взаимосвязана с выраженностью экспрессии CD54, CD29, CD44, CD49a, CD131, ЭПОР/CD131, долей некротических клеток и долей клеток в фазе синтеза ($R = 0,97$; $p = 0,028$). С другой стороны, колониюобразование МСК находится в обратной связи с экспрессией ЭПОР, долей клеток в раннем апоптозе и в фазе покоя клеточного цикла ($R = -0,91$; $p = 0,028$), свидетельствуя о вовлеченности вышеперечисленных факторов в процесс жизнедеятельности клеток.

В группе «МСК-ЭПО» базальная пролиферация взаимосвязана с выраженностью экспрессии CD73, CD29, CD44, CD49a ($R = 0,89$; $p = 0,04$), CD146 ($R = 0,97$; $p = 0,005$), долей клеток в апоптозе и митозе ($R = 0,89$; $p = 0,04$), что также может быть следствием вовлеченности данных мембранных молекул в реализацию пролифера-

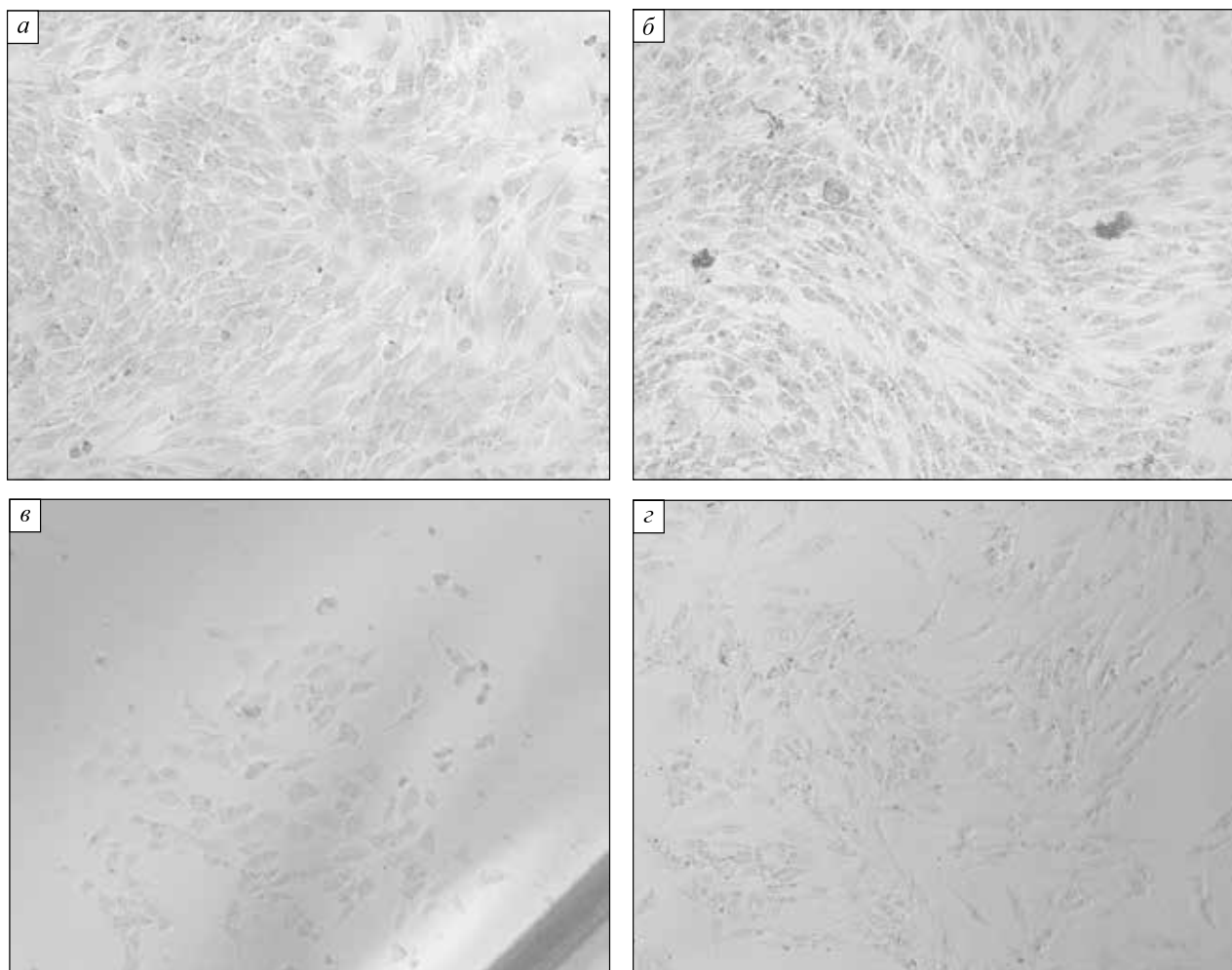


Рис. 3. Колонии МСК, росших в стандартных условиях культивирования (а), при добавлении ЭПО (б), при индукции гипергликемии (в), при добавлении ЭПО и индукции гипергликемии (г). Окраска по Май – Грюнвальду, $\times 20$

Fig. 3. Colonies of mesenchymal stem cells that grew under standard cultivation conditions (a), with the addition of erythropoietin (б), with hyperglycemia induction (в), with the addition of erythropoietin and hyperglycemia induction (г). May – Grunwald stain, $\times 20$

тивного потенциала клеток. Колониеобразующий потенциал МСК-ЭПО сопряжен с экспрессией CD73, CD54, CD29, CD44, CD49a, CD131, долей некротических клеток ($R = -0,91$; $p = 0,028$) и количеством ЭПОР ($R = -0,91$; $p = 0,028$), указывая на существенный вклад молекул адгезии и рецепторов к ЭПО в реализацию формирования очагов роста и в пролиферативную активность клеток. Продукция оксида азота МСК-ЭПО находилась в сопряженности с долей апоптотических/некротических клеток (subG_0G_1) и клеток в фазе покоя (G_0G_1) клеточного цикла ($R = 0,89$; $p = 0,04$ и $R = -0,89$; $p = 0,04$ соответственно), долей клеток в раннем апоптозе ($R = -0,89$; $p = 0,04$) и долей некротических клеток ($R = 0,91$; $p = 0,028$), что может быть следствием диффузии во внешнюю среду содержимого цитоплазмы, в том числе мо-

лекул оксида азота, при нарушении целостности мембраны клеток.

Обсуждение

МСК рассматриваются как альтернативный инструмент при лечении многих воспалительно-дегенеративных процессов [6, 7]. Функциональный потенциал МСК зависит от источника выделения клеток: так, тип жировой ткани влияет на жизнеспособность и цитодифференцировку выделенных из нее МСК [8].

Нами выделены МСК из костного мозга больных хронической сердечной недостаточностью, по фенотипу и потенциалу дифференцировки в клетки соединительной ткани – это истинные МСК. При культивировании МСК с ЭПО выявлено изменение экспрессии основных марке-

ров принадлежности клеток к истинным МСК и молекул адгезии, обеспечивающих интеграцию клеток, усиление выраженности их дифференцировки в адипоциты и остеобласты, повышение устойчивости к неблагоприятным факторам микроокружения. Показано, что на мембране МСК костного мозга крыс имеются CD44, CD54 [9]. Интенсивность пролиферации МСК зависит от уровня глюкозы: при концентрации глюкозы от 5,5 до 25 мМ она усиливается, при содержании более 40 мМ – снижается [10]. Культивирование МСК с ЭПО в дозе 500 МЕ/мл значимо увеличивало интенсивность пролиферации и миграции клеток [11].

Таким образом, культивирование МСК с ЭПО наделяет клетки повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам микроокружения, на уровне тенденции увеличивает экспрессию ЭПОР и ко-экспрессию ЭПОР с CD131, способствует более выраженной дифференцировке МСК в соединительнотканном направлении, что можно рассматривать как факт приобретения клетками новых морфофункциональных свойств, способствующих повышению их выживаемости и способности к регенерации. Необходимы дополнительные клинические испытания МСК-ЭПО с целью подтверждения терапевтического потенциала клеток.

Выводы

1. Культивирование МСК с ЭПО увеличивает экспрессию на них маркеров принадлежности к истинным МСК, интенсивность дифференцировки клеток в адипоциты и остеобласты.
2. Культивирование МСК с ЭПО увеличивает экспрессию на них молекул адгезии CD18/CD54 и CD29, снижает долю апоптотических клеток.
3. Культивирование МСК с ЭПО увеличивает количество колониеобразующих клеток и способствует большей сохранности миграционного потенциала клеток при неблагоприятном микроокружении.

Список литературы / References

1. Паюшина О.В. Локализация и функции мезенхимных стромальных клеток *in vivo*. *Журн. общей биологии*. 2015; 76 (2): 161–172.
Payushina O.V. Localization and functions of mesenchymal stromal cells *in vivo*. *Zhurnal obshchey biologii = J. General Biol.* 2015; 76 (2): 161–172. [In Russian].
2. Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Миллер Т.В., Повещенко А.Ф., Суровцева М.А., Бгатова Н.П., Коненков В.И. Перспективность использования клеточного продукта для терапии кожных дефектов при сахарном диабете. *Клеточ. технол. в биол. и мед.* 2017; 3: 175–177.

Lykov A.P., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Miller T.V., Poveshchneko A.F., Surovtseva M.A., Bgatova N.P., Konenkov V.I. Prospect of using cell product for the therapy of skin defects in diabetes mellitus. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017; 164: 266–268.

3. Taguchi T., Borjesson D.L., Osmond C., Grifon D.J. Influence of donor's age on immunomodulatory properties of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2019; 28 (23): 1562–1571. doi: 10.1089/scd.2019.0118

4. Hu R., Cheng Y., Jing H., Wu H. Erythropoietin promotes the protective properties of transplanted endothelial progenitor cells against acute lung injury via PI3K/Akt pathway. *Shock*. 2014; 42 (4): 327–336. doi: 10.1097/SHK.0000000000000216

5. Korolenko T.A., Goncharova N.V., Karmatskikh O.L., Johnston T.P., Machova E., Nescakova Z., Bgatova N.P., Lykov A.P., Shintyapina A.B., Maiborodin I.V. Hypolipidemic effect of mannans from *C. albicans* serotype A and B in acute hyperlipidemia in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 107: 2385–2394. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.111

6. Красина М.Е., Кошелева Н.В., Липина Т.В., Карганов М.Ю., Медведева М.А., Лебедева В.А., Зурина И.М., Сабурова И.Н. Восстановительный потенциал суспензии и сфероидов мультипотентных мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека на модели инфаркта миокарда крыс. *Клеточ. технол. в биол. и мед.* 2020; 2: 89–97.

Krasina M.E., Kosheleva N.V., Lipina T.V., Karganov M.Yu., Medvedeva M.A., Lebedeva V.A., Zurina I.M., Saburina I.N. Regenerative potential of a suspension and spheroids of multipotent mesenchymal stromal cells from the human umbilical cord on myocardial infarction model in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020; 169: 549–557.

7. Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Дружинина Ю.В., Коненков В.И. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки для терапии дисфункции лимбального эпителия. *Бюл. СО РАМН*. 2014; 34 (3): 48–55.

Poveshchenko O.V., Poveshchenko A.F., Lykov A.P., Bondarenko N.A., Druzhinina Yu.V., Konenkov V.I. Multipotent mesenchymal stromal cells for therapy of the limbal epithelium dysfunction. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2014; 34 (3): 48–55. [In Russian].

8. Jurgens W.J., Oedayrajsingh-Varma M.L., Helper M.N., Zandiehoulabi B., Schouten T.E., Kuik D.J., Ritt M.J., van Milligen F.J. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 2008; 332 (3): 415–426. doi: 10.1007/s00441-007-0555-7

9. Zhang B., Wang F., Deng L., Dun A., Dong L., Li J., Yang H. [Isolating and culturing rat marrow mesenchymal stem cells and studying their phenotypical

and functional properties]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003; 34 (4): 738–741. [In Chinese].

10. Chen Y., Hu Y., Yang L., Zhou J., Tang Y.Y., Zheng L.L. Effects of different concentrations of glucose on the osteogenic differentiation of orofacial bone mesenchymal stem cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2016; 47 (5): 679–684. [In Chinese].

11. Zhou S., Liu Y.G., Zhang Y., Hu J.M., Liu D., Chen H., Li M., Guo Y., Fan L.P., Li L.Y., Zhao M. Bone mesenchymal stem cells pretreated with erythropoietin enhance the effect to ameliorate cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *J. Cell Biochem*. 2018; 119 (10): 8220–8232. doi: 10.1002/jcb.26833

Сведения об авторах:

Александр Петрович Лыков, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru

Майкл Хевор, e-mail: m.khevor@g.nsu.ru

Мария Александровна Суровцева, к.м.н., ORCID: 0000-0002-4752-988X, e-mail: mfelde@ngs.ru

Наталья Анатольевна Бондаренко, к.б.н., ORCID: 0000-0002-8443-656X, e-mail: bond80288@yandex.ru

Ирина Иннокентьевна Ким, к.м.н., ORCID: 0000-0002-7380-2763, e-mail: kii5@yandex.ru

Ольга Владимировна Повещенко, д.м.н., ORCID: 0000-0001-9956-0056, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Information about the authors:

Alexander P. Lykov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru

Michael Khevor, e-mail: m.khevor@g.nsu.ru

Maria A. Surovtseva, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-4752-988X, e-mail: mfelde@ngs.ru

Nataliya A. Bondarenko, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-8443-656X,
e-mail: bond80288@yandex.ru

Irina I. Kim, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-7380-2763, e-mail: kii5@yandex.ru

Olga V. Poveshchenko, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-9956-0056, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.07.2021

После доработки 10.07.2021

Принята к публикации 24.08.2021

Received 08.07.2021

Revision received 10.07.2021

Accepted 24.08.2021

Влияние медь-, цинксодержащего комплекса на основе пористой матрицы на пролиферацию, апоптоз, некроз фибробластов и продукцию ими оксида азота

А.П. Лыков, Л.Н. Рачковская, О.В. Повешенко, Э.Э. Рачковский, А.Ю. Летягин

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Резюме

Проведено сравнительное исследование влияния матрицы на основе пористого оксида алюминия и кремний-органического полимера полидиметилсилоксана (ПДМС) ($\text{Al}_2\text{O}_3@\text{ПДМС}$) и комплекса матрицы с сорбированными на ее поверхности медью и цинком ($\text{Cu}@\text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@\text{ПДМС}$) на функциональные свойства фибробластов. **Материал и методы.** В эксперименте *in vitro* с клеточной линией фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ-15) оценено влияние комплекса $\text{Cu}@\text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@\text{ПДМС}$ и матрицы на их пролиферативный потенциал (МТТ-тест), апоптоз, некроз и продукцию стойких метаболитов оксида азота *in vitro*. **Результаты.** Сопоставляемые образцы $\text{Cu}@\text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@\text{ПДМС}$ и $\text{Al}_2\text{O}_3@\text{ПДМС}$ близки по своим физико-химическим свойствам. Данные исследований функционального потенциала ФЭЧ-15 свидетельствуют о более высоком уровне пролиферации клеток и их способности продуцировать оксид азота при контакте с комплексом. Существенного увеличения апоптоза и некроза ФЭЧ-15 в присутствии образцов комплекса и носителя не выявлено. **Заключение.** Отсутствие значимого негативного влияния тестируемых образцов на функциональный статус клеток линии ФЭЧ-15 (пролиферация, апоптоз, некроз и секреция оксида азота) *in vitro* позволяет использовать комплекс $\text{Cu}@\text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@\text{ПДМС}$ для дальнейшего анализа его безопасности при экспериментальных моделях кожных дефектов у животных.

Ключевые слова: комплекс, медь, цинк, оксид алюминия, полидиметилсилоксан, пролиферация, фибробласты, безопасность, детоксикация.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Рачковская Л.Н., e-mail: noolit@niikel.ru

Для цитирования: Лыков А.П., Рачковская Л.Н., Повешенко О.В., Рачковский Э.Э., Летягин А.Ю. Влияние медь-, цинксодержащего комплекса на основе пористой матрицы на пролиферацию, апоптоз, некроз фибробластов и продукцию ими оксида азота. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 62–67. doi: 10.18699/SSMJ20210508

Effect of Cu-, Zn-containing complex based on a porous matrix on fibroblast proliferation, apoptosis, necrosis and nitric oxide production

A.P. Lykov, L.N. Rachkovskaya, O.V. Poveshchenko, E.E. Rachkovsky, A.Yu. Letyagin

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –
Branch of the Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

Abstract

A comparative study of the effect of a matrix based on porous aluminum oxide and a silicon organic polymer polydimethylsiloxane (PDMS) ($\text{Al}_2\text{O}_3@\text{PDMS}$) and a matrix complex with copper and zinc sorbed on its surface ($\text{Cu}@\text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@\text{PDMS}$) on the functional properties of fibroblasts has been carried out. **Material and methods.** The effect of the $\text{Cu}@\text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@\text{PDMS}$ complex and the matrix on the cell proliferative potential (MTT test), apoptosis, necrosis and the production of stable nitric oxide (NO) metabolites were studied in an *in vitro* experiment with a human embryo fibroblast cell line (HEF-15). **Results.** The compared samples of $\text{Cu}@\text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_3@\text{PDMS}$ and $\text{Al}_2\text{O}_3@\text{PDMS}$ are similar in

their physico-chemical properties. Study of HEF-15 functional potential indicates a higher level of cell proliferation and ability to produce NO after contact with the complex. There was no significant increase in apoptosis and necrosis of HEF-15 in the presence of samples of the complex and the carrier. **Conclusion.** The absence of a significant negative effect of the tested samples on the functional status of cells of the FEH-15 line (proliferation, apoptosis, necrosis, NO secretion) *in vitro* allows the use of the Cu@Zn-Al₂O₃@PDMS complex for further analysis of its safety in experimental models of skin defects in animals.

Key words: complex, copper, zinc, aluminum oxide, polydimethylsiloxane, proliferation, fibroblasts, safety, detoxification.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Rachkovskaya L.N., e-mail: noolit@niikel.ru

Citation: Lykov A.P., Rachkovskaya L.N., Poveschenko O.V., Rachkovsky E.E., Letyagin A.Yu. Effect of Cu-, Zn-containing complex based on a porous matrix on fibroblast proliferation, apoptosis, necrosis and nitric oxide production. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 62–67. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210508

Введение

На фоне коронавирусной пандемии, охватившей почти все страны, становится ясно, что поиск новых, альтернативных антибиотикам, антибактериальных препаратов в настоящее время актуален. Многочисленными исследованиями показана эффективность препаратов серебра [1]. Мутации патогенов чрезвычайно быстры и разнообразны, это подтверждает необходимость разработки новых подходов в борьбе с инфекцией и ее последствиями, когда необходимо быстрое восстановление гомеостаза организма. С этой точки зрения представляет интерес использование биоцидного воздействия ионов меди и цинка в составе активных композиций [2–4]. Основой композиций могут выступать носители, характеризующиеся развитой системой пор, высокой удельной поверхностью и гидрофильно-гидрофобной химической природой поверхности [5]. Фундаментальные исследования подтвердили целесообразность использования модифицированных активными веществами сорбентов-носителей для целей детоксикации и доставки активных веществ в зону терапевтического действия [6]. Следует отметить, что одновременно с доставкой активных ингредиентов по назначению такие носители проявляют и свойства детоксикантов, сорбируя на своей поверхности при контакте с биотканями токсические агенты разной природы и выводя их естественным путем из организма. При этом используемые сорбенты-носители и композиции на их основе должны быть не токсичны и безопасны для организма. Целью данного исследования явилось изучение безопасности новой композиции медь-, цинксодержащего комплекса на основе пористого оксида алюминия и полидиметилсилоксана.

Материал и методы

В исследовании применяли медь-, цинксодержащий комплекс на основе γ -Al₂O₃ и полимера полидиметилсилоксана (Cu@Zn-Al₂O₃@ПДМС). Для этого использовали механически прочный пористый γ -Al₂O₃ с размером частиц 0,1 мкм, объемом пор 0,23 см³/г и преобладающим размером пор 10–100 нм («Катализатор», Россия) и кремнийорганический полимер ПДМС (CH₃)₃Si-O-(Si(CH₃)₂-O)_n-Si(CH₃)₂-O-Si(CH₃)₃ (молекулярная масса 18000–19000) («Пента», Россия). В качестве источников ионов меди и цинка использовали соответственно CuSO₄ («Химреактив», Россия) и ZnO («Химпоставка», Россия). Комплекс Cu@Zn-Al₂O₃@ПДМС получен иммобилизацией путем физической адсорбции соответствующих компонентов меди и цинка и ПДМС из водной эмульсии на поверхности γ -Al₂O₃. После короткой низкотемпературной обработки (не выше 200 °С) – это сыпучий порошок светло-голубого цвета. Исследовали также носитель без цинка и меди – Al₂O₃@ПДМС. Удельную поверхность образцов определяли методом БЭТ, а размер и объем пор – по изотермам сорбции азота [7]. Сорбционную активность комплекса по сорбции метиленового синего ($\lambda = 664$ нм) определяли на спектрофотометре PD-303UV (Arel, Япония).

ФЭЧ-15 (штамм диплоидных клеток из кожно-мышечной ткани 10-недельного плода, ФГУН «Вектор» (Россия)) вели на среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, США) и 80 мкг/мл гентамицина сульфата («Дальхимфарм», Россия) до получения 80–90 % конфлюэнтного монослоя, среду меняли каждые 3–4 дня, пересев клеток осуществляли снятием монослоя клеток раствором трипсин/ЭДТА (1:1; «Биолот»).

Таблица. Физико-химические свойства образцов с размером частиц 0,1 мм**Table.** Physical and chemical properties of samples with a particle size of 0,1 mm

Сорбент	CuSO ₄ , %	ZnO, %	S, удельная поверхность, м ² /г	V, объем пор, см ³ /г	Адсорбция метиленового голубого, мг/г
Cu@Zn-Al ₂ O ₃ @ПДМС	0,2	0,8	151,8	0,23	5,7
Al ₂ O ₃ @ПДМС	—	—	153,0	0,23	5,5

Для постановки МТТ-теста вносили по 80 000 клеток на лунку в 1 мл питательной среды в 24-луночные планшеты (TPP, Швейцария), в опытные лунки добавляли тестируемые образцы и инкубировали в течение 72 часов при 37 °С и 5 % CO₂. За 4 часа до окончания опыта планшеты центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 5 минут (Eppendorf, Германия), из лунок удаляли надосадочную жидкость и вносили по 100 мкл среды DMEM и по 10 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ, Merck, США), инкубировали 4 часа при 37 °С и 5 % CO₂. Далее вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (Merck) для разрушения клеточной мембраны, оптическую плотность продукта реакции в лунке оценивали при длине волны $\lambda = 492$ нм на

планшетном фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Продукцию клетками ФЭЧ-15 оксида азота определяли по содержанию в кондиционных средах нитритов, его стойких метаболитов, с использованием реактива Грисса на спектрофотометре Stat Fax 2100 ($\lambda = 492$ нм) [7], строили калибровочную кривую с использованием 1 мМ нитрита натрия, выражали в мкмоль/мл. Для оценки апоптоза и некроза клетки ФЭЧ-15 окрашивали витальными красителями акридиновым оранжевым и этидия бромидом (1:1, 10 мкл/лунку), делали микрофотографии на инвертированном микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

Нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро – Уилка. Данные представлены в виде

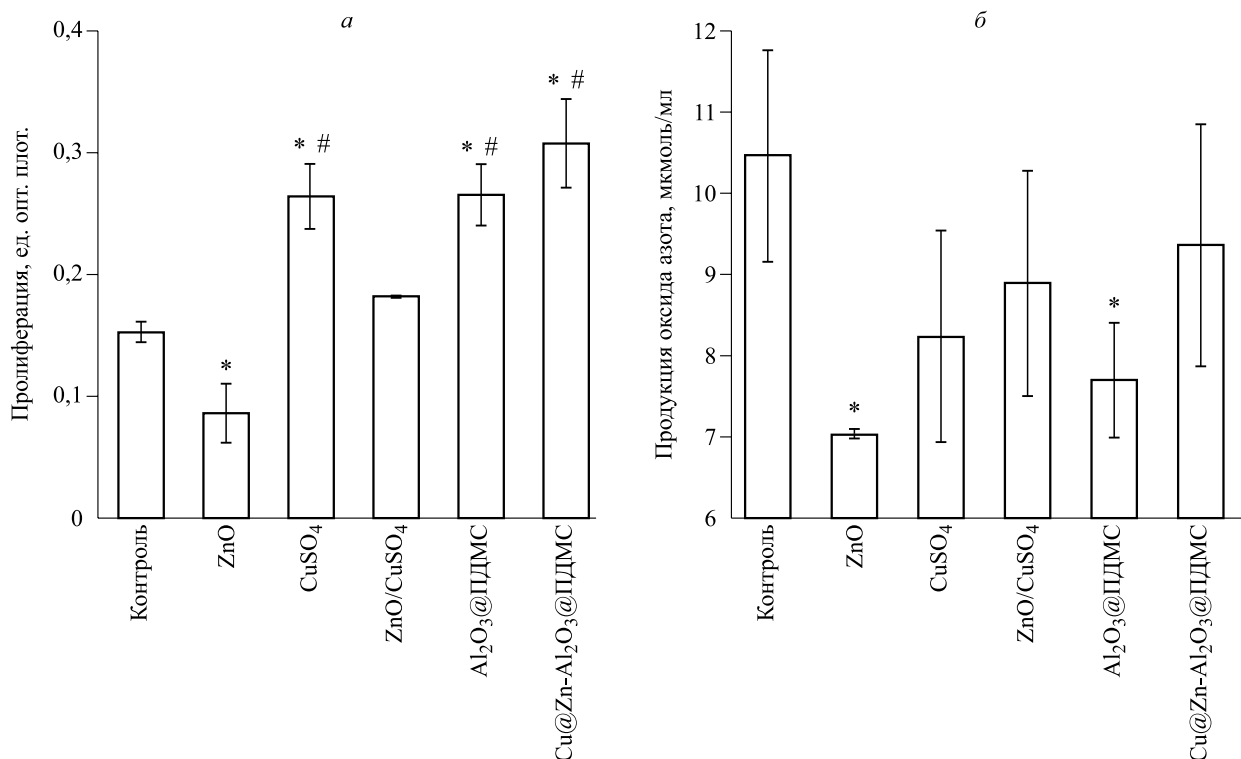


Рис. 1. Пролиферативный потенциал клеток ФЭЧ-15 (а) и продукция ими стойких метаболитов оксида азота (б) в присутствии свободных и связанных ионов цинка и меди; обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей контроля (*) и группы ZnO/CuSO₄ (#)

Fig. 1. Proliferative potential of HEF-15 cells (a) and production of persistent nitric oxide metabolites (б) in the presence of free and bound zinc and copper ions; $p < 0.05$ compared to control (*) and to ZnO/CuSO₄ (#)

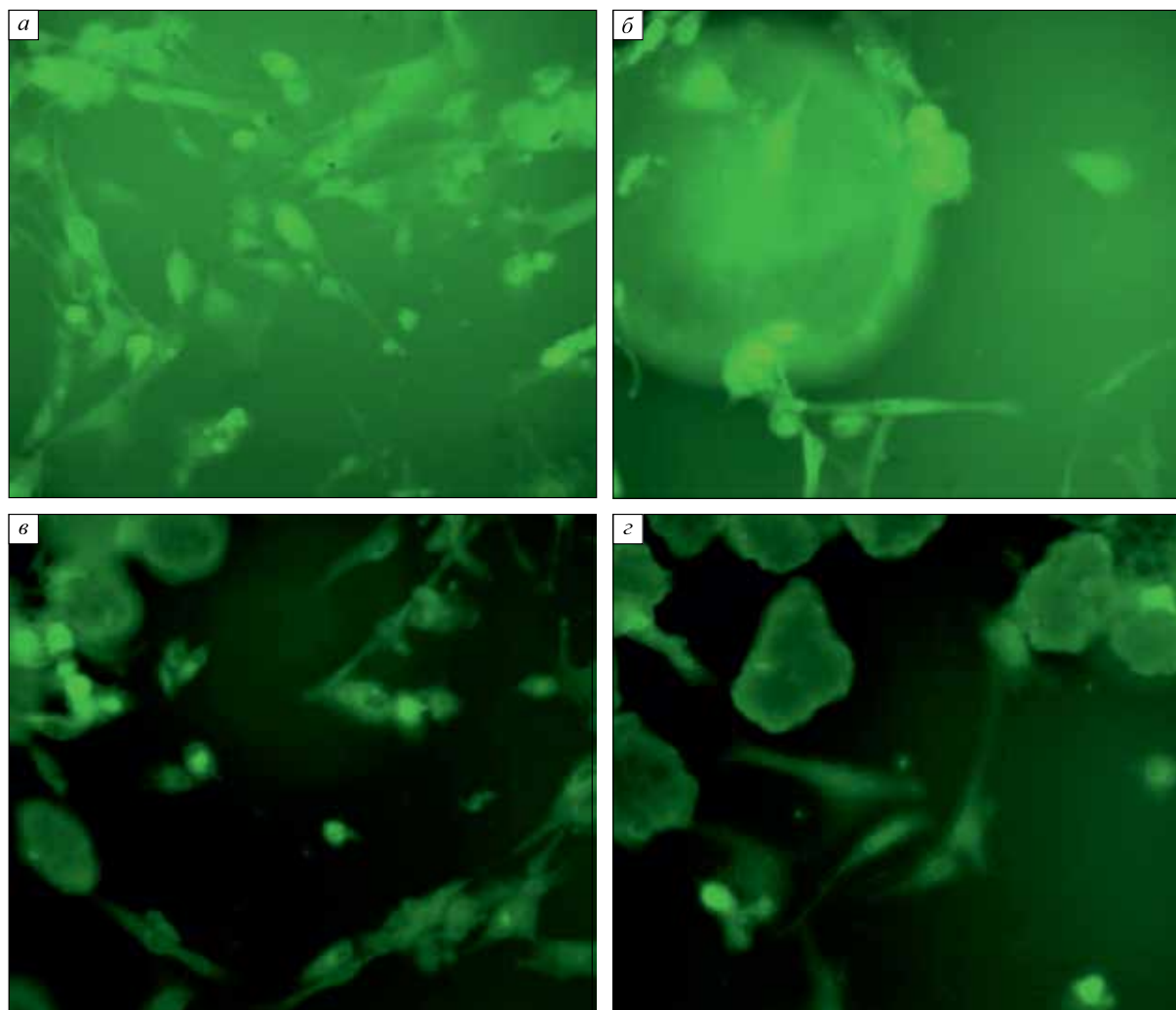


Рис. 2. Выраженность апоптоза и некроза клеток ФЭЧ-15 (микрофотографии, $\times 20$) в контроле (а), в присутствии $Al_2O_3@PDMS$ (б), $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$ (в) и смеси сульфата меди и оксида цинка (з)

Fig. 2. Apoptosis and necrosis of HEF-15 cells (micrographs, $\times 20$) in control (a), in the presence of $Al_2O_3@PDMS$ (б), $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$ (в) and copper sulfate and zinc oxide mixture (z)

среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$), статистическую значимость различий между образцами оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с использованием поправки Бонферрони и принимали при $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из таблицы, величины удельной поверхности и объема пор исследованных сорбентов с добавками и без добавок компонентов меди и цинка практически идентичны, что свидетельствует о равномерности их распределения в пористой структуре носителя.

Установлено, что комплекс $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$, носитель без ионов цинка и меди $Al_2O_3@PDMS$, свободные ионы меди ($CuSO_4$) значимо

увеличивают пролиферативный потенциал клеток ФЭЧ-15 (рис. 1, а); наличие свободных ионов цинка (ZnO) в питательной среде угнетает пролиферацию клеток (см. рис. 1, а); носитель без ионов цинка и меди $Al_2O_3@PDMS$ и наличие свободных ионов цинка (ZnO) в питательной среде снижают продукцию фибробластами стойких метаболитов оксида азота (рис. 1, б).

Существенного увеличения апоптоза и некроза клеток ФЭЧ-15 в присутствии связанного с матрицей носителя, ионов цинка и меди не выявлено (рис. 2). Отмечены изменения морфологии (обилие округлых клеток, грануляция цитоплазмы), указывающие на ухудшение условий для распластывания клеток на поверхности пластика в присутствии как свободных, так и связанных ионов цинка и меди, а также носителя без ионов цинка и меди $Al_2O_3@PDMS$ (рис. 3).

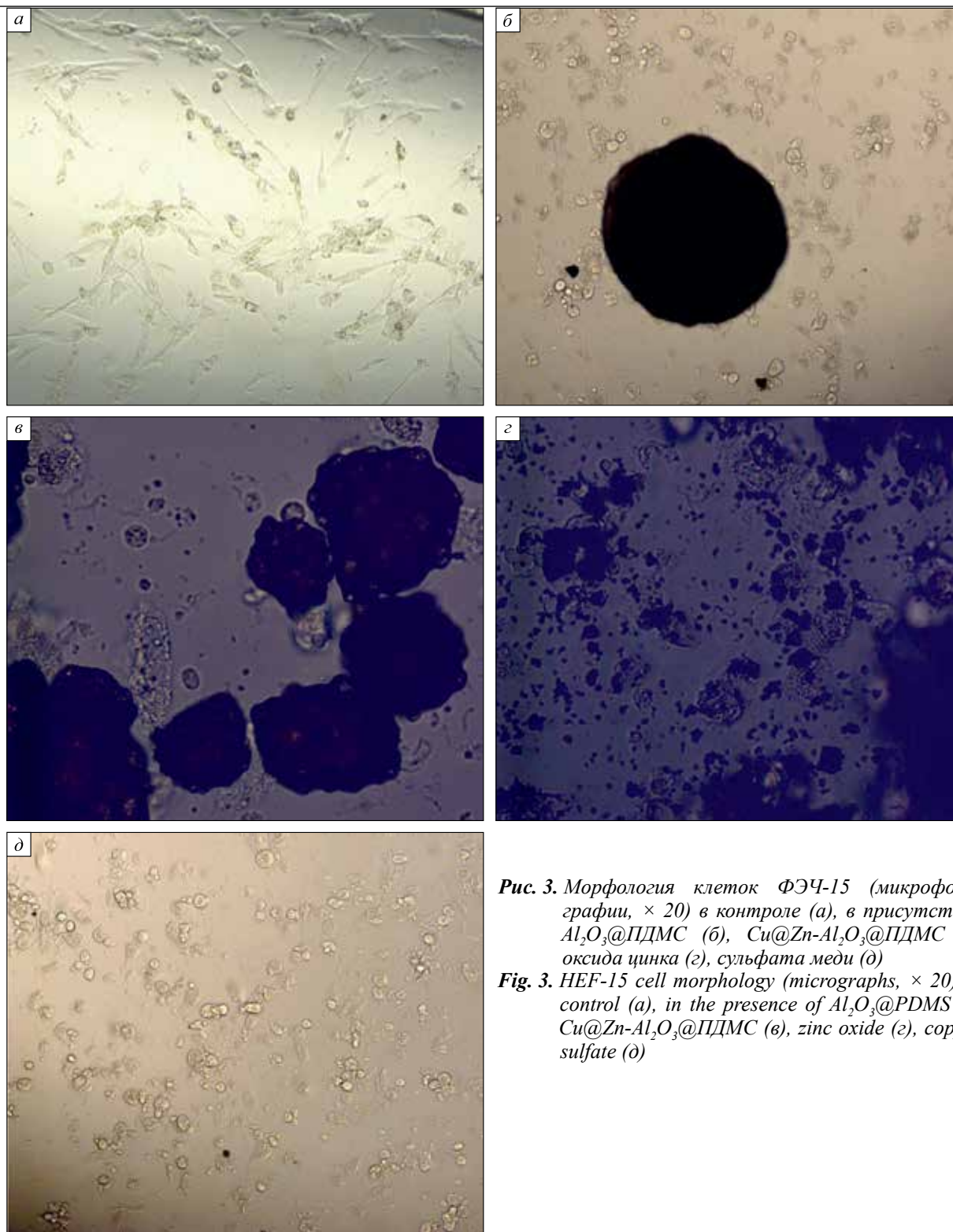


Рис. 3. Морфология клеток ФЭЧ-15 (микрофотографии, $\times 20$) в контроле (а), в присутствии $Al_2O_3@PDMS$ (б), $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$ (в), оксида цинка (г), сульфата меди (д)

Fig. 3. HEF-15 cell morphology (micrographs, $\times 20$) in control (a), in the presence of $Al_2O_3@PDMS$ (б), $Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$ (в), zinc oxide (г), copper sulfate (д)

Заключение

Исследование биологических свойств нового цинк-, медьсодержащего комплекса на основе γ -оксида алюминия и полимера полидиметилсилоксана ($Cu@Zn-Al_2O_3@PDMS$) показало, что комплекс не токсичен: он значительно увеличивает пролиферацию фибробластов эмбриона человека

(линия ФЭЧ-15), не влияя на выраженность апоптоза и некроза, а также продукцию стойких метаболитов оксида азота.

Список литературы / References

1. Бурмистров В.А., Рачковская Л.Н., Попова Т.В., Котлярова А.А., Королев М.А.,

Летягин А.Ю. Перспективы применения препаратов коллоидного серебра для активной санации организма от патогенных микробов. *Вестн. КРСУ*. 2018; 18 (9): 23–26.

Burmistrov V.A., Rachkovskaya L.N., Popova T.V., Kotlyarova A.A., Korolev M.A., Letyagin A.Yu. Prospects for the use of colloidal silver preparations for active sanitation of the body from pathogenic microbes. *Vestnik Kirgissko-Rossiyskogo slavyanskogo universiteta=Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University*. 2018; 18 (9): 23–26. [In Russian].

2. Гарасько Е.В., Шиляев Р.Р., Алексеева О.В., Чуловская С.А., Багровская Н.А., Парфенюк В.И. Антибактериальные свойства полимерных композитов с наноразмерными частицами меди. *Вестн. Иван. мед. акад.* 2009; 14 (2): 21–25.

Garasko E.V., Shilyaev R.R., Alekseeva O.V., Chulovskaya S.A., Bagrovskaya N.A., Parfenyuk V.I. Antibacterial properties of polymer composites with nanoscale copper particles. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii = Bulletin of the Ivanovo Medical Academy*. 2009; 14 (2): 21–25. [In Russian].

3. Хлебникова А.Н., Петрунин Д.Д. Цинк, его биологическая роль и применение в дерматологии. *Вестн. дерматол. и венерол.* 2013; (6): 100–116.

Khlebnikova A.N., Petrunin D.D. Zinc, its biological role and application in dermatology. *Vestnik dermatologii i venerologii = Dermatology and Venereology Bulletin*. 2013; (6): 100–116. [In Russian].

4. Djoko K.Y., Ong C.L., Walker M.J., McEwan A.G. The role of copper and zinc toxicity in innate immune

defense against bacterial pathogens. *J. Biol. Chem.* 2015; 290 (31): 18954–18961. doi: 10.1074/jbc.R115.647099

5. Madonov P.G., Rachkovskaya L.N., Michurina S.V., Robinson M.V., Rachkovsky E.E., Ishchenko I.Yu., Lykov A.P., Shurlygina A.V., Poveshchenko O.V., Popova T.V. Aluminum and silica containing porous carrier for active pharmaceutical ingredients. *2019 International MultiConference on Engineering Computer and Information Sciences (SIBIRCON)*: proc. conf., Novosibirsk, 21–27 october 2019. Novosibirsk: 2019. P. 301–304.

6. Бородин Ю.И., Коненков В.И., Пармон В.Н., Любарский М.С., Рачковская Л.Н., Бгатова Н.П., Летягин А.Ю. Биологические свойства сорбентов и перспективы их применения. *Успехи соврем. биол.* 2014; 134 (3): 236–248.

Borodin Yu.I., Konenkov V.I., Parmon V.N., Lyubarsky M.S., Rachkovskaya L.N., Bgatova N.P., Letyagin A.Yu. Biological properties of sorbents and prospects of their application. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*. 2014; 134 (3): 236–248. [In Russian].

7. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М.: Мир, 1984. 310 с.

Greg S., Sing K. Adsorption, specific surface area, porosity. Moscow: Mir, 1984. 310 p. [In Russian].

8. Korolenko T.A., Goncharova N.V., Karmatskiy O.L., Johnston T.P., Machova E., Nescakova Z., Bgatova N.P., Lykov A.P., Shintyapina A.B., Maiborodin I.V. Hypolipidemic effect of mannans from *C. albicans* serotype A and B in acute hyperlipidemia in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 107 (Pt B): 2385–2394. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.111

Сведения об авторах:

Александр Петрович Лыков, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru

Любовь Никифоровна Рачковская, к.х.н., ORCID: 0000-0001-9622-5391, e-mail: noolit@niikel.ru

Ольга Владимировна Повешенко, д.м.н., ORCID: 0000-0001-9956-0056, e-mail: poveshenkoov@yandex.ru

Эдмунд Эдмундович Рачковский, к.х.н., ORCID: 0000-0003-3756-4873, e-mail: reed@academ.org

Андрей Юрьевич Летягин, д.м.н., ORCID: 0000-0002-9293-4083, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Information about the authors:

Alexander P. Lykov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru

Lubov N. Rachkovskaya, candidate of chemical sciences, ORCID: 0000-0001-9622-5391, e-mail: noolit@niikel.ru

Olga V. Poveshchenko, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-9956-0056, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

Edmund E. Rachkovsky, candidate of chemical sciences, ORCID: 0000-0003-3756-4873, e-mail: reed@academ.org

Andrey Yu. Letyagin, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9293-4083, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.07.2021

После доработки 26.07.2021

Принята к публикации 01.09.2021

Received 08.07.2021

Revision received 26.07.2021

Accepted 01.09.2021

Влияние экзогенной микрофлоры гепатобилиарной системы на биохимический состав желчи и процессы перекисного окисления липидов мембран соматических клеток при хроническом описторхозе

Н.М. Федоров¹, А.Г. Рыбка², П.Б. Зотов¹

¹ Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России
625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 54

² Тюменский государственный университет
625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6

Резюме

Эпидемиологически установлено, что в Обь-Иртышском бассейне, гиперэндемичном по распространению гельминта *Opisthorchis felineus*, значительно возрастает частота первичных холангиокарцином по сравнению с другими регионами, где население не инвазировано. В связи с этим хронический описторхоз рассматривают как факультативный предрак печени. Изучение механизмов холангиоканцерогенеза позволит разработать патогенетические подходы к его профилактике. Целью работы является изучение значения микрофлоры гепатобилиарного тракта больных хроническим описторхозом в изменении биохимического состава желчи и исследование ее биологического воздействия на мембрану соматических клеток. **Материал и методы.** Объекты исследования: бактерии; инбредные мыши, инвазированные описторхами; образцы желчи, культуры фибробластов эмбриона человека и спленоцитов инбредных мышей *in vitro*; плазма крови; стандартные первичные и вторичные желчные кислоты. Изучали: виды бактерий, колонизирующих желчные протоки; количественный и качественный состав желчных кислот, а также уровень диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в образцах протоковой желчи; биологическое действие желчи на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран *in vitro*; влияние желчи и продуктов ПОЛ на проницаемость цитомембран; активность антиоксидантных систем организма. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что желчь больных хроническим описторхозом в большинстве случаев (77,0 %) инфицирована различными видами бактерий. В 30,0 % случаев определенные виды кишечных бактерий (*Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Bacteroides alcaligues faecalis*, *Clostridium*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*) изменяют биохимический состав протоковой желчи – обнаруживаются деконъюгированные первичные и вторичные желчные кислоты, а также высокий уровень общего количества желчных кислот. Желчь указанного биохимического состава на фоне истощения антиоксидантной системы организма индуцирует активацию процессов ПОЛ цитомембран и значительно повышает их проницаемость для токсичных компонентов желчи. Указанные процессы являются промоторными в холангиоканцерогенезе.

Ключевые слова: описторхоз, холангиоциты, микрофлора, желчные кислоты, перекисное окисление липидов, проницаемость мембран, холангиоканцерогенез.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Рыбка А.Г., e-mail: a.g.rybka@utmn.ru

Для цитирования: Федоров Н.М., Рыбка А.Г., Зотов П.Б. Влияние экзогенной микрофлоры гепатобилиарной системы на биохимический состав желчи и процессы перекисного окисления липидов мембран соматических клеток при хроническом описторхозе. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 68–74. doi: 10.18699/SSMJ20210509

Effect of exogenous microflora of the hepatobiliary system on the biochemical composition of bile and lipid peroxidation processes of somatic cell membranes in chronic opisthorchiasis

N.M. Fedorov¹, A.G. Rybka², P.B. Zotov¹

¹ Tyumen State Medical University of Minzdrav of Russia
625023, Tyumen, Odesskaya str., 54

² Tyumen State University
625003, Tyumen, Volodarsky str., 6

Abstract

It has been epidemiologically established that the rate of primary cholangiocarcinomas increases greatly in the Ob-Irtysh basin which is hyperendemic for helminth *Opisthorchis felinus* in comparison with other regions where the population is not infested. In this connection chronic opisthorchiasis is considered as facultative liver precancer. The study of cholangiocarcinogenesis mechanisms will allow developing pathogenetic approaches to prevention of this tumor. Aim of the study was to investigate the significance of microbiota of the hepatobiliary tract of chronic opisthorchiasis patients in changing of biochemical composition of bile and investigation of its biological influence on somatic cells membrane. **Material and methods.** Objects of research: bacteria; inbred mice infected by opisthorchis; samples of bile, cultures of human embryo fibroblasts and splenocytes of inbred mice *in vitro*; blood plasma; standard primary and secondary bile acids. We studied: species of bacteria colonizing bile ducts; quantitative and qualitative composition of bile acids, and level of diene conjugates and malondialdehyde in duct bile samples; biological activity of bile on processes of lipid peroxidation of cell membranes *in vitro*; influence of bile and lipid peroxidation products on cytomembrane permeability; activity of antioxidant systems of the body. **Results and discussion.** It was found out, that bile of patients with chronic opisthorchiasis in majority of cases (77.0 %) was infected by different species of bacteria. In 30.0 % of cases certain types of intestinal bacteria (*Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Bacteroides alcaligues faecalis*, *Clostridium*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*) change biochemical composition of duct bile - deconjugated primary and secondary bile acids and also high level of total bile acids are detected. Bile of the above biochemical composition, against the background of depletion of antioxidant system, induces activation of cell membrane lipid peroxidation processes and significantly increases their permeability to toxic components of bile. These processes are promotor in cholangiocarcinogenesis.

Key words: opisthorchiasis, cholangiocytes, microflora, bile acids, lipid peroxidation, membrane permeability, cholangiocarcinogenesis.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Rybka A.G., e-mail: a.g.rybka@utmn.ru

Citation: Fedorov N.M., Rybka A.G., Zotov P.B. Effect of exogenous microflora of the hepatobiliary system on the biochemical composition of bile and lipid peroxidation processes of somatic cell membranes in chronic opisthorchiasis. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 68–74. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210509

Введение

На основании эпидемиологических исследований показано, что в местах наибольшего распространения описторхоза заболеваемость первичным раком печени значительно выше [1]. На территориях, совпадающих с высоким уровнем пораженности населения гельминтом *Opisthorchis felinus*, паразитирующим во внутрипеченочных желчных протоках, в большинстве случаев выявляется одна из разновидностей первичного рака печени – холангиокарцинома. К числу таких регионов относится Обь-Иртышский бассейн, который является самым крупным в мире [2, 3]. Описторхоз широко распространен во многих других регионах России: Томская, Новосибирская, Курганская, Брянская, Архангельская, Московская, Владимирская, Пермская, Свердловская, Челябинская область и др., а также в странах ближнего и дальнего зарубежья. Кроме того, выявлено увеличение заболеваемости раком печени параллельно возрастанию частоты опи-

торхозной инвазии у населения, в связи с чем хронический описторхоз (ХО) рассматривается как факультативный предрак печени [1].

В последнее десятилетие многие авторы уверены в том, что ХО опосредует развитие злокачественного процесса в гепатобилиарной системе [4–13], однако конкретные факторы инициации и промоции последнего не указываются. Установлено, что непосредственное отношение к патогенезу злокачественных опухолей имеет нарушение структурно-функционального состояния мембран соматических клеток, опосредующего дестабилизацию их барьерных функций [14–16]. Одним из основных механизмов нарушения барьерной функции цитомембран является перекисное окисление липидов (ПОЛ) [16, 17]. Важную роль в развитии патологических процессов играет недостаточность факторов антиоксидантной защиты организма, т.е. дисбаланс в системе «ПОЛ – антиоксиданты» [16]. В качестве маркеров активации процессов ПОЛ цитомембран ис-

пользуются диеновые конъюгаты (ДК) и малоновый диальдегид (МДА).

Показано значительное усиление процессов ПОЛ в печени животных при моделировании описторхозной инвазии на хомяках, что приводит к деструкции и пролиферации гепатоцитов [18]; у больных описторхозом отмечаются активация процессов ПОЛ клеточных мембран эритроцитов и снижение содержания антиоксидантов в сыворотке крови [19]. Необходимо отметить, что гепатоциты и эритроциты не соприкасаются со средой обитания трематоды *O. felineus*. Следовательно, по данным работам о роли продуктов ПОЛ биологических мембран в патогенезе именно холангиоцеллюлярного рака печени можно судить относительно. Хотя многие исследователи придерживаются мнения о системном характере мембранных нарушений.

В связи с тем что изучить процессы ПОЛ мембран непосредственно холангиоцитов не представляется возможным, целесообразным является исследование уровня продуктов ПОЛ мембран в образцах протоковой желчи больных ХО в зависимости от ее биохимического состава или в супернатантах культур соматических клеток после воздействия желчи больных ХО. Это обуславливает актуальность исследования.

По содержанию основных ингредиентов желчи можно судить о физиологическом состоянии желчевыводящих путей и о патологических процессах гепатобилиарной системы. Определение биохимического состава желчи может служить ценным диагностическим тестом при различных заболеваниях печени. Кроме того, изучению влияния экзогенной микрофлоры гепатобилиарной системы на биохимический состав желчи при ХО не было уделено должного внимания. В связи с этим исследование биохимических показателей желчи организмов, длительно инвазированных трематодой *O. felineus*, представляет значимый практический интерес для выяснения роли состава желчи в трансформации холангиоцитов.

Целью настоящего исследования является определение значения микрофлоры, сопутствующей описторхозной инвазии, в изменении биохимического состава протоковой желчи и исследование ее биологического воздействия на мембрану соматических клеток.

Материал и методы

Бактериологические исследования по определению микробиоты в желчи больных ХО и групп сравнения выполнены на базе микробиологической лаборатории Роспотребнадзора Тюменской области с использованием стандартных методов. Качественный состав желчных кислот

(ЖК) в желчи определяли с помощью метода тонкослойной хроматографии (на пластинах «Silufol-154», Чехия). Общее количество желчных кислот исследовали методом спектрофотометрии ($\lambda = 347$ нм). Концентрацию ДК и МДА определяли спектрофотометрически соответственно в хлороформном экстракте ($\lambda = 232$ нм) и по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой ($\lambda = 532$ нм).

Изучение биологического действия желчи на процессы ПОЛ клеточных мембран выполняли на культуре фибробластов. К 2 мл клеточной суспензии ($7,5 \times 10^5$ /мл) добавляли по 0,2 мл исследуемой желчи в разведении 1/10000, контролем служила проба с 0,2 мл физиологического раствора. Через 48–72 ч в супернатантах экспериментальных культур определяли содержание МДА. Биологическое действие стандартных ЖК (холевой и дезоксихолевой (ДХ)) на процессы ПОЛ мембран соматических клеток исследовали на первичной культуре спленоцитов нелинейных мышей. ЖК растворяли в 5%-м растворе ДМСО (на 0,9%-м растворе NaCl) в дозе 50, 100, 200 мг в 0,1 мл на 1 мл клеток (2×10^6). Контролем служили пробы с добавлением 0,9%-го раствора NaCl и 5%-го раствора ДМСО (на 0,9%-м растворе NaCl). Уровень церулоплазмينا определяли спектрофотометрически по окислению *para*-фенилендиамина ($\lambda = 530$ нм).

Активность монооксигеназной системы печени исследовали по длительности барбитуратового сна на инбредных мышцах CBA/Lac и DBA/2 (Y) с хронической инвазией (4–8 мес.) трематодой *O. felineus*. Животных инвазировали с использованием глазной пипетки метацеркариями, выделенными из рыбы стандартным способом, по 40 шт. в 0,9%-м растворе NaCl. Инвазию животных констатировали по наличию взрослых гельминтов в гепатобилиарном тракте.

Проницаемость клеточных мембран изучали на культуре фибробластов эмбриона человека и спленоцитов инбредных мышей *in vitro* по накоплению Н³-тимидина в цитоплазме клеток с последующей радиометрией в жидком сцинтиляторе (имп./мин.).

Результаты и их обсуждение

Исследования, выполненные *in vivo* и *in vitro*, показали, что билиарные штаммы кишечных бактерий *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Bacteroides alcaligues faecalis*, *Clostridium*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* участвуют в метаболизме ЖК в гепатобилиарной системе – деконъюгации первичных (таурохолевой, гликохолевой, гликодезоксихолевой, гликохенодезоксихолевой кислот) и образовании

вторичных (литохоловой, ДХ) в 30,0 % случаев. Этот процесс в норме осуществляется в кишечнике. Также установлено значительное достоверное возрастание уровня общего количества ЖК (на 67,2 %; $p < 0,001$) по сравнению с контролем. Наличие бактерий в желчи больных с различной патологией печени отмечает и ряд других исследователей [20, 21]. М.И. Hill в экспериментах *in vitro* показал, что многие штаммы *Bacteroides* spp., *Streptococcus*, *Baccalis*, *Clostridium* spp. и др. обладают свойствами удалять 7 α -оксигруппу у некоторых солей первичных желчных солей (холовой и ХДХ), образуя вторичные [22]. Таким образом, инфицирование гепатобилиарной системы при ХО кишечной микрофлорой обуславливает метаболизм ЖК до мутагенных и канцерогенных веществ – деконъюгированных первичных и вторичных желчных кислот.

Кроме того, нами выявлены и другие значимые закономерности. При наличии в образцах желчи вторичных ЖК (литохоловой, ДХ) общее количество ЖК на 137,2 % ($p < 0,01$) превышает их уровень в образцах желчи, где вторичные ЖК не обнаружены. Необходимо также отметить, что желчестаз, индуцированный длительной жизнедеятельностью описторхов в протоках, обуславливает высокую концентрацию ЖК в протоковой желчи, в том числе вторичных, и длительность их контакта с холангиоцитами, обеспечивая механизм действия «доза – эффект».

В первую очередь биологическое действие желчи на соматическую клетку начинается с ее мембраны. Функционально-структурное состояния мембран соматических клеток характеризуют процессы перекисного окисления входящих в их состав липидов. В образцах протоковой желчи больных ХО было выявлено увеличение содержания МДА (на 102,6 %, $p < 0,001$), вероятно, за счет высокой скорости метаболизма первичных продуктов ПОЛ клеточных мембран (ДК) во вторичные (МДА); соответственно этому уровень ДК существенно снижен (на 52,6 %, $p < 0,01$). Также нами установлено, что при высокой концентрации общего количества ЖК в образцах желчи содержание ДК и МДА превышает в 2 раза их уровень в желчи с низкой концентрацией ЖК.

Необходимо отметить, что метаболические показатели процессов ПОЛ цитомембран в секрете желчи отражают в первую очередь физико-химическое состояние мембран клеток, выстилающих желчные протоки. Приведенные выше результаты свидетельствуют об активации свободнорадикального окисления мембранных липидов в клетках протокового эпителия. Чем выше концентрация общего количества ЖК в образцах желчи, тем интенсивнее протекают процессы

ПОЛ клеточных мембран. Липидная пероксидация детерминирует нарушение структуры и функции холангиоцеллюлярной ткани. В экспериментах *in vitro* нами показано, что пулированная желчь больных ХО стимулирует процессы ПОЛ в мембранах фибробластов: в супернатанте экспериментальных культур (48 ч) концентрация МДА повышается на 96,7 %.

В дополнение к вышеизложенному нами исследовано биологическое действие стандартных ЖК на процессы ПОЛ мембран в первичной культуре спленоцитов нелинейных мышей. Полученные данные показывают, что стандартная холовая кислота усиливает процессы ПОЛ мембран соматических клеток (в супернатанте культур определено увеличение содержания МДА и ДК в среднем на 200,0 %), при этом эффект прямо зависит от дозы. Аналогичные результаты получены и при исследовании стандартной ДХ кислоты: в супернатанте экспериментальных культур (48–72 ч) она увеличивает концентрацию ДК (на 30,0–150,0 %) и МДА (на 145,0–370,0 %), эффект зависит от дозы.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* на культурах соматических клеток выявлена зависимость уровня продуктов ПОЛ мембран от дозы стандартных желчных кислот как первичной (холовой) так и вторичной ЖК (ДХ), что подтверждает корреляцию, установленную в образцах желчи больных ХО в отношении концентрации общего количества ЖК и уровня продуктов ПОЛ клеточных мембран. Из этого следует, что высокая концентрация ЖК в желчи в большей степени активизирует процессы ПОЛ клеточных мембран, чем низкая. Накопление в секрете желчи продуктов ПОЛ запускает цепную реакцию постоянной активации процессов ПОЛ мембран холангиоцитов, опосредующих дестабилизацию их структурно-функциональной организации. Повышение уровня токсических продуктов ПОЛ приводит также к повреждению структуры и функции мембран митохондрий и дезорганизации их ферментных комплексов.

Активация процессов ПОЛ мембран клеток у больных ХО приводит антиоксидантную систему организма в состояние напряжения. Содержание в плазме крови медьсодержащего белка церулоплазмينا, выполняющего ключевые антиоксидантные функции [23], значительно увеличено (на 114 %, $p < 0,0001$), что можно рассматривать как компенсаторную реакцию. Но даже высокий уровень церулоплазмينا в плазме крови не нормализует окислительные процессы в печени, что свидетельствует об истощении компенсаторных возможностей разных звеньев антиоксидантных систем организма.

Это подтверждается и другими данными [22] – ингибированием системы монооксигеназ печени при ХО, состояние которой зависит от длительности инвазии и генотипа хозяина (экспериментальные данные, полученные на инбредных мышах линий СВА/Лас, DBA/2, Y). Хотя ферменты, обладающие антиоксидантным действием, наиболее активны в органах с высоким содержанием митохондрий, цитохрома P450 и пероксисом – в печени, надпочечниках, почках [24].

Накопление в протоковой желчи продуктов ПОЛ мембран соматических клеток в результате усиленной липидной перекисидации обуславливает мембранную патологию клеток протокового эпителия и сказывается на непрерывных процессах обмена веществ между клеткой и межклеточной средой для поддержания химического и ионного гомеостаза. В данном случае существенное значение имеет состояние проницаемости цитомембран. С этим связаны все процессы жизнедеятельности клетки: метаболизм, генерация, секреция, рецепция и др. Нарушение проницаемости клеточных мембран приводит к патологическим изменениям мембранного транспорта, а также клеток тканей. Это играет решающую роль в возникновении и развитии канцерогенного процесса [25].

На культуре фибробластов эмбриона человека и спленоцитов инбредных мышей *in vitro* установлено (по накоплению Н³-тимидина в цитоплазме), что желчь больных ХО повышает проницаемость клеточных мембран в среднем на 65,0 %. Степень проницаемости мембран зависит от дозы желчи. Увеличение проницаемости мембран обуславливает активный транспорт в клетки токсичных ингредиентов протоковой желчи, которые на клетки могут оказывать неблагоприятное воздействие – инактивировать репаративный синтез ДНК, индуцировать дефекты ДНК с развитием мутационных событий и др. Роль нарушения структуры и функций клеточных мембран, опосредованных активацией ПОЛ цитомембран, в развитии мутаций и злокачественной трансформации клеток отмечают многие авторы [9, 10, 15, 16].

Таким образом, полученные результаты исследования дают основание полагать, что изменение биохимического состава протоковой желчи больных ХО в неблагоприятную сторону (деконъюгация первичных ЖК, образование вторичных ЖК, ассоциированных с высокой концентрацией общего количества ЖК) под воздействием кишечной микрофлоры (сопутствующей инвазии трематоды *O. felineus*), истощение антиоксидантной системы организма опосредуют значительную активацию процессов ПОЛ мембран холангиоцитов с существенным повышением их проницаемости

для токсичных ингредиентов желчи. Эти процессы можно рассматривать как промоторный фактор в механизме холангиоканцерогенеза.

Список литературы / References

1. Шайн А.А., Шаназаров Н.А., Бабинов Б.Н., Федоров Н.М., Левина Е.С., Сабиров А.Х., Синяков А.Г., Шунько Е.Л., Кондратьев Н.П. Кафедра онкологии Тюменской ГМА. Сорок лет научно-исследовательской и педагогической работы. *Тюмен. мед. ж.* 2010; (2): 8–11.
2. Shain A.A., Shanazarov N.A., Babinov B.N., Fedorov N.M., Levina E.S., Sabirov A.K., Sinyakov A.G., Shunko E.L., Kondratyev N.P. Department of Oncology Tyumen State Medical Academy. Forty years of research and teaching. *Tyumenskiy meditsinskiy zhurnal = Tyumen Medical Journal*. 2010; (2): 8–11. [In Russian].
3. Байкова О.А., Николаева Н.Н., Грищенко Е.Г., Николаева Л.В. Трематодозы печени – описторхоз и клонорхоз: актуальность проблемы и принципы диагностики в современной клинической практике (обзор литературы). *Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН*. 2016; 1 (6): 182–190. doi: 10.12737/23825
4. Baikova O.A., Nikolaeva N.N., Grischenko E.G., Nikolaeva L.V. Trematodeases of the liver – opisthorchiasis and clonorchiasis: relevance of the problem and diagnostic principles in modern clinical practice (literature review). *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of East Siberian Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2016; 1 (6): 182–190. [In Russian]. doi: 10.12737/23825
5. Григорьева И.Н. Описторхоз: традиции и инновации. *Эксперим. и клин. гастроэнтерол.* 2012; (4): 54–59.
6. Grigoryeva I.N. Opisthorchosis: traditions and innovations. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2012; (4): 54–59. [In Russian].
7. Хамидуллин Р.И., Аглуллин И.Р., Рахманин Ю.А., Погорельцев В.И., Хамидуллин А.Р., Галкина И.В., Хамидуллин И.Р., Султанаева Е.Г. Паразитарный фактор и рак. *Гигиена и сан.* 2011; (6): 8–11.
8. Khamidullin R.I., Aglullin I.R., Rakhmanin Yu.A., Pogoreltsev V.I., Khamidullin A.R., Galkina I.V., Khamidullin I.R., Sultanaeva E.G. Parasitic factor and cancer. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*. 2011; (6): 8–11 [In Russian].
9. Максимова Т.А., Жукова Н.А., Кашина Е.В., Львова М.Н., Катохин А.В., Толстикова Т.Т., Мордвинов В.А. Роль *Opisthorchis felineus* в индукции рака желчевыводящих путей. *Паразитология*. 2015; 49 (1): 3–11.
10. Maksimova T.A., Zhukova N.A., Kashina E.B., Lvova M.N., Katokhin A.B., Tolstikova T.T., Mordvi-

- nov B.A. The role of *Opisthorchis felinus* in the induction of biliary cancer. *Parazitologiya = Parasitology*. 2015; 49 (1): 3–11 [In Russian].
6. Бычков В.Г., Хадиева Е.Д., Зуевский В.П., Лазарев С.Д., Барышников А.П., Симонов А.В., Лукманов И.Р., Урузбаев Р.М., Золотухина Е.В., Шидин В.А. Закономерности канцерогенеза на фоне суперинвазионного описторхоза. *Тюмен. мед. ж.* 2015; 17 (3): 11–13.
- Bychkov V.G., Khadieva E.D., Zuevsky V.P., Lazarev S.D., Baryshnikov A.P., Simonov A.V., Lukmanov I.R., Uruzbaev R.M., Zolotukhina E.V., Shidin V.A. Regularities of carcinogenesis against the background of a superinvasive opisthorchiasis. *Tyumenskiy meditsinskiy zhurnal = Tyumen Medical Journal*. 2015; 17 (3): 11–13. [In Russian].
7. Федорова О.С., Ковширина Ю.В., Ковширина А.Е., Федотова М.М., Деев И.А., Петровский Ф.И., Филимонов А.В., Дмитриева А.И., Кудяков Л.А., Салтыкова И.В., Михалев Е.В., Одерматт П., Огородова Л.М. Анализ заболеваемости инвазией *Opisthorchis felinus* и злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы в Российской Федерации. *Бюл. сиб. мед.* 2016; 15 (5): 147–158. doi: 10.20538/1682-0363-2016-5-147-158
- Fedorova O.S., Kovshirina U.V., Kovshirina A.E., Fedotova M.M., Deev I.A., Petrovsky F.I., Filimonov A.V., Dmitrieva A.I., Kudyakov L.A., Saltykova I.V., Mikhalev E.V., Odermatt P., Ogorodova L.M. Analysis of the incidence of *Opisthorchis felinus* invasion and malignant neoplasms of the hepatobiliary system in the Russian Federation. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 147–158 [In Russian]. doi: 10.20538/1682-0363-2016-5-147-158
8. Богданов А.О., Прокудина Д.В., Байков А.Н., Салтыкова И.В. Молекулярные механизмы, опосредующие развитие холангиокарциномы в ходе хронической инвазии печеночными сосальщиками. *Сиб. онкол. ж.* 2015; (6): 83–90.
- Bogdanov A.O., Prokudina D.V., Baikov A.N., Saltykova I.V. Molecular mechanisms mediating cholangiocarcinoma development during chronic invasion by hepatic suckers. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*. 2015; (6): 83–90. [In Russian].
9. Бибик О.И. Описторхоз – актуальная проблема здравоохранения (обзор и анализ проблемы). *Рос. паразитол. ж.* 2020; 14 (4): 38–49. doi: 10.31016/1998-8435-2020-14-4-38-49
- Bibik O.I. Opisthorchiasis – an urgent public health problem (review and analysis of the problem). *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2020; 14 (4): 38–49. [In Russian]. doi: 10.31016/1998-8435-2020-14-4-38-49
10. Аринжанов А.Е., Лядова А.Ю. Описторхоз: эпидемиология, профилактика, лечение. *Территория науки*. 2016; (6): 7–13.
- Arinzhanov A.E., Lyadova A.Yu. Opisthorchosis: epidemiology, prevention, treatment. *Territориya nauki = Territory of Science*. 2016; (6): 7–13. [In Russian].
11. Sripa B., Brindley P.J., Mulvenna J., Laha T., Smout M.J., Mairiang E., Bethony J.M., Loukas A. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* - multiple pathways to cancer. *Trends Parasitol.* 2012; 28 (10): 395–407. doi: 10.1016/j.pt.2012.07.006
12. Smout M.J., Sripa B., Laha T., Mulvenna J., Gasser R.B., Young N.D., Bethony J.M., Brindley P.J., Loukas A. Infection with the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Mol. Biosyst.* 2011; 7 (5): 1367–1375. doi: 10.1039/c0mb00295j
13. Плотникова Е.Ю., Баранова Е.Н. Описторхоз: осложнения и проблемы лечения. *Гастроэнтерол. Санкт-Петербурга*. 2018; (3): 14–18.
- Plotnikova E.Yu., Baranova E.N. Opisthorchosis: complications and problems of treatment. *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga = Gastroenterology of Saint Petersburg*. 2018; (3): 14–18. [In Russian].
14. Шапот В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М.: Медицина, 1975. 304 с.
- Shapot V.S. Biochemical aspects of tumor growth. Moscow: Meditsina, 1975. 304 p. [In Russian].
15. Меерсон Ф.З., Каган В.Е., Применко Л.Л. Активация перекисного окисления липидов при эмоционально-болевым стрессе. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 1979; 88 (10): 404–406.
- Meerson F.Z., Kagan V.E., Primenko L.L. Activation of lipid peroxidation under emotional pain stress. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine (Bull. Exp. Biol. Med.)*. 1979; 88 (10): 404–406. [In Russian].
16. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога. *Бюл. сиб. мед.* 2017; 16 (4): 16–29. doi: 10.20538/1682-0363-2017-4-16-29
- Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I. Free-radical oxidation: a pathophysiolgist's view. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 16–29. [In Russian]. doi: 10.20538/1682-0363-2017-4-16-29
17. Yongvanit P., Pinlaor S., Bartsch H. Oxidative and nitra-tive DNA damage: Key events in opisthorchiasis-induced carcinogenesis. *Parasitol. Int.* 2012; 61 (1): 130–135. doi: 10.1016/j.parint.2011.06.011
18. Бычков В.Г., Кашуба Э.А., Терсенов О.А. Биохимические и морфологические обоснования риска канцерогенеза при описторхозе. В сб.: *Региональные особенности описторхоза*. Омск, 1985. 69–72.
- Bychkov V.G., Kashuba E.A., Tersenev O.A. Biochemical and morphological substantiation of the risk of carcinogenesis in opisthorchosis. In: *Regional features of opisthorchosis*. Omsk, 1985. 69–72. [In Russian].
19. Жмуров В.А., Налобин А.В., Налобин В.А. Показатели перекисного окисления липидов клеточных мембран и состояние анти-

окислительных систем организма у больных описторхозом. Сб.: *Диагностика и лечение заболеваний печени, поджелудочной железы, селезенки и двенадцатиперстной кишки*. Тюмень, 1987: 280–284.

Zhmurov V.A., Nalobin A.V., Nalobin V.A. Indicators of lipid peroxidation of cell membranes and the state of antioxidant systems in opisthorchosis patients. In: *Diagnosis and treatment of liver, pancreas, spleen and duodenum diseases*. Tyumen, 1987: 280–284. [In Russian].

20. Кашаева М.Д. Микрофлора желчи при остром гнойном холангите на фоне механической желтухи неопухолевой этиологии. *Успехи соврем. естествозн.* 2011; (1): 135–137.

Kashayeva M.D. Microflora of bile in acute purulent cholangitis on the background of mechanical jaundice of non-tumor etiology. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2011; (1): 135–137. [In Russian].

21. Хохлачева Н.А., Глазырина Н.Н., Лукашевич А.П., Вахрушев Я.М., Косарева Т.С. Роль микрофлоры кишечника в развитии желчнокаменной болезни (обзор литературы). *Арх. внутр. мед.* 2020; 10 (1): 31–37. doi: 10.20514/2226-6704-2020-10-1-31-37

Khokhlacheva N.A., Glazyrina N.N., Lukashovich A.P., Vakhrushev Ya.M., Kosareva T.S. The role of intestinal microflora in the development of cholelithiasis (review of literature). *Arkhiv vnutrnney meditsiny = Archive of Internal Medicine*. 2020; 10 (1): 31–37. [In Russian]. doi: 10.20514/2226-6704-2020-10-1-31-37

22. Hill M.J. The effect of some factors on the faecal concentration of acid steroids, neutral steroids and urobilins. *J. Pathol.* 1971; 104 (4): 239–245. doi: 10.1002/path.1711040405

23. Горошинская И.А., Сурикова Е.И., Шалашная Е.В., Неродо Г.А., Максимова Н.А., Мень-

шенина А.П., Сергеева М.М., Качесова П.С., Немашкалова Л.А., Чудилова А.В., Кит О.И. Состояние свободнорадикальных процессов при раке яичников с разной распространенностью и течением заболевания. *Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естеств. н.* 2017; (4): 10–19.

Goroshinskaya I.A., Surikova E.A., Shalashnaya E.V., Nerodo G.A., Maximova N.A., Menshenina A.P., Sergeeva M.M., Kachesova P.S., Nemashkalova L.A., Chudilova A.V., Kit O.I. Status of free radical processes in ovarian cancer with different prevalence and course of the disease. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennyye nauki = University News. North-Caucasian Region. Natural Sciences Series*. 2017; (4): 10–19. [In Russian].

24. Маханова Р.С. К вопросу изучения перекисного окисления липидов. *Изв. Оренбург. гос. аграр. ун-та.* 2011; 29 (1): 231–234.

Makhanova R.S. To the study of lipid peroxidation. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Proceedings of the Orenburg State Agrarian University*. 2011; 29 (1): 231–234. [In Russian].

25. Агейченко А.В., Калущий П.В., Медведева О.А., Королев В.А. Изменение состава микробиоценоза толстого кишечника и антиоксидантных свойств колоноцитов в условиях экспериментального дисбиоза и профилактики эмоксипином. *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2015; (4): 84–88.

Ageychenko A.V., Kalutsky P.V., Medvedeva O.A., Korolev V.A. Changes in colon microbiocenosis composition and antioxidant properties of colonocytes under the condition of experimental dysbiosis and emoxipin prophylaxis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2015; (4): 84–88. [In Russian].

Сведения об авторах:

Николай Михайлович Федоров, к.м.н., e-mail: FNM1948@mail.ru

Ангелина Григорьевна Рыбка, к.б.н., e-mail: a.g.rybka@utmn.ru

Павел Борисович Зотов, д.м.н., проф., e-mail: ZotovPB@tyumsmu.ru

Information about the authors:

Nikolay M. Fedorov, candidate of medical sciences, e-mail: FNM1948@mail.ru

Angelina G. Rybka, candidate of biological sciences, e-mail: a.g.rybka@utmn.ru

Pavel B. Zotov, doctor of medical sciences, professor, e-mail: ZotovPB@tyumsmu.ru

Поступила в редакцию 26.07.2021

Принята к публикации 21.09.2021

Received 26.07.2021

Accepted 21.09.2021

Опыт применения телмисартана, аторвастатина и урсодезоксихолевой кислоты у больных артериальной гипертонией в сочетании с неалкогольной жировой болезнью печени

О.А. Ефремова¹, П.Е. Чернобай¹, Е.П. Погурельская²

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

² Национальный научный центр «Институт кардиологии имени академика Н.Д. Стражеско» НАМНУ
Украина, 03680, г. Киев, ул. Народного Ополчения, 5

Резюме

В настоящее время проведен ряд исследований, подтверждающих наличие взаимосвязи между артериальной гипертонией (АГ) и неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП). Доказано, что наличие АГ усиливает или провоцирует развитие НАЖБП. Нами проведено исследование эффективности назначения телмисартана в сочетании с аторвастатином и урсодезоксихолевой кислотой (УДХК) у пациентов с АГ в сочетании с НАЖБП. **Материал и методы.** В исследование включено 39 пациентов с диагнозом «АГ в сочетании с НАЖБП», которым проводили лечение комбинацией телмисартана, аторвастатина и УДХК в течение 12 недель. Группу сравнения составили 33 пациента с НАЖБП, которым проводилась базовая терапия НАЖБП без включения телмисартана и аторвастатина. Проанализировано влияние назначения данной комбинации на клиническое состояние пациентов с АГ в сочетании с НАЖБП, их гемодинамические показатели, липидный спектр крови, содержание интерлейкина-6 (ИЛ-6), лептина, адипонектина и динамику эхокардиографических и ультрасонографических параметров. **Результаты и их обсуждение.** Применение комбинации телмисартана, аторвастатина и УДХК в течение 12 недель позволило достоверно снизить артериальное давление до целевых значений, улучшить показатели гемодинамики, уменьшить содержание атерогенных компонентов липидного спектра крови, а также сопровождалось снижением уровня ИЛ-6 и лептина, увеличением содержания адипонектина, что способствовало улучшению общего состояния больных, уменьшению выраженности клинико-функциональных проявлений НАЖБП.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, неалкогольная жировая болезнь печени, сартаны, телмисартан, адипонектин, лептин, интерлейкин-6, аторвастатин, урсодезоксихолевая кислота.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Ефремова О.А., e-mail: efremova.bgu@gmail.com

Для цитирования: Ефремова О.А., Чернобай П.Е., Погурельская Е.П. Опыт применения телмисартана, аторвастатина и урсодезоксихолевой кислоты у больных артериальной гипертонией в сочетании с неалкогольной жировой болезнью печени. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 75–82. doi: 10.18699/SSMJ20210510

Experience of using telmisartan, atorvastatin and ursodeoxycholic acid in patients with arterial hypertension in combination with non-alcoholic fatty liver disease

O.A. Efremova¹, P.E. Chernobay¹, E.P. Pogurelskaya²

¹ Belgorod State University
308015, Belgorod, Pobedy str., 85

² National Scientific Center «M.D. Strazhesko Institute of Cardiology» of NAMSU
Ukraine, 03680, Kiev, Narodnogo Opolcheniya str., 5

Abstract

A number of studies have now been conducted confirming the relationship between arterial hypertension (AH) and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). It has been proved that the presence of AH increases or provokes the development of NAFLD. A study of telmisartan effectiveness in combination with atorvastatin and ursodeoxycholic acid (UDCA) in patients with AH and NAFLD was carried out in this article. **Material and methods.** The study included 39 patients diagnosed with arterial hypertension in combination with NAFLD, who were treated with a combination of drugs: Telmisartan, Atorvastatin and UDCA for 12 weeks. The comparison group consisted of 33 patients with NAFLD who received basic NAFLD therapy without telmisartan and atorvastatin. The study analyzed the efficacy of the prescription of this combination on the clinical condition of patients with AH combined with NAFLD, their hemodynamic parameters, the levels of blood lipid spectrum, IL-6, leptin, adiponectin, and the dynamics of echocardiographic and ultrasonographic parameters. **Results and discussion.** It has been revealed, that application of telmisartan, atorvastatin and UZHK combination for 12 weeks significantly reduced BP levels to the target values, improved hemodynamic indexes, led to reduction of atherogenic components of blood lipid spectrum. And also prescription of this combination decreased IL-6 and leptin levels, increased adiponectin content, which contributed to improvement of the general state of patients, decrease in the severity of clinical and functional manifestations of NAFLD.

Key words: arterial hypertension, non-alcoholic fatty liver disease, sartans, telmisartan, adiponectin, leptin, interleukin-6, atorvastatin, ursodeoxycholic acid.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Efremova O.A., e-mail: Efremova.bgu@gmail.com

Citation: Efremova O.A., Chernobay P.E., Pogurelskaya E.P. Experience of using telmisartan, atorvastatin and ursodeoxycholic acid in patients with arterial hypertension in combination with non-alcoholic fatty liver disease. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 75–82. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210510

Введение

Сочетание неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и артериальной гипертензии (АГ) – пожалуй, наиболее удачный пример коморбидности патологий. Это именно та клиническая ситуация, которая вызвана параллельным поражением различных органов и систем и обусловлена единым патологическим началом. Накопленный клинический опыт позволяет расценивать АГ как один из этиологических факторов метаболических нарушений во многих органах, в частности в печени [1–3]. Так, у пациентов с АГ более чем в 50 % случаев выявляют НАЖБП без других факторов риска развития этой патологии [4, 5]; 80 % случаев НАЖБП диагностируют в группе лиц с недостаточным ночным снижением артериального давления (АД) (суточный индекс <10 %), что ассоциируется с высоким уровнем инсулина и адипонектина [6, 7].

Современные американские и канадские рекомендации по лечению АГ предусматривают первоочередное назначение антигипертензивных средств – антагонистов рецепторов ангиотензина II (сартанов), ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ), бета-адреноблокаторов, антагонистов кальция длительного действия и др. Однако они не дают специфических рекомендаций по лечению АГ в сочетании с НАЖБП [3, 8].

Неоспоримым является тот факт, что в формировании процессов фиброгенеза ведущая роль принадлежит ангиотензину II. Возможным механизмом реализации этого эффекта полагают повышение производства профиброгенного цитокина трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), который активирует звездчатые клетки. Ангиотензин II оказывает не только сосудосуживающее и про-тромбогенное действие, но и способен индуцировать окислительный стресс. Сегодня сартаны занимают лидирующее место при лечении больных АГ во многих странах мира. По данным исследований TRANSCEND и ONTARGET, сартаны увеличивают выработку оксида азота и способствуют улучшению эндотелиальной функции сосудов, увеличивают чувствительность тканей к инсулину, а некоторые из них стабилизируют концентрацию адипоцитокинов плазмы крови [9–14].

Телмисартан – один из наиболее известных препаратов этой группы с широким спектром действия и доказанными органопротективными свойствами [15–17]. Предыдущие исследования показали, что у больных с НАЖБП лечение сартанами приводило к уменьшению некровоспалительного ответа и уменьшению фиброза и стеатоза печени, а также к уменьшению диаметра висцеральной жировой ткани. Это позволило применять его для лечения больных с высоким и очень высоким риском развития сердечно-со-

судистых заболеваний с сопутствующей НАЖБП [18, 19]. Доказано, что он обладает способностью действовать как частичный агонист рецептора γ , активируемого пролифератором пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ), сильнее, чем другие препараты из группы сартанов, и при длительном применении уменьшает индекс массы миокарда левого желудочка сердца [20]. В исследовании FANTASY терапия телмисартаном в течение 12 месяцев была связана со снижением уровня свободных жирных кислот в сыворотке и нормализацией содержания ферментов печени [21]. Тем не менее доказательная база использования телмисартана в комплексной терапии с аторвастатином и урсодезоксихолевой кислотой (УДХК) недостаточна, что подчеркивает актуальность данного исследования.

Целью исследования было оценить эффективность назначения телмисартана в сочетании с аторвастатином и УДХК на клиническое состояние пациентов с АГ в сочетании с НАЖБП, их гемодинамические показатели, липидный спектр крови, содержание интерлейкина-6 (ИЛ-6), лептина, адипонектина и динамику эхокардиографических и ультрасонографических параметров.

Материал и методы

В исследование включено 39 пациентов с диагнозом «АГ с сопутствующей НАЖБП», находившихся на стационарном лечении в терапевтическом и гастроэнтерологическом отделениях ОГБУЗ «Городская больница № 2 г. Белгорода» (основная группа). После первичного обследования в составе комплексной терапии сочетанной патологии им было предложено лечение комбинацией препаратов: телмисартан – 20 мг/сут, аторвастатин – 20 мг/сут и УДХК – 10 мг/кг в сутки в течение 12 недель. 33 пациента с НАЖБП составили группу сравнения, которая была стандартизирована по возрасту и полу с основной группой. Им проводилась базовая терапия НАЖБП без включения телмисартана и аторвастатина. На этапе включения обязательным было наличие добровольного информированного согласия на участие в исследовании. В работе с больными использовали стандартные клинические методы обследования и типичные лабораторно-инструментальные методы исследования с помощью автоматического биохимического анализатора AU680 (Beckman Coulter, США) и анализатора критических состояний i-STAT300 (Abbott, США) с соответствующими реактивами. Общий анализ крови и мочи, содержание глюкозы в крови, активность АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, концентрация общего билирубина, общего холесте-

рина (ОХ), липопротеинов низкой (ЛПНП), очень низкой (ЛПОНП) и высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов, креатинина, мочевины, общего белка определялись фотокolorиметрически. Дислипидемией считали повышение уровня ЛПНП $>1,4$ ммоль/л согласно рекомендациям ESC/EAS [22].

Содержание ИЛ-6, лептина и адипонектина определяли иммуноферментным методом. ^{13}C -метацетиновый дыхательный тест (^{13}C -МДТ) проводили на инфракрасном Фурье-спектрометре ФСМ 2211 (Россия), оценивая скорость метаболизма и содержание в выдыхаемом воздухе метаболита ^{13}C -метацетана. Ультрасонографию органов брюшной полости проводили на аппарате УЗИ Edan U2 (Россия), электрокардиографию – с помощью стандартных электрокардиографов (ЭКГ-300G, МИДАС-ЭК1Т, ЮКАРД-100 и CARDIOVIT AT-2), эхокардиографию (ЭхоКГ) в М- и В-режимах – стандартным способом с помощью ультрасонографического аппарата GE VIVID 7 Vantage (США). Применялся датчик мультисигментный 2,5-4 для кардиологических исследований.

Исследование проводилось в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Среди обследованных больных этой группы были 21 (53,8 %) женщина и 18 (46,15 %) мужчин. Средний возраст пациентов составил $54,32 \pm 2,14$ года. Лиц в возрасте 45–59 лет было 28 (71,79 %), 60–74 лет – 11 (28,2 %) человек. У всех пациентов констатирована вторая степень АГ (на основании клинических рекомендаций Российского кардиологического общества «Артериальная гипертензия у взрослых», 2020 г.). Большинство пациентов имели высокий риск АГ по оценке прогноза – 22 (56,4 %) человека, умеренный риск был у 17 (43,5 %) человек. Начало клинических проявлений АГ у больных данной группы было в пределах от 2 до 25 лет, средняя продолжительность заболевания составляла $8,14 \pm 1,19$ года. Диагноз НАЖБП ставился на основании клинических рекомендаций по диагностике и лечению НАЖБП Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации (2016 г.) [23].

У пациентов была выявлена следующая сопутствующая патология в неактивной фазе: ИБС, стабильная стенокардия, I–II функциональный класс – у 28 (71,1 %) человек; болезни билиарной

Таблица 1. Частота клинических проявлений у пациентов с АГ, сочетанной с НАЖБП, до и после лечения комбинацией телмисартана, аторвастатина и УДХК**Table 1.** Frequency of clinical manifestations in patients with AH combined with NAFLD before and after treatment with a combination of telmisartan, atorvastatin and ursodeoxycholic acid

Клинический признак	До лечения (n = 39)		После лечения (n = 39)		p
	n	%	n	%	
Головная боль	39	100,0	12	30,7	< 0,01
Общая слабость	39	100,0	14	35,9	< 0,01
Быстрая утомляемость	35	89,7	11	28,2	< 0,01
Головокружение	34	87,2	11	28,2	< 0,01
Нарушение сна	31	79,5	8	20,5	< 0,01
Шум в ушах	31	79,5	3	7,6	< 0,01
Дискомфорт в области сердца	27	69,2	6	15,4	< 0,01
Мелькание «мушек» перед глазами	22	56,41	5	12,8	< 0,01
Головокружение	14	35,9	3	7,6	> 0,05
Носовые кровотечения	8	20,5	0	0	> 0,05
Сердцебиение	16	41,0	5	12,8	> 0,05
Одышка при физической нагрузке	6	15,38	0	0	> 0,05
Акцент II тона над аортой	25	64,1	25	64,1	> 0,05

системы (желчнокаменная болезнь, хронический холецистит) – у 22 (56,4 %); хронический панкреатит – у 16 (41,0 %); мочекаменная болезнь – у 11 (28,2 %).

Полученные первичные данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка. Оценивали среднее значение (M) и статистическую ошибку среднего (m). Достоверность изменений показателей в двух группах больных до и после лечения оценивали с использованием критериев Стьюдента и Манна – Уитни. Расхождения считали достоверными при $p < 0,05$. Для исследования взаимосвязи нормально распределенных количественных признаков использовали корреляционный анализ Пирсона.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что включение в терапию больных АГ с сопутствующей НАЖБП комплекса препаратов не влияло на антропометрические показатели. После 12-недельной терапии комбинацией данных препаратов выявили положительную динамику АД и частоты сердечных сокращений: если до лечения систолическое АД составляло $168,90 \pm 1,84$ мм рт. ст., диастолическое – $110,03 \pm 0,65$ мм рт. ст., частота сердечных сокращений – $85,99 \pm 0,58$ уд. за 1 мин, то после лечения показатели снизились соответственно на 19,0, 31,0 и 13,4 %

($p < 0,01$). Вероятно, уменьшение данных параметров и привело к улучшению общего состояния больных.

Через 12 недель лечения комбинацией телмисартана, аторвастатина и УДХК у пациентов наблюдали улучшение общего состояния, что проявлялось уменьшением частоты всех жалоб, особенно таких, как боль в затылке и лобной области, головокружение, дискомфорт в области сердца ($p < 0,01$) (табл. 1).

До лечения повышенная концентрация в сыворотке крови ОХ встречалась у 37 (94,8 %) больных, ЛПНП – у 27 (69,2 %), триглицеридов – у 14 (35,9 %), уровень ЛПВП был ниже нормы у 9 (23,1 %) больных. Назначение телмисартана в комплексной терапии с аторвастатином и УДХК привело к достоверным изменениям содержания липидов в сыворотке крови за счет уменьшения ОХ на 25,1 % ($p < 0,01$), ЛПНП – на 21,1 % ($p < 0,01$) и триглицеридов – на 26,6 % ($p < 0,05$); у 8 (20,5 %) пациентов уровень ЛПВП оставался пониженным и не достиг значений нормы (табл. 2). Активность трансаминаз до лечения была достоверно выше, чем после лечения. После проведенной терапии активность АлАТ уменьшилась в 1,7 раза ($p < 0,05$), АсАТ – в 1,27 раза ($p < 0,05$) (см. табл. 2). Также отмечено достоверное снижение уровня общего билирубина в 1,87 раза ($p < 0,01$), что соответствует данным литературы [24].

Таблица 2. Липидный спектр крови, активность печеночных трансаминаз, содержание билирубина, ИЛ-6 и адипокинов у пациентов с АГ, сочетанной с НАЖБП, до и после лечения комбинацией телмисартана, atorvastatina и УДХК**Table 2.** Blood lipid spectrum, activity of hepatic transaminases, content of bilirubin, IL-6 and adipokines in patients with AH combined with NAFLD before and after treatment with a combination of telmisartan, atorvastatin and ursodeoxycholic acid

Показатель	До лечения (n = 39)	После лечения (n = 39)	p
Содержание ОХ, ммоль/л	6,21 ± 0,11	4,65 ± 0,18	< 0,01
Содержание триглицеридов, ммоль/л	2,21 ± 0,09	1,62 ± 0,13	< 0,05
Содержание ЛПНП, ммоль/л	4,11 ± 0,13	3,24 ± 0,21	< 0,01
Содержание ЛПВП, ммоль/л	1,14 ± 0,12	1,11 ± 0,06	> 0,05
Активность АлАТ, ммоль/(ч×л)	0,75 ± 0,08	0,44 ± 0,03	< 0,05
Активность АсАТ, ммоль/(ч×л)	0,57 ± 0,05	0,45 ± 0,05	< 0,05
Содержание общего билирубина, мкмоль/л	16,45 ± 0,35	8,76 ± 0,08	< 0,01
Содержание ИЛ-6, пг/мл	9,62 ± 0,87	3,67 ± 0,54	< 0,01
Содержание лептина, нг/мл	45,03 ± 4,12	30,75 ± 2,93	< 0,05
Содержание адипонектина, мкг/мл	17,07 ± 0,37	27,04 ± 0,35	< 0,01

Таблица 3. Результаты ЭхоКГ у пациентов с АГ, сочетанной с НАЖБП, до и после лечения комбинацией телмисартана, atorvastatina и УДХК**Table 3.** EchoCG results in patients with AH combined with NAFLD after treatment with a combination of telmisartan, atorvastatin and ursodeoxycholic acid

Показатель	До лечения (n = 39)	После лечения (n = 39)	p
Размер правого желудочка, см	2,28 ± 0,07	2,31 ± 0,06	> 0,05
Толщина межжелудочковой перегородки, см	1,07 ± 0,06	1,03 ± 0,03	> 0,05
Размер левого желудочка, см	4,79 ± 0,12	4,38 ± 0,12	< 0,05
Толщина задней стенки левого желудочка, см	1,12 ± 0,11	1,08 ± 0,05	> 0,05
Переднезадний размер левого предсердия, см	4,77 ± 0,07	4,1 ± 0,11	< 0,01
Размер восходящей аорты, см	3,09 ± 0,04	3,12 ± 0,06	> 0,05
Фракция выброса, %	56,06 ± 0,07	59,99 ± 0,71	< 0,01
Масса миокарда, г	229,11 ± 17,95	180,21 ± 9,97	< 0,01
Индекс массы миокарда, г/м ²	116,98 ± 11,02	88,71 ± 5,02	< 0,01
Относительная толщина миокарда	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,01	< 0,01

Как видно из табл. 3, после проведенного лечения выявлены достоверные изменения размеров сердца. Так, размер левого желудочка уменьшился на 8,5 % ($p < 0,05$), левого предсердия – на 14,0 % ($p < 0,01$), что сопровождалось достоверным ростом фракции выброса на 7,0 % ($p < 0,01$), снижением массы миокарда на 21,3 % ($p < 0,01$), индекса массы миокарда левого желудочка – на 24,1 % ($p < 0,05$) (см. табл. 3). Полученные результаты указывают на положительное влияние схемы комплексного лечения с применением тел-

мисартана на структурно-функциональные показатели миокарда.

По данным ультразвукографии печени, у всех пациентов констатирована гепатомегалия с неоднородным уплотнением паренхимы печени, диффузной жировой инфильтрацией и среднезернистой трансформацией структуры органа. После лечения наблюдалась тенденция к уменьшению размеров правой (на 0,82 %, $p > 0,05$) и левой (на 1,31 %, $p > 0,05$) долей печени, а также существенно уменьшалась vena portae (на 4,6 %, $p < 0,01$).

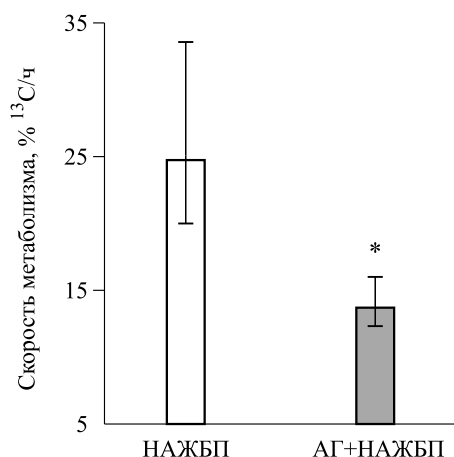


Рис. Скорость метаболизма у пациентов с сочетанной патологией и у лиц группы сравнения (медиана, межквартильный интервал); * – отличие от величины соответствующего показателя группы сравнения статистически значимо при $p < 0,01$

Fig. Metabolic rate in patients with combined pathology and in the comparison group (median, interquartile interval); * - the difference from the value of the corresponding indicator of the comparison group is statistically significant at $p < 0.01$

Для определения доли функционирующих гепатоцитов у больных с признаками жировой инфильтрации печени с сопутствующей АГ проводили 13С-МДТ. Скорость метаболизма до лечения колебалась от 4,2 до 19,1 % ¹³C/ч и была значительно меньше, чем в группе сравнения (рисунок). Кумулятивная доза (отражает объем метаболизированного субстрата) через 40 минут составляла $7,10 \pm 0,48$ % ¹³C/ч, через 120 минут – $12,82 \pm 0,94$ % ¹³C/ч. Результаты 13С-МДТ свидетельствуют о нарушении функционального состояния микросомальных ферментных систем гепатоцитов при наличии коморбидной патологии. Провоцирующими факторами повреждения клеток печени, вероятно, являются нейрогуморальные и эндотелиальные нарушения при АГ. 13С-МДТ позволил достоверно установить снижение функции гепатоцитов и подтвердить диагноз НАЖБП, что соответствует данным литературы [25, 26].

Содержание провоспалительного ИЛ-6 до лечения у пациентов было увеличено (см. табл. 2), будучи больше нормы у всех 39 пациентов основной группы. После лечения уровень ИЛ-6 уменьшился в 2,6 раза ($p < 0,01$). Концентрация лептина после лечения снизилась в 1,46 раза ($p < 0,05$), уровень адипонектина повысился на 58,4 % ($p < 0,01$) (см. табл. 2).

Заключение

Применение комбинации телмисартана, аторвастатина и УДХК в течение 12 недель позволило достоверно снизить систолическое и диастолическое

сское АД до нормальных значений, кроме этого в результате лечения увеличилась фракция выброса, уменьшились размер левого и правого желудочка, масса миокарда и индекс массы миокарда левого желудочка.

На наш взгляд, необходимо учитывать возможные плеiotропные эффекты этих препаратов. Так, аторвастатин в дозе 20 мг/сут в течение трех месяцев приводил не только к уменьшению уровней атерогенных фракций липидного спектра крови, но и подавлял образование ИЛ-6, тем самым нивелируя воспалительную составляющую дисфункции эндотелия сосудов. Кроме этого аторвастатин снижает уровень лептина, опосредованно влияя на задержку повышения веса у больных и уменьшая факторы риска развития ишемических событий [27]. Особенностью назначения телмисартана было непосредственное влияние этого препарата на снижение концентрации адипонектина, что, по данным литературы, приводит к улучшению функции эндотелия сосудов [28, 29].

Таким образом, важной особенностью этой комбинации препаратов является свойство не только влиять на гемодинамические показатели и снижать систолическое и диастолическое АД, но и способствовать уменьшению уровня ИЛ-6, лептина и увеличению содержания адипонектина, что приводит к улучшению общего состояния больных АГ в сочетании с НАЖБП.

Список литературы / References

1. Qian L.-Y., Tu J.-F., Ding Y.-H., Pang J., Che X.-D., Zou H., Huang D.-S. Association of blood pressure level with nonalcoholic fatty liver disease in nonhypertensive population. Normal is not the new normal. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95 (29): e4293. doi: 10.1097/MD.00000000000004293
2. Younossi Z.M., Koenig A.B., Abdelatif D., Fazel Y., Henry L., Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016; 64: 73–84. doi: 10.1002/hep.28431
3. Younossi Z., Anstee Q.M., Marietti M., Hardy T., Henry L., Eslam M., George J., Bugianesi E. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2018; 15 (1): 11–20. doi: 10.1038/nrgastro.2017.109
4. Federico A., Dallio M., Masarone M., Persico M., Loguercio C. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease and its connection with cardiovascular disease: Role of endothelial dysfunction. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016; 20 (22): 4731–4741.
5. Шишова И.А., Абдулгани Ш., Ефремова О.А., Болховитин А.А., Камышникова Л.А., Чернобай П.Е. Генетические факторы развития неалкогольной

жировой болезни печени на фоне метаболического синдрома. *Университетская наука: взгляд в будущее*: сб. тр. конф., Курск, 07 февраля 2020. Курск: КГМУ, 2020. 393–395.

Shishova I.A., Abdulgani Sh., Efremova O.A., Bolkhovitin A.A., Kamyshnikova L.A., Chernobai P.E. Genetic factors of nonalcoholic fatty liver disease against metabolic syndrome. *University science: a look into the future*: proc. conf., Kursk, 07.02.2020. Kursk: KGMU, 2020. 393–395. [In Russian].

6. Rosato V., Masarone M., Dallio M., Federico A., Aglitti A., Persico M. NAFLD and Extra-Hepatic Comorbidities: Current evidence on a multi-organ metabolic syndrome. *J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16 (18): 3415. doi: 10.3390/ijerph16183415

7. Zhao Y.-C., Zhao G.-J., Chen Z., She Z.-G., Cai J., Li H. Nonalcoholic fatty liver disease an emerging driver of hypertension. *Hypertension*. 2020; 75 (2): 275–284. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13419

8. Satou R., Penrose H., Navar L.G. Inflammation as a regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *Curr. Hypertens. Rep.* 2018; 20: 100. doi: 10.1007/s11906-018-0900-0

9. Стаценко М.Е., Стрельцова А.М., Туровец М.И. Влияние неалкогольной жировой болезни печени на показатели артериальной жесткости и риск сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с артериальной гипертензией. *Арх. внутр. мед.* 2020; 10 (4): 296–304. doi: 10.20514/2226-6704-2020-10-4-296-304

Statsenko M.E., Streltsova A.M., Turovets M.I. Effect of nonalcoholic fatty liver disease on arterial stiffness and risk of cardiovascular complications in patients with arterial hypertension. *Arkhiv vnutrney meditsiny = Archives of Internal Medicine*. 2020; 10 (4): 296–304. [In Russian]. doi: 10.20514/2226-6704-2020-10-4-296-304

10. Goh G.B., Pagadala M.R., Dasarathy J., Unalp-Arida A., Sargent R., Hawkins C., Sourianarayanan A., Khyami A., Yerian L., Pai R., McCullough A.J., Dasarathy S. Renin-angiotensin system and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2015; 35: 979–985. doi: 10.1111/liv.12611

11. Omboni S., Volpe M. Management of arterial hypertension with angiotensin receptor blockers: Current evidence and the role of olmesartan. *Cardiovasc. Ther.* 2018; 6 (6): e12471. doi: 10.1111/1755-5922.12471

12. Lucas F.A., Signe S.T., Kirsten M., Boye L.J. Role of the renin-angiotensin system in kidney development and programming of adult blood pressure. *Review Clin. Sci. (Lond)* 2020; 134(6): 641–656. doi: 10.1042/CS20190765

13. Telmisartan Randomised Assessment Study in ACE intolerant subjects with cardiovascular Disease (TRANSCEND) Investigators, Yusuf S., Teo K., Anderson C., Pogue J., Dyal L., Copland I., Schumacher H., Dagenais G., Sleight P. Effects of the angiotensin-receptor blocker telmisartan on cardiovascular events in high-risk patients intolerant to angiotensin-converting

enzyme inhibitors: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008; 372 (9644): 1174–1183. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61242-8

14. Тихонов А.И., Хворостинка В.Н., Ефремова О.А., Ярных Т.Г., Пушкар С.Н., Котенко А.М. Средство, обладающее антиоксидантным и гепатозащитными свойствами. Пат. РФ № 2020946, 15.10.1994.

Tikhonov A.I., Hovorostinka V.N., Efremova O.A., Yarnikh T.G., Pushkar S.N., Kotenko A.M. The remedy that has antioxidant and hepatoprotective properties. Patent RF № 2020946, 15.10.1994. [In Russian].

15. Bakheit A.H., Abdelgalil A.A., Mustafa B., Haque A., Wani T.A. Telmisartan. Profiles drug. *Subst. Excip. Relat. Methodol.* 2015; 40: 371–429. doi: 10.1016/bs.pdrm.2015.01.003

16. Ogawa H., Soejima H., Matsui K., Kim-Mitsuyama S., Yasuda O., Node K., Yamamuro M., Yamamoto E., Kataoka K., Jinnouchi H., Sekigami T., ATTEMPT-CVD investigators. A trial of telmisartan prevention of cardiovascular diseases (ATTEMPT-CVD): Biomarker study. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 2016; 23 (9): 913–921. doi: 10.1177/2047487315603221

17. Pérez-Pérez A., Vilariño-García T., Fernández-Riejos P., Martín-González J., Segura-Egea J.J., Sánchez-Margalet V. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017; 35: 71–84. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.03.001

18. Borém L.M.A., Neto J.F.R., Brandi I.V., Lelis D.F., Santos S.H.S. The role of the angiotensin II type I receptor blocker telmisartan in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Hypertens. Res.* 2018; 41 (6): 394–405. doi: 10.1038/s41440-018-0040-6

19. Shahinul A., Jahangir K., Golam M., Utpal-Das G., Nazmul H., Khorshed A. Effect of telmisartan on histological activity and fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis: A 1-year randomized control trial. Randomized controlled trial. *Saudi J. Gastroenterol.* 2016; 22 (1): 69–76. doi: 10.4103/1319-3767.173762

20. Devan A.R., Nair B., Kumar A.R., Nath L.R. An insight into the role of telmisartan as PPAR- γ/α dual activator in the management of nonalcoholic fatty liver disease. *Review Biotechnol. Appl. Biochem.* 2021; 2 (12). doi: 10.1002/bab.2123

21. Hirata T., Tomita K., Kawai T., Yokoyama H., Shimada A., Kikuchi M., Hirose H., Ebinuma H., Irie J., Ojio K., Oikawa Y., Saito H., Itoh H., Hibi T. Effect of telmisartan or losartan for treatment of nonalcoholic fatty liver disease: fatty liver protection trial by telmisartan or losartan study (FANTASY). *J. Endocrinol.* 2013; 2013: 587140. doi: 10.1155/2013/587140

22. Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Тихонов И.Н., Широкова Е.Н., Буевров А.О., Драпкина О.М., Шульпекова Ю.О., Цуканов В.В., Маммаев С.Н., Маев И.В., Пальгова Л.К. Клинические рекомендации по диагностике и лечению

неалкогольной жировой болезни печени Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации. *Рос. ж. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* 2016; 2 (26): 24–42. doi: 10.22416/1382-4376-2016-26-2-24-42

Ivashkin V.T., Mayevskaya M.V., Pavlov Ch.S., Tikhonov I.N., Shirokova E.N., Bueverov A.O., Drapkina O.M., Shulpekova Yu.O., Tsukanov V.V., Mammaev S.N., Maev I.V., Palgova L.K. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease of the Russian Society for the Study of the Liver and the Russian Gastroenterological Association. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2016; 2 (26): 24–42. doi: 10.22416/1382-4376-2016-26-2-24-42

23. Mach F., Baigent C., Catapano A.L., Koskinas K.C., Casula M., Badimon L., Chapman J.M., De B.G.G., Delgado V., Ference B.A., Graham I.A.M., Halliday A., Landmesser U., Mihaylova B., Pedersen T.R., Riccardi G., Richter D.J., Sabatine M.S., Taskinen M.R., Tokgozoglu L., Wiklund O. 2019 рекомендации ESC/EAS по лечению дислипидемий: модификация липидов для снижения сердечно-сосудистого риска. *Рос. кардиол. ж.* 2020; 25 (5): 121–193. doi: 10.15829/1560-4071-2020-3826

Mach F., Baigent C., Catapano A.L., Koskinas K.C., Casula M., Badimon L., Chapman J.M., De B.G.G., Delgado V., Ference B.A., Graham I.A.M., Halliday A., Landmesser U., Mihaylova B., Pedersen T.R., Riccardi G., Richter D.J., Sabatine M.S., Taskinen M.R., Tokgozoglu L., Wiklund O. 2019ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology.* 2020; 25 (5): 121–193. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2020-3826

24. Дичева Д.Т., Кузнецова Е.И. Современные аспекты лечения пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени. *Consilium Medicum.* 2018; 20 (8): 20–23. doi: 10.26442/2075-1753_2018.8.20-23

Dicheva D.T., Kuznetsova E.I. Modern aspects of treatment of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Consilium Medicum.* 2018; 20 (8): 20–23. [In Russian]. doi: 10.26442/2075-1753_2018.8.20-23

25. Бакулин И.Г., Медведев Ю.В. 13С-метацетиновый дыхательный тест при оценке функционального резерва печени. *Фарматека.* 2016; 16 (5): 71–80.

Bakulin I.G., Medvedev Yu.V. 13C-metaceticin breathing test in assessing the functional reserve of the liver. *Farmateka = Pharmateca.* 2016; 16 (5): 71–80. [In Russian].

26. Gorowska-Kowolik K., Chobot A., Kwiecien J. 13C Methaceticin breath test for assessment of microsomal liver function: methodology and clinical application. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2017; 7397840. doi: 10.1155/2017/7397840

27. Yu W., Kun L.M., Yang Z., Yi W., Gui H.W., Ze B.H., Liang L., Jian L., Pei P.C., Xiong Z.R., Bi C.L. Lipid disorder and intrahepatic renin-angiotensin system activation synergistically contribute to non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2016; 36 (10): 1525–1534. doi: 10.1111/liv.13131

28. Spurná J., Karásek D., Kubičková V., Goldmannová D., Krystyník O., Schovánek J., Zdražil J. Relationship of selected adipokines with markers of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2018; 16 (5): 246–253. doi: 10.1089/met.2017.0179

29. Dong X., Yan X., Zhang W., Tang S. Adiponectin enhances biological functions of vascular endothelial progenitor cells through the mTOR-STAT3 signaling pathway. *Physiol. Res.* 2018; 67 (4): 563–570. doi: 10.33549/physiolres.933738

Сведения об авторах:

Ольга Алексеевна Ефремова, д.м.н., ORCID: 0000-0002-6395-1626, e-mail: efremova@bsu.edu.ru

Павел Егорович Чернобай, e-mail: 699143@bsu.edu.ru

Елена Павловна Погурельская, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4717-6823, e-mail: selenanonyx@gmail.com

Information about the authors:

Olga A. Efremova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-6395-1626, e-mail: efremova@bsu.edu.ru

Pavel E. Chernobay, e-mail: 699143@bsu.edu.ru

Elena P. Pogurelskaya, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4717-6823, e-mail: selenanonyx@gmail.com

Поступила в редакцию 19.04.2021

После доработки 27.05.2021

Принята к публикации 07.07.2021

Received 19.04.2021

Revision received 27.05.2021

Accepted 07.07.2021

Особенности ассоциации ультразвуковых, гемодинамических и биохимических показателей атеросклероза сонных и коронарных артерий у больных ишемической болезнью сердца

В.Я. Поляков, А.А. Старичкова, Ю.А. Николаев, О.В. Сипполайнен, Е.В. Севостьянова

*ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Резюме

Увеличение доли коморбидных больных кардиологического профиля с ведущими нозологиями, артериальной гипертензией и атеросклерозом, делает актуальным поиск оптимальных подходов к их диагностике и лечению с учетом индивидуально формирующихся патогенетических механизмов сочетанных заболеваний. Цель исследования – изучить особенности атеросклеротических изменений сонных артерий у больных ИБС, перенесших чрескожную транслюминальную коронарную ангиопластику, и их взаимосвязь с биохимическими и гемодинамическими маркерами атеросклероза. **Материал и методы.** В клинике ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины выполнено обследование и лечение 53 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Средний возраст больных составил $64,73 \pm 1,66$ года. Проводилось комплексное клиническое лабораторное обследование, включающее определение липидного спектра крови (содержание общего холестерина, холестерина на липопротеинов низкой и высокой плотности, триглицеридов), а также сывороточных маркеров системного воспаления (концентрация С-реактивного белка (СРБ), фибриногена, скорость оседания эритроцитов (СОЭ)), и ультразвуковое дуплексное сканирование сонных артерий. **Результаты.** Выявлена прямая зависимость выраженности атеросклеротического изменения сонных артерий от величины показателей системного воспаления: СРБ, СОЭ и фибриногена. Установлена большая выраженность атеросклеротического стенозирования сонных артерий у пациентов с ИБС с проведенной чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластикой со стентированием коронарных артерий по сравнению с больными без вмешательства. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения ультразвукового исследования сонных артерий для ранней диагностики мультифокального атеросклероза с целью проведения своевременного лечения и профилактики сердечно-сосудистой полиморбидности у пациентов кардиоваскулярного профиля.

Ключевые слова: атеросклероз, полиморбидность, ишемическая болезнь сердца, дуплексное сканирование сонных артерий, липидный профиль, С-реактивный белок.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Поляков В.Я., e-mail: vpolyakov15@mail.ru

Для цитирования: Поляков В.Я., Старичкова А.А., Николаев Ю.А., Сипполайнен О.В., Севостьянова Е.В. Особенности ассоциации ультразвуковых, гемодинамических и биохимических показателей атеросклероза сонных и коронарных артерий у больных ишемической болезнью сердца. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 83–88. doi: 10.18699/SSMJ20210511

Patterns of the association among ultrasound, hemodynamic and biochemical parameters of atherosclerosis of the carotid and coronary arteries in patients with coronary heart disease

V.Ya. Polyakov, A.A. Starichkova, Yu.A. Nikolaev, O.V. Sippolaynen, E.V. Sevostyanova

*Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

Abstract

An increase in the proportion of comorbid cardiac patients with primary nosologies such as arterial hypertension and atherosclerosis actualizes the search for optimal approaches to their diagnosis and treatment. The emerging pathogenetic mechanisms of concomitant diseases must be taken into account on an individual basis. Aim of the study was to investigate

the patterns of atherosclerotic changes in carotid arteries in patients with coronary heart disease who underwent percutaneous transluminal coronary angioplasty and their correlation with biochemical and hemodynamic markers of atherosclerosis. **Material and methods.** 53 patients with coronary heart disease (CHD) were examined and treated in the clinic of the Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine. The average age of the patients was 64.73 ± 1.66 years. A comprehensive clinical laboratory examination was conducted, including the blood lipids test to measure content of total cholesterol, low- and high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, as well as serum markers of systemic inflammation (concentration of C-reactive protein (CRP), fibrinogen, erythrocyte sedimentation rate (ESR)) and carotid artery duplex scan. **Results.** A direct correlation between the severity of atherosclerotic changes in the carotid arteries and indicators of systemic inflammation, i.e. CRP, ESR and fibrinogen was found. The study also revealed greater severity of atherosclerotic stenosis of the carotid arteries in patients with coronary artery disease who underwent percutaneous transluminal coronary angioplasty with coronary artery stenting compared to patients without any intervention. **Conclusion.** The obtained data indicate the effectiveness of ultrasound scan of the carotid arteries for the early diagnosis of multifocal atherosclerosis for timely treatment and prevention of cardiovascular polymorbidity in patients with a cardiovascular profile.

Key words: atherosclerosis, polymorbidity, coronary heart disease, carotid artery duplex scan, lipid profile, C-reactive protein.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Polyakov V.Ya., e-mail: vpolyakov15@mail.ru

Citation: Polyakov V.Ya., Starichkova A.A., Nikolaev Yu.A., Sippolaynen O.V., Sevostyanova E.V. Patterns of the association among ultrasound, hemodynamic and biochemical parameters of atherosclerosis of the carotid and coronary arteries in patients with coronary heart disease. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 83–88. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210511

Введение

Ведущую патогенетическую роль в сердечно-сосудистой полиморбидности имеет сочетание артериальной гипертензии (АГ) и атеросклероза [1–5]. У таких больных актуальным вопросом является точная диагностика поражений всех артериальных бассейнов. Ультразвуковое дуплексное сканирование (УДС) артерий – точный и удобный в практическом использовании метод диагностики, позволяющий оценивать структуру сосудистой стенки и функциональное состояние артерий. В то же время целесообразно использование УДС в комбинации с определением биохимических параметров атеросклероза для прогнозирования его клинического течения [6, 7]. Клиническое и прогностическое значение атеросклеротической бляшки (АСБ) во многом зависит от ее структуры [8]. Оклюзивные сосудистые осложнения в основном связаны с нарушением целостности АСБ, которое на поздних стадиях развития атеросклероза тесно связано с прогрессированием воспаления [9]. На сегодняшний день актуальным является изучение особенностей ассоциации ультразвуковых, гемодинамических и биохимических показателей атеросклероза сонных и коронарных артерий у больных ИБС для персонализации и с целью повышения эффективности лечебно-профилактических мероприятий у полиморбидных пациентов кардиологического профиля.

Цель исследования – изучить особенности атеросклеротических изменений сонных артерий у больных ИБС, перенесших чрескожную транслюминальную коронарную ангиопластику (ЧТКА), и их взаимосвязь с биохимическими и гемодинамическими маркерами атеросклероза.

Материал и методы

На базе клиники ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск (ФИЦ ФТМ) проведено обследование и лечение 53 пациентов с ИБС (20 мужчин, 33 женщины), их возраст составил от 36 до 83 лет ($64,73 \pm 1,66$ года). Исследование проводилось в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Все пациенты давали письменное информированное согласие на включение в исследование. Диагноз ИБС был верифицирован врачом-терапевтом или кардиологом до поступления в клинику ФИЦ ФТМ на лечение и реабилитацию, либо врачом-терапевтом клиники ФИЦ ФТМ в соответствии с Клиническими рекомендациями МЗ РФ «Стабильная ишемическая болезнь сердца» (2020 г.). Часть пациентов на реабилитацию поступали после ЧТКА со стентированием коронарных артерий или с диагнозом

«ИБС: стенокардия напряжения 1–3-го функционального класса без оперативных вмешательств на коронарных артериях в анамнезе».

В сыворотке крови, взятой в утренние часы натощак, определяли параметры липидного спектра крови: содержание общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов низкой (ХС ЛПНП) и высокой (ХС ЛПВП) плотности, триглицеридов, а также сывороточных маркеров системного воспаления (С-реактивный белок (СРБ), фибриноген, скорость оседания эритроцитов (СОЭ)). Измерения проводились на биохимическом анализаторе «Konelab 30i» (Thermo Clinical Labsystems, Финляндия). Гиперхолестеринемия определяли при повышении содержания общего ХС в сыворотке крови более 5 ммоль/л, увеличение концентрации ХС ЛПНП и триглицеридов при значении более 3 и 1,7 ммоль/л соответственно, снижение уровня ХС ЛПВП – при величине менее 0,9 ммоль/л. Повышенным считалось содержание СРБ более 5,0 мг/л, фибриногена – более 4,0 г/л, СОЭ – более 10 мм/ч. Проводилось дуплексное сканирование сосудов шеи (Vivid E9, GE, США) с определением диаметра и пиковой систолической скорости кровотока общих, внутренних и наружных сонных артерий, позвоночных артерий, толщины комплекса «интима-медиа», извитости артерий, процента стеноза брахиоцефальных артерий.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$. Связь между различными признаками в исследуемой выборке определялась с помощью корреляционного ана-

лиза величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

Результаты и их обсуждение

Для проведения сравнительного анализа выраженности атеросклероза сонных артерий в зависимости от наличия в анамнезе ЧТКА коронарных артерий пациенты были разделены на две группы: больные ИБС с проведенной в анамнезе ЧТКА со стентированием (22 человека, средний возраст $68,8 \pm 2,29$ года) и без него (31 обследованный, средний возраст $62,4 \pm 3,17$ года). Установлено значимое различие выраженности стеноза сонных артерий: у пациентов с проведенным в анамнезе оперативным вмешательством на коронарных артериях оно было более выраженным ($42,8 \pm 4,9$ %), чем у больных со стабильной ИБС без ЧТКА со стентированием ($25,5 \pm 4,65$ %) (табл. 1).

В группе пациентов с ИБС с проведенным в анамнезе ЧТКА со стентированием выявлены значимые ($p < 0,05$) корреляционные связи между скоростью кровотока по наружной сонной артерии справа и уровнем ОХС и ХС ЛПНП крови ($r = 0,54$), между диаметром наружной сонной артерии слева и содержанием СРБ ($r = 0,73$), между скоростью кровотока по внутренней сонной артерии справа и СОЭ ($r = 0,48$). В группе пациентов с ИБС без проведения в анамнезе ЧТКА со стентированием обнаружены значимые ($p < 0,05$) корреляционные связи между толщиной комплекса «интима-медиа» общей сонной артерии слева и справа и СОЭ ($r = 0,50$ и $0,51$ соответственно), между выраженностью стеноза сонных артерий и СОЭ ($r = 0,48$). Полученные результаты свидетельствуют о наличии взаимосвязи эхоско-

Таблица 1. Сравнительные данные дуплексного сканирования сонных артерий у больных ИБС в группах с проведенным в анамнезе ЧТКА и без оперативного вмешательства

Table 1. Comparative data of duplex scanning of the carotid arteries in patients with coronary artery disease in groups with a history of PTCA and without surgical event

Показатель УДС	Больные ИБС с ЧТКА в анамнезе	Больные ИБС без ЧТКА в анамнезе
Толщина комплекса «интима-медиа» общей сонной артерии, мм:		
правой	$1,23 \pm 0,05$	$1,19 \pm 0,03$
левой	$1,27 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,02$
Степень стеноза сонных артерий, %	$42,8 \pm 4,9$	$25,5 \pm 4,65^*$
Скорость кровотока по внутренней сонной артерии, см/с:		
правой	$78,2 \pm 4,88$	$49,4 \pm 4,46$
левой	$83,6 \pm 5,98$	$53,3 \pm 3,97$

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы больных ИБС с ЧТКА в анамнезе статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 2. Сравнительные данные лабораторных показателей в группах обследованных в зависимости от наличия АСБ в сонных артериях**Table 2.** Comparative data of laboratory parameters in the surveyed groups depending on the presence of an atherosclerotic plaque in the carotid arteries

Показатель	Больные ИБС с АСБ в сонных артериях	Больные ИБС без АСБ в сонных артериях
Содержание фибриногена, г/л	3,02 ± 0,44	2,8 ± 0,21
Содержание СРБ, мг/л	8,4 ± 3,43	4,98 ± 3,56
СОЭ, мм/ч	22,6 ± 2,43*	14,6 ± 2,89*

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы больных ИБС с АСБ в сонных артериях статистически значимо при $p < 0,05$.

пических признаков ремоделирования сонных артерий под влиянием атеросклероза (повышение жесткости артерии, изменение ее диаметра, уменьшение просвета, изменение скоростных показателей кровотока) с маркерами дислипидемии и воспаления.

Для анализа взаимосвязи выраженности атеросклеротического изменения сонных артерий с особенностями лабораторных маркеров воспаления и дислипидемии пациенты были разделены на две подгруппы: с наличием (36 человек, средний возраст $70,05 \pm 1,34$ года) и отсутствием сформированной атеросклеротической бляшки (АСБ) в сонных артериях (17 обследованных, средний возраст $53,47 \pm 2,83$ года). Концентрация фибриногена и СРБ была выше у пациентов с АСБ в сонных артериях, чем у больных с утолщением комплекса «интима-медиа» без образования АСБ, на 9,0 и 68,1 % соответственно, СОЭ – на 54,2 % (табл. 2).

В подгруппе пациентов с АСБ в сонных артериях выявлены значимые ($p < 0,05$) корреляционные связи между уровнем СРБ и выраженностью атеросклеротического стенозирования внутренней сонной артерии справа ($r = 0,50$) и слева ($r = 0,45$), общей сонной артерии слева ($r = 0,65$), нисходящей сонной артерии слева ($r = 0,65$); между уровнем ОХС и ХС ЛПНП, триглицеридов и диаметром внутренней сонной артерии слева (соответственно $r = -0,37$, $r = -0,37$, $r = -0,35$). Это свидетельствует о снижении эластичности артерий при повышении содержания проатерогенных липидов крови.

На сегодняшний день ЧТКА является одним из эффективных методов лечения ИБС. А стенотические изменения сосуда в области стентирования существенно влияют на отдаленный прогноз лечения [10]. Воспалительные процессы в АСБ увеличивают возможность формирования риска осложнения у таких больных. Само стентирование является фактором, вызывающим воспалительные реакции в сосудистой стенке [11], и

может влиять на отдаленный прогноз атеросклероза как системного заболевания и способствовать формированию стенозов в артериях другой локализации. В исследованиях осуществляется поиск и определение биомаркеров, ассоциированных с повышенным риском ИБС и развитием острого коронарного синдрома, к ним относятся биомаркеры эндотелиальной дисфункции (молекулы адгезии, эндотелин, ангиотензин II и др.), нарушения гемостаза (фактор Виллебранда, фибриноген и др.), редокс-нарушений, воспаления и деструкции (СРБ и др.). Так как на начальном этапе развития АСБ важную роль играют эндотелиальная дисфункция и окислительные изменения, а на поздних стадиях развития АСБ ярко выражена активность воспалительно-деструктивных процессов, при полифокальном атеросклерозе у пациентов целесообразно проводить наиболее комплексную диагностику заболевания [12, 13]. Особое место в ряду воспалительных биомаркеров занимает СРБ, который является белком острой фазы воспаления, и у кардиохирургических больных его исходно повышенный уровень связан с риском ранних отсроченных осложнений после операции [9, 14].

Таким образом, тесная взаимосвязанность процессов нарушения липидного обмена, системного воспаления, эндотелиальной дисфункции с повреждением стенки сосуда и последующим образованием АСБ делает необходимым мультидисциплинарный подход с вовлечением различных специалистов для выявления лабораторных маркеров атеросклероза и применением ультразвуковой оценки атеросклеротического изменения сонных артерий у больных с коморбидной патологией, в том числе с ИБС [15]. Такой подход является эффективной и безопасной тактикой для диагностики, определения оптимальной стратегии и этапности лечения, особенно при прогрессировании атеросклероза, требующего включения в комплекс лечебных мероприятий

хирургических инвазивных методов восстановления проходимости артерий.

Заключение

Установлена зависимость выраженности атеросклеротического изменения сонных артерий от показателей системного воспаления: СРБ, СОЭ и фибриногена. Выявлена большая выраженность атеросклеротического стенозирования сонных артерий у больных ИБС с проведенной ЧТКА со стентированием коронарных артерий по сравнению с пациентами без такого вмешательства. Полученные данные указывают на необходимость применения УЗИ сосудов для ранней диагностики мультифокального атеросклероза и обосновывают более активную тактику лечения пациентов для профилактики сердечно-сосудистой полиморбидности.

Список литературы / References

1. Общероссийская общественная организация Ассоциация врачей общей практики (семейных врачей). Секция «Сочетанные патологии». Коморбидная патология в клинической практике: Клинические рекомендации. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2017; 16 (6): 5–56. doi: 10.15829/1728-8800-2017-6-5-56
2. Шишкова В.Н., Капустина Л.А. Проблемы коморбидного пациента: как выбрать правильный статин. *Эффектив. фармакотерапия*. 2017; (17): 14–23.
3. Alekhan B.G., Pokrovsky A.V., Karapetyan N.G., Revishvili A.Sh. Multidisciplinary approach in determining the frequency of detection of coronary heart disease and treatment strategies in patients with aortic and peripheral artery pathology. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2019; 24 (8): 8–16. doi: 10.15829/1560-4071-2019-8-8-16
4. Нургазизова А.К. Происхождение, развитие и современная трактовка понятий «коморбидность» и «полиморбидность». *Казан. мед. ж.* 2014; 95 (2): 292–296.
5. Nurgazizova A.K. Origin, development and modern interpretation of the concepts of «comorbidity» and «polymorbidity». *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*. 2014; 95 (2): 292–296. [In Russian].
6. Шукуров Ф.Б., Булгакова Е.С., Шапиева А.Н., Руденко Б.А., Творогова Т.В., Шаноян А.С., Суворов А.Ю., Фещенко Д.А., Чигидинова Д.С., Васильев Д.К., Концевая А.В., Драпкина О.М. Динамика уровня артериального давления в течение 12 месяцев после каротидного стентирования у пациентов с стенозирующим поражением сонных артерий. *Рос. кардиол. ж.* 2019; 24 (8): 17–21. doi: 10.15829/1560-4071-2019-8-17-21
7. Shukurov F.B., Bulgakova E.S., Shapieva A.N., Rudenko B.A., Tvorogova T.V., Shanoyan A.S., Suvorov A.Yu., Feshchenko D.A., Chigidinova D.S., Vasiliev D.K., Kontsevaya A.V., Drapkina O.M. Dynamics of blood pressure level during 12 months after carotid stenting in patients with stenosing lesions of the carotid arteries. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2019; 24 (8): 17–21. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2019-8-17-21
8. Гаврилова Н.Е., Метельская В.А., Яровая Е.Б., Бойцов С.А. Роль дуплексного сканирования сонных артерий в выявлении коронарного атеросклероза и определении степени его выраженности. *Рос. кардиол. ж.* 2014; (4): 108–112. doi: 10.15829/1560-4071-2014-4-108-112
9. Gavrilova N.E., Metelskaya V.A., Yarovaya E.B., Boitsov S.A. The role of duplex scanning of the carotid arteries in the detection of coronary atherosclerosis and determining the degree of its severity. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2014; (4): 108–112. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2014-4-108-112
10. Зайцев Д.Е., Лепехина А.С., Труфанов Г.Е. Ультразвуковая семиотика признаков дестабилизации атеросклеротических бляшек сонных артерий. *Рос. кардиол. ж.* 2019; 24 (12): 70–75. doi: 10.15829/1560-4071-2019-12-70-75
11. Zaitsev D.E., Lepekhina A.S., Trufanov G.E. Ultrasound semiotics of signs of destabilization of atherosclerotic plaques of the carotid arteries. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2019; 24 (12): 70–75. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2019-12-70-75
12. Рагино Ю.И., Волков А.М., Чернявский А.М. Стадии развития атеросклеротического очага и типы нестабильных бляшек – патофизиологическая и гистологическая характеристика. *Рос. кардиол. ж.* 2013; (5): 88–96.

Ragino Yu.I., Volkov A.M., Chernyavsky A.M. Stages of development of the atherosclerotic focus and types of unstable plaques-pathophysiological and histological characteristics. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2013; (5): 88–96. [In Russian].

9. Рагино Ю.И. Нестабильная атеросклеротическая бляшка и ее лабораторные и биохимические маркеры. Новосибирск: Наука, 2019. 120 с.

Ragino Yu.I. Unstable atherosclerotic plaque and its laboratory and biochemical markers. Novosibirsk: Nauka, 2019. 120 p. [In Russian].

10. Шальнев В.И. Острый коронарный синдром: как снизить остаточный воспалительный риск? *Рос. кардиол. ж.* 2020; 25 (2): 113–118. doi: 10.15829/1560-4071-2020-2-3720

Shalnev V.I. Acute coronary syndrome: how to reduce residual inflammatory risk? *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2020; 25 (2): 113–118. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2020-2-3720

11. Богатырева К.Б., Азова М.М., Агаджанян А.В., Цховребова Л.В., Аит А.А., Шугуев З.Х. Ассоциация полиморфизма гена *ITGB3* с развитием атеросклероза и ин-стент рестеноза коронарных артерий у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2018; 4 (4): 3–9. doi: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-1

Bogatyрева K.B., Azova M.M., Aghajanyan A.V., Tskhovrebova L.V., Ait A.A., Shuguev Z.Kh. Association of polymorphism of the *ITGB3* gene with the development of atherosclerosis and in-stent restenosis of the coronary arteries in patients with stable ischemic heart disease. *Nauchnyye rezul'taty biomeditsinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine*. 2018; 4 (4): 3–9. [In Russian]. doi: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-1

12. Yonggang M., Yabluchanskiy A., Hall M.E., Lindsey M.L. Using plasma matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 to predict future cardiovascular events in subjects with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014; 232 (1): 231–233. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.013

13. Стахнева Е.М., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Каменская О.В., Садовский Е.В., Кургузов А.В., Чернявский А.М., Рагино Ю.И. Оценка окислительного стресса и степени антиоксидантной способности у пациентов с коронарным атеросклерозом. *Молекул. мед.* 2016; 14 (2): 56–59.

Stakhneva E.M., Kashtanova E.V., Polonskaya Ya.V., Kamenskaya O.V., Sadovsky E.V., Kurguzov A.V., Chernyavsky A.M., Ragino Yu.I. Evaluation of oxidative stress and antioxidant capacity in patients with coronary atherosclerosis. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*. 2016; 14 (2): 56–59. [In Russian].

14. Corrado E., Rizzo M., Coppola G., Fattouch K., Novo G., Marturana I., Ferrara F., Novo S. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 2010; 17 (1): 1–11. doi: 10.5551/jat.2600

15. Евразийская ассоциация кардиологов. Национальное общество по изучению атеросклероза (НОА). Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации, VII пересмотр. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2020; 38 (1): 7–40. doi: 10.34687/2219-8202.JAD.2020.01.0002

Eurasian Association of Cardiologists. National Society for the Study of Atherosclerosis (NOA). Diagnosis and correction of lipid metabolism disorders for the prevention and treatment of atherosclerosis. Russian recommendations, VII revision. *Ateroskleroz i dislipidemii = The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias*. 2020; 38 (1): 7–40. [In Russian]. doi: 10.34687/2219-8202.JAD.2020.01.0002

Сведения об авторах:

Владимир Яковлевич Поляков, д.м.н., ORCID: 0000-0002-9606-2331, e-mail: vpolyakov15@mail.ru

Анастасия Алексеевна Старичкова, e-mail: clinic@frcftm.ru

Юрий Алексеевич Николаев, д.м.н., ORCID: 0000-0002-1690-6080, e-mail: nicol@centercem.ru

Ольга Владимировна Сипполайнен, e-mail: clinic@frcftm.ru

Евгения Викторовна Севостьянова, к.м.н., ORCID: 0000-0003-1132-3801 e-mail: luck.nsk@rambler.ru

Information about the authors:

Vladimir Ya. Polyakov, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9606-2331, e-mail: vpolyakov15@mail.ru

Anastasia A. Starichkova, e-mail: clinic@frcftm.ru

Yuri A. Nikolaev, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1690-6080, e-mail: nicol@centercem.ru,

Olga V. Sippolaynen, e-mail: clinic@frcftm.ru

Evgeniya V. Sevostyanova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-1132-3801, e-mail: luck.nsk@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.05.2021

После доработки 21.06.2021

Принята к публикации 16.07.2021

Received 18.05.2021

Revision received 21.06.2021

Accepted 16.07.2021

Одонтогенный медиастинит: опыт интенсивной терапии (клиническое наблюдение)

П.Г. Сысолятин¹, А.Н. Шмаков^{1,2}, М.Е. Иванцов¹, Н.Л. Елизарьева^{1,2}, В.Н. Кохно¹,
Е.И. Стрельцова^{1,2}, А.Н. Колосов², Е.М. Локтин¹, С.М. Иванцов¹

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, Новосибирск, Красный просп., 52

² Государственная новосибирская областная клиническая больница
630087, Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 130

Резюме

Медиастиниты как осложнения травм и перфораций пищевода плохо управляемы и характеризуются высокой летальностью, но клинические характеристики и терапевтическая управляемость контактных одонтогенных медиастинитов недостаточно освещены в медицинской литературе. Цель исследования – клиническая характеристика и анализ результатов лечения одонтогенного гнойного медиастинита по данным пилотного моноцентрового обсервационного исследования. **Материал и методы.** Проанализированы результаты лечения пациентов с одонтогенными медиастинитами в группах: панмедиастинит (8 участников) и задний верхний медиастинит (12 участников). Сравнивали температуру тела, содержание С-реактивного белка, лейкоцитов, тромбоцитов, креатинина, суточный и кумулятивный гидроионный баланс, воспроизводимые в стационарах любых уровней оснащения, с использованием критериев непараметрической статистики для исключения ложноположительных результатов. **Результаты.** У 65 % больных при бактериологическом обследовании получены возбудители инфекционного процесса. Летальность составила 5 %, продемонстрирована управляемость процесса в условиях описанной технологии анестезиологического пособия и интенсивной терапии, показана опасность инфузионной перегрузки интерстиция легких.

Ключевые слова: одонтогенный медиастинит, этиологические факторы, интенсивная терапия.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Шмаков А.Н., e-mail: alsmakodav@yandex.ru

Для цитирования: Сысолятин П.Г., Шмаков А.Н., Иванцов М.Е., Елизарьева Н.Л., Кохно В.Н., Стрельцова Е.И., Колосов А.Н., Локтин Е.М., Иванцов С.М. Одонтогенный медиастинит: опыт интенсивной терапии (клиническое наблюдение). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 89–95. doi: 10.18699/SSMJ20210512

Odontogenic mediastinitis: intensive therapy experience (clinical observation)

P.G. Sysolyatin¹, A.N. Shmakov^{1,2}, M.E. Ivantsov¹, N.L. Elizar'eva^{1,2}, V.N. Kokhno¹,
E.I. Streltsova^{1,2}, A.N. Kolosov², E.M. Loktin¹, S.M. Ivantsov¹

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
63009, Novosibirsk, Krasnyj av., 52

² State Novosibirsk Regional Clinical Hospital
630087, Novosibirsk, Nemirovich-Danchenko str., 130

Abstract

Mediastinitis as complications of traumas and esophagus perforations are ill-controlled and characterized with high mortality. Yet clinical characteristics and therapeutic controllability of contact odontogenic mediastinitis are not covered enough in medical literature. Aim of the study was to investigate clinical characteristics and to analyze treatment results of odontogenic purulent mediastinitis according to data of pilot monocenter observational study. **Material and methods.** The results of treatment of the patients with odontogenic mediastinitis were analyzed in groups: panmediastinitis

(8 participants) and posterior upper mediastinitis (12 participants). The following indexes were compared: body temperature, content of C-reactive protein, leucocytes, thrombocytes, creatinine, 24-hour and cumulative fluid electrolyte balance reproduced in hospitals of any equipment levels with using of criteria of nonparametric statistics for excluding of false positive results. **Results.** Causative agents of the infectious process were found in 65 % of patients in bacteriological study. The mortality was 5 %; the process controllability in conditions of described techniques of anesthesiology and intensive therapy has been shown, the danger of infusive overload of the interstitium of the lungs has been demonstrated.

Key words: odontogenic mediastinitis, etiological factors, intensive therapy.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Shmakov A.N., e-mail: alsmakodav@yandex.ru

Citation: Sysolyatin P.G., Shmakov A.N., Ivantsov M.E., Elizar'eva N.L., Kohno V.N., Streltsova E.I., Kolosov A.N., Loktin E.M., Ivantsov S.M. Odontogenic mediastinitis: intensive therapy experience (clinical observation). *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 89–95. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210512

Введение

Несмотря на известные успехи современной стоматологии, в клинической практике по-прежнему приходится встречаться с тяжелыми одонтогенными воспалительными процессами лица и шеи, которые нередко имеют тенденцию к прогрессирующему течению с развитием жизненно опасных септических осложнений. Среди этих осложнений одно из ведущих мест занимают контактные одонтогенные медиастиниты, число которых, по сообщениям многих исследователей, не имеет тенденции к снижению [1–6]. Более того, анализ большого клинического материала показывает, что число больных с контактным одонтогенным медиастинитом неуклонно растет и составляет 0,63 % среди пациентов с острыми воспалительными заболеваниями лица и шеи [7].

Наиболее частой причиной развития контактного одонтогенного медиастинита являются флегмоны дна полости рта и глотки, которые приводят к формированию глубоких флегмон шеи с последующим распространением воспалительного процесса на средостение. Потенциально существуют три основных пути распространения флегмон шеи в средостение: претрахеальный, боковой фарингеальный по сосудисто-нервному пучку шеи и ретрофарингеальный. В зависимости от пути распространения инфекции возникает передний или задний медиастинит, а также возможно проникновение инфекции по нескольким клетчаточно-фасциальным пространствам с развитием тотального контактного медиастинита. Частое развитие одонтогенного медиастинита по типу гнилостно-некротического процесса (нисходящего шейного некротизирующего фасциита) приводит к значительной летальности больных, которая, по данным различных авторов, составляет от 7 до 40 % [4, 8, 9]. Большинство исследователей терапевтических и хирургических аспектов

лечения медиастинитов оценивают летальность в 23–68 %, но без указания причины медиастинита.

По данным некоторых авторов, одонтогенные медиастиниты в общей структуре причин медиастинитов составляют около 60 % [2]. Другие авторы ставят одонтогенные медиастиниты на второе место в рейтинге причин, отдавая приоритет травмам и перфорациям пищевода [1]. По нашим данным, в 2015–2016 гг. число пациентов с глубокими одонтогенными флегмонами, поступивших в Новосибирскую областную клиническую больницу, составило 38 человек (1,5 % от общего числа пролеченных больных хирургического профиля). Медиастиниты одонтогенного генеза встречаются практически с такой же частотой, являясь осложнениями одонтогенных флегмон или развиваясь раньше формирования флегмон.

Цель работы – клиническая характеристика и анализ результатов лечения одонтогенного гнойного медиастинита.

Материал и методы

В ходе проспективного обсервационного исследования проанализированы результаты лечения 20 человек, находившихся в Новосибирской областной клинической больнице в 2015–2016 гг. по поводу одонтогенных медиастинитов. Подавляющее большинство пациентов (85 %) составили мужчины. Лишь у троих участников (15 %) возраст превышал 60 лет. Медиана возраста 39 лет, нижний квартиль 32 года, верхний квартиль 57 лет. Использовали классификацию медиастинитов по Слесаренко [10]. У всех больных с контактным одонтогенным медиастинитом воспалительный процесс локализовался в области дна полости рта или окологлоточного пространства и распространялся на шею. У 11 пациентов он протекал по типу гнилостно-некротической флегмоны. Хирургическое вмешательство включало санацию первичного очага, вскрытие глубо-

ких клетчаточных пространств шеи с ревизией путей распространения инфекции, дренирование средостения. Вскрытие и дренирование средостения проводилось внеплевральными доступами путем боковой чресшейной медиастиномии по В.И. Разумовскому или чрезбрюшной трансдиафрагмальной медиастиномии по Б.С. Розанову.

Генеральная совокупность разделена на две группы в зависимости от распространенности процесса: в группу 1 вошли 8 пациентов с поражением как верхних, так и нижних отделов переднего и заднего средостения (панмедиастинит); в группе 2 (12 человек) отмечены только задние верхние медиастиниты. Умер один больной из группы 1, поступивший в терминальном состоянии вследствие рефрактерного септического шока (5 % от численности выборки, или 12,5 % от численности группы 1).

Тактика анестезиологического обеспечения и содержание интенсивной терапии у всех больных были идентичны. После двухчасовой инфузионной, инотропной подготовки в операционном зале вводили атропин, промедол (0,5 мг/кг) и диазепам (10 мг) в сочетании с местной анестезией ротоглотки, носовых ходов спреем лидокаина и выполняли фиброоптическую назотрахеальную интубацию. Индукцию анестезии обеспечивали введением тиопентала натрия от 5 до 8 мг/кг идеальной массы тела, для поддержания анестезии использовали фентанил болюсами от 2 до 3 мкг/кг идеальной массы тела в сочетании с низкотовочной анестезией севофлюраном 2,8 объемных %. Осложнений и непредвиденных событий в ходе анестезии не отмечали.

В послеоперационном периоде искусственная вентиляция легких (ИВЛ) в режиме «SIMV» продолжалась до момента исключения риска развития острого респираторного дистресс-синдрома, длительность ИВЛ была вариabельной. Интенсивная терапия включала: послеоперационное обезболивание (кеторолак, по запросу пациентов промедол); профилактику тромбоэмболических осложнений (надропарин от 2850 до 5700 ед. «анти-Ха» в сутки в зависимости от массы пациента); в первые сутки инотропную поддержку (добутамин). Вазопрессорная поддержка (нор-адреналин) потребовалась двум пациентам из группы 1 и одному из группы 2 (различие незначимое, $p = 0,537$; двусторонний точный критерий Фишера). Инфузионная регидратация обеспечивалась полиионными изоосмолярными солевыми растворами с ионами резервной щелочности. Поскольку исходный уровень прокальцитонина при полуколичественном тестировании у всех участников составлял ≥ 10 нмоль/мл, других подтверждений наличия сепсиса не требовалось

[11]. Некоторые аспекты формирования системного воспалительного ответа у больных в критическом состоянии и антибактериальную терапию начинали по принципу деэскалации в соответствии с Национальными рекомендациями [12], с переходом через 48 часов на целенаправленную терапию после подтверждения этиологии у 13 человек (65 %): 6 – из группы 1, 7 – из группы 2 [13]. Нутритивная поддержка во всех случаях началась через 6–12 часов послеоперационного периода стандартными смесями через назогастральные зонды с постепенным переводом на сиппинг.

Этапы регистрации данных для выявления динамики содержания С-реактивного белка (СРБ), тромбоцитов и лейкоцитов в периферической крови соответствуют временным интервалам: этап 1 – перед операцией, этап 2 – через 48 часов после операции. Для показателей, представленных при однократном определении (температура, содержание креатинина), выбраны максимальные значения, отмеченные в интервале 2–48 часов послеоперационного периода. Кроме перечисленных показателей, сравнивали водный баланс суточный (за первые сутки послеоперационного периода) и кумулятивный (за 5 суток). Для микробиологического исследования интраоперационно забирали содержимое из наиболее значимого гнойно-воспалительного очага.

Для математического анализа данных использовали только непараметрические критерии: Крускала – Уоллиса и Данна для множественных сравнений, Уилкоксона для попарных сравнений типа «до – после», критерий Манна – Уитни для парных внутригрупповых сравнений, коэффициент корреляции Спирмена для рангового корреляционного анализа. Поскольку чувствительность перечисленных критериев не зависит от характера распределения данных в вариационных рядах, проверка на нормальность распределений не требовалась. Данные в таблицах представлены в виде медианы (Me) [минимум (min); нижний квартиль (Q25); верхний квартиль (Q75); максимум (max)].

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 приведено распределение участников по антропометрическим данным, длительности операций, продолжительности искусственной вентиляции легких и пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Обнаружили только одно различие во временных характеристиках: больные с панмедиастинитом (группа 1) существенно дольше нуждались в респираторной поддержке, чем пациенты из группы 2, что объясняется влиянием распространенного воспалительного отека на статический легочный

Таблица 1. Распределение участников по антропометрическим данным, длительности операций и интенсивной терапии

Table 1. The distribution of participants according to anthropometric data, the duration of operations and intensive care, Me [min; Q25; Q75; max]

Показатель	Группа		Вся выборка (n = 20)
	1 (n = 8)	2 (n = 12)	
Возраст, лет	43 [23; 32; 52; 67]	37 [22; 33; 52; 81]	39 [22; 27; 51; 81]
Масса тела, кг	71 [51; 63; 88; 130]	78 [50; 65; 87; 112]	75 [50; 64; 88; 130]
Длительность операции, мин	113 [50; 70; 103; 250]	113 [45; 69; 110; 190]	112 [45; 69; 105; 250]
Длительность ИВЛ, ч	92 [48; 62; 68; 720]	48 [19; 24; 56; 148]*	48 [19; 26; 63; 720]
Длительность пребывания в ОРИТ, сут	11 [5; 7; 12; 121]	10 [2; 5; 14; 22]	10 [2; 5; 16; 121]

Примечание. * — Отличие от величины соответствующего показателя группы 1 статистически значимо при $p < 0,05$.

комплаинс, инспираторно-экспираторные градиенты давлений в дыхательных путях, замедление лимфатического дренирования.

Из табл. 2 видно, что высеваемость возбудителей (65 %) превышала обычно приводимые значения для сепсиса в целом (38–41 % по данным различных авторов) [14, 15]. В табл. 3 сгруппированы результаты определения показателей, доступных и рутинно используемых во всех стационарах, что может представлять ценность при обобщении больших массивов данных. Более выраженный объем воспалительного поражения ассоциировался с повышением содержания креатинина в сыворотке, повышением температуры и задержке перелитой жидкости ко вторым суткам послеоперационного периода. Эти различия, не достигая обычно принимаемого уровня статистической значимости вследствие эффектов малой выборки (для температуры тела и креатинина $p = 0,08$; для водного баланса за первые сутки $p = 0,05$), должны приниматься во внимание при лечении.

При корреляционных сопоставлениях значимые ранговые корреляции найдены в двух парах: между временем пребывания в отделении реани-

мации и интенсивной терапии, с одной стороны, и продолжительностью ИВЛ и водным балансом за первые 24 часа послеоперационного периода – с другой (соответственно $r = 0,463$, $R^2 = 0,214$, $p = 0,041$ и $r = 0,452$, $R^2 = 0,204$, $p = 0,041$). Корреляционных связей между кумулятивным водным балансом за 5 суток и продолжительностью лечения, а также другими показателями не обнаружено.

Корреляционная связь в первой паре признаков естественна, поскольку именно невозможность гарантировать надежное функционирование системы внешнего дыхания препятствует переводам пациентов из ОРИТ. Прямая связь продолжительности пребывания пациентов в ОРИТ с положительным водным балансом за первые сутки лечения не столь очевидна, косвенно указывает на облегченное формирование пула свободной внесосудистой легочной воды при воспалении клетчатки средостения и диктует необходимость расширенного изучения зависимости гипергидратации легочного интерстиция от объемов инфузии при медиастините. Похожая зависимость отмечена в небольшом исследовании, выполненном у больных с одонтогенными флегмонами,

Таблица 2. Результаты бактериологических исследований

Table 2. The results of bacteriological studies in selected groups

Возбудитель	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 12)	Вся выборка
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	3	5
<i>Streptococcus viridans</i>	1	3	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	—	1
<i>Candida albicans</i>	—	1	1
<i>Streptococcus</i> + <i>Pseudomonas</i> + <i>Candida</i>	1	—	1
<i>Staphylococcus</i> + <i>Clebsiella pneumonia</i>	1	—	1
Всего	6	7	13

Таблица 3. Исследуемые показатели

Table 3. The studied parameters, Me [min; Q25; Q75; max]

Показатель	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 12)	Вся выборка
Температура тела, °С	38 [37,3; 37,8; 38,5; 39]	37,5 [37,1; 37,3; 38; 39,6]	37,7 [37,1; 37,5; 38; 39,6]
Содержание креатинина в плазме, мкмоль/л	105 [71; 89; 115; 247]	81 [57; 68; 95; 151]	89 [57; 80; 98; 247]
Содержание СРБ, мг/л:			
этап 1	162 [100; 145; 218; 337]	194 [95; 168; 212; 289]	176 [95; 157; 215; 337]
этап 2	80 [80; 80; 117; 280]	112 [80; 85; 122; 198]	107 [80; 83; 120; 280]
Содержание тромбоцитов, 10 ⁹ /л:			
этап 1	279 [126; 220; 289; 348]	204 [139; 189; 281; 395]	227 [126; 205; 284; 348]
этап 2	263 [200; 235; 297; 353]	233 [171; 210; 287; 328]	247 [171; 220; 290; 353]
Содержание лейкоцитов, 10 ⁹ /л:			
этап 1	17 [9,7; 15,6; 24,3; 33]	18,8 [12,1; 15,5; 21,6; 30,1]	18,7 [9,7; 15,6; 23,3; 33]
этап 2	12,6 [7,8; 11,7; 13,7; 15,4]	14,2 [9,7; 12,6; 15,7; 17,8]	13,9 [7,8; 12,2; 14,7; 17,8]
Водный баланс за 24 часа, % массы тела	3 [1; 2; 4; 7]	1 [– 1; 1; 3; 9]*	1,35 [– 1; 2; 8; 9]
Кумулятивный баланс за 5 суток, % массы тела	5,5 [– 3; 4; 9; 14]	5 [– 5; 3; 9; 10]	5 [– 5; 4; 9; 14]

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя группы 1 статистически значимо при $p < 0,05$.

не осложненными медиастинитом. Для этой патологии, как и для пациентов с медиастинитами, кумулятивный пятисуточный баланс не являлся фактором, влияющим на продолжительность интенсивной терапии [6]. Логично предположить, что пациентам с одонтогенными медиастинитами после стабилизации гемодинамики следует быстро снизить темп инфузии, добиваясь нулевого водного баланса к исходу первых суток лечения, что отличается от обычно предлагаемой при лечении сепсиса тактики постепенного снижения кумулятивного баланса [16].

При изучении динамики признаков по принципу «до – после» отметили отчетливую динамику нормализации содержания СРБ ($p < 0,02$) и лейкоцитов ($p < 0,02$). Это, несомненно, связано с эффективностью антибактериальной терапии, которая зависела от высокой высеваемости флоры из гнойно-воспалительных очагов (65 %), причем можно было не сомневаться, что выделенный микроорганизм является возбудителем септического процесса, поскольку получен из стерильного (в норме) локуса.

Закключение

В представленной сплошной выборке за два года пациентов с одонтогенным медиастинитом заболевание продемонстрировало хорошую управляемость в условиях адекватной хирургической санации, дренирования и рациональной антибактериальной терапии, чему способствовала лучшая, чем обычно у септических больных, высеваемость возбудителя. Показано, что поддержание нулевого суточного водного баланса в первые сутки послеоперационного периода имеет большее значение, чем постепенное снижение этого соотношения для достижения кумулятивного баланса менее 10 % массы тела к пятым суткам инфузии.

Выводы

1. Контактные одонтогенные медиастиниты следует считать управляемой инфекционной патологией при условии своевременного начала хирургической коррекции и интенсивной терапии.

2. При инфузионной терапии пациентов с одонтогенным медиастинитом целесообразно добиваться нулевого водного баланса к исходу первых суток послеоперационного периода.

Список литературы / References

1. Доброквашин С.В., Сысоев П.Н., Демьянов С.Л. Хирургическое лечение больных с острым медиастинитом. *Практ. мед.* 2014; 81 (5): 47–49.

Dobrokvashin S.V., Sysoev P.N., Demyanov S.L. Surgical treatment of patients with acute mediastinitis. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*. 2014; 81 (5): 47–49. [In Russian].

2. Чикинев Ю.В., Дробязгин Е.А., Колесникова Т.С. Оптимизация диагностики и лечения больных вторичным острым медиастинитом различной этиологии. *Сиб. науч. мед. ж.* 2015; 35 (1): 76–79.

Chikinev Ju.V., Drobjazgin E.A., Kolesnikova T.S. Optimization of diagnosis and treatment of the patients with secondary acute mediastinitis of different etiology. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2015; 35 (1): 76–79. [In Russian].

3. Sumi Y. Descending necrotizing mediastinitis: 5 years of published data in Japan. *Acute Med. Surg.* 2014; 2 (1): 1–12. doi: 10.1002/ams2.56

4. Palma D.M., Giuliano S., Cracchiolo A.N., Falcone M., Ceccarelli G., Tetamo R., Venditti M. Clinical features and outcome of patients with descending necrotizing mediastinitis: prospective analysis of 34 cases. *Infection*. 2016; 44 (1): 77–84. doi:10.1007/s15010-015-0838-y

5. Cariati P., Monsalve-Iglesias F., Cabello-Serrano A., Valencia-Laseca A., Garcia-Medina B. Cervical necrotizing fasciitis and acute mediastinitis of odontogenic origin: A case series. *J. Clin. Exp. Dent.* 2017; 9 (1): 150–152. doi: 10.4317/jced.53009

6. Сысолятин П.Г., Шмаков А.Н., Иванцов М.Е., Кохно В.Н., Елизарьева Н.Л., Стрельцова Е.И., Локтин Е.М., Колосов А.Н., Ильин В.И. Особенности анестезиологического обеспечения и интенсивной терапии больных при хирургическом лечении одонтогенных флегмон дна полости рта. *Стоматология*. 2018; 97 (2): 37–40. doi: 10.17116/stomat201897237-40

Sysolyatin P.G., Shmakov A.N., Ivantsov M.E., Kokhno V.N., Elizar'eva N.L., Strel'tsova E.I., Loktin E.M., Kolosov A.N., Il'in V. General anesthesia and intensive care for patients surgically treated for deep neck odontogenic infections. *Stomatologiya = Stomatology*. 2018; 97 (2): 37–40. [In Russian]. doi: 10.17116/stomat201897237-40

7. Хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия. Национальное руководство. Ред. А.А. Кулаков, Т.Г. Робустова, А.И. Неробеев. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 928 с.

Surgical dentistry and maxillofacial surgery. National leadership. Eds. A.A. Kulakov, T.G. Robustova, A.I. Nerobeev. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. 928 p. [In Russian.]

8. Козлов В.А. Одонтогенный медиастенит. *Стоматология*. 2006; 85 (3): 30–34.

Kozlov V.A. Odontogenic mediastinitis. *Stomatologiya = Stomatology*. 2006; 85 (3): 30–34. [In Russian].

9. Kocher G.J., Hokschi B., Caversaccio M., Wiegand J., Schmid R.A. Diffuse descending necrotizing mediastinitis: surgical therapy and outcome in a single-centre series. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2012; 42 (4): 66–72. doi: 10.1093/ejcts/ezs385

10. Слесаренко С.С., Агапов В.В., Прелатов В.А. Медиастенит. М.: Медпрактика-М, 2005. 200 с.

Slesarenko S.S., Agapov V.V., Prelatov V.A. Mediastinitis. Moscow: Medpraktika-M, 2005. 200 p. [In Russian].

11. Устьянцева И.М., Хохлова О.И., Петухова О.В., Жевлакова Ю.А., Кравцова А.С., Агаджанян К.В. Некоторые аспекты формирования системного воспалительного ответа у больных в критическом состоянии. *Общ. реаниматол.* 2010; 6 (1): 56. doi: 10.15360/1813-9779-2010-1-56

Ustyantseva I.M., Khokhlova O.I., Petukhova O.V., Zhevlakova Yu.A., Kravtsova A.S., Agadzhanian K.V. Some aspects of formation of a systemic inflammatory response in critically ill patients. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*. 2010; 6 (1): 56. [In Russian]. doi: 10.15360/1813-9779-2010-1-56

12. Стратегия и тактика применения антимикробных средств в лечебных учреждениях России: Российские национальные рекомендации. Ред. В.С. Савельев, Б.Р. Гельфанд, С.В. Яковлев. М.: ООО «БОРГЕС», 2012. 92 с.

Strategy and tactics of the use of antimicrobial agents in Russian medical institutions: Russian national recommendations. Eds. V.S. Savel'ev, B.R. Gel'fand, S.V. Yakovlev. Moscow: BORGES, 2012. 92 p. [In Russian].

13. Мороз В.В., Голубев А.М. Сепсис: принципы диагностики. *Общ. реаниматол.* 2013; 9 (6): 5–7. doi: 10.15360/1813-9779-2013-6-5

Moroz V.V., Golubev A.M. Sepsis: principles of diagnosis. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*. 2013; 9 (6): 5–7. [In Russian]. doi: 10.15360/1813-9779-2013-6-5

14. Руднов В.А., Ложкин С.Н., Галеев Ф.С., Заболотских И.Б., Кон Е.М., Неймарк М.И., Челюк М.И., Голубцов В.В., Мартыненко В.А., Елизарьев А.Ю., Меркулов А.И., Николенко А.В., Антонов Ю.А., Федотова Ю.М., Кикомбан И.В., Калашникова Ю.С., Смычков В.И. Фармакоэпидемиологический анализ лечения сепсиса в отделениях реанимации и интенсивной терапии. *Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерапия*. 2003; 5 (2): 144–152.

Rudnov V.A., Lozhkin S.N., Galeev F.S., Zabolotskikh I.B., Kon E.M., Nejmark M.I., Cheljuk M.I., Golubtsov V.V., Martynenko V.A., Elizar'ev A.Ju., Merkulov A.I., Nikolenko A.V., Antonov Ju.A., Fedotova Ju.M., Kikomban I.V., Kalashnikova Ju.S., Smychkov V.I. Treatment of sepsis in intensive care units – pharmacoepidemiological study. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 5 (2): 144–152. [In Russian].

15. Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348 (16): 1546–1554. doi: 10.1056/nejmoa022139

16. Hoste E.A., Maitland K., Brudney C.S., Mehta R., Vincent J.L., Yates D., Kellum J.A., Mythen M.G., Shaw A.D., ADQI XII Investigators Group. Four phases of intravenous fluid therapy: a conceptual model. *Br. J. Anaesth.* 2014; 113 (5): 740–747. doi: 10.1093/bja/aeu300

Сведения об авторах

Павел Гаврилович Сысолятин, д.м.н., проф., ORCID: 000-0002-4045-2664, e-mail: Sysolyatinpg@mail.ru
Алексей Николаевич Шмаков, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-6041-7607, e-mail: shmakov1948@inbox.ru
Михаил Егорович Иванцов, к.м.н., ORCID: 0000-0001-7457-2202, e-mail: Ivancov_S@mail.ru
Наталья Львовна Елизарьева, д.м.н., ORCID: 0000-0002-0852-0372, e-mail: lisa.nataly@mail.ru
Владимир Николаевич Кохно, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-5965-2594, e-mail: kair2007@mail.ru
Елена Ивановна Стрельцова, к.м.н., ORCID: 0000-0001-9766-680X, e-mail: eistreltsova@mail.ru
Александр Николаевич Колосов, к.м.н., ORCID: 0000-0002-9322-3697, e-mail: kolosov123@yandex.ru
Евгений Михайлович Локтин, д.м.н., ORCID: 0000-0002-7370-6958, e-mail: 89137034075@mail.ru
Сергей Михайлович Иванцов, к.м.н., ORCID: 0000-0002-8715-0778, e-mail: Ivancov_S@mail.ru

Information about the authors.

Pavel G. Sysolyatin, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 000-0002-4045-2664, e-mail: Sysolyatinpg@mail.ru
Alexey N. Shmakov, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-6041-7607, e-mail: shmakov1948@inbox.ru
Mikhail E. Ivantsov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-7457-2202, e-mail: Ivancov_S@mail.ru
Natalia L. Elizarieva, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-0852-0372, e-mail: lisa.nataly@mail.ru
Vladimir N. Kokhno, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-5965-2594, e-mail: kair2007@mail.ru
Elena I. Streltsova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-9766-680X, e-mail: eistreltsova@mail.ru
Alexander N. Kolosov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9322-3697, e-mail: kolosov123@yandex.ru
Evgeny M. Loktin, doctor of medical science, ORCID: 0000-0002-7370-6958, e-mail: 89137034075@mail.ru
Sergey M. Ivantsov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-8715-0778, e-mail: Ivancov_S@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2021

После доработки 31.05.2021

Принята к публикации 09.07.2021

Received 19.05.2021

Revision received 31.05.2021

Accepted 09.07.2021

Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов как предикторы обострения при воспалительных заболеваниях кишечника

М.В. Кручинина^{1,2}, И.О. Светлова^{1,2}, А.В. Азгалдян¹, А.А. Громов¹, В.М. Генералов³, И.Н. Яковина⁴, А.А. Шестов⁵

¹ НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

² Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

³ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово

⁴ Новосибирский государственный технический университет 630073, г. Новосибирск, просп. Карла Маркса, 20

⁵ Пенсильванский университет США, 19104, г. Пенсильвания, Уолнат-стрит, 3101

Резюме

Цель работы – у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), обследованных в динамике, изучить электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов в качестве возможных предикторов обострения заболевания. **Материал и методы.** Выполнены обследования 23 пациентов с ВЗК (возраст $37,9 \pm 4,3$ года): первое – в стадию обострения, второе, через 6–12 месяцев, – в стадию ремиссии. Дополнительно обследовано 36 пациентов с ВЗК в стадии ремиссии для оценки предиктивных возможностей параметров эритроцитов с последующим мониторингом их состояния в течение 6–12 месяцев. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов исследованы методом диэлектрофореза. Статистическая обработка проведена с использованием системы методов машинного обучения – Random Forest, MATLAB (R2019a, MathWorks). **Результаты и их обсуждение.** Выявлены параметры эритроцитов, являющиеся предикторами обострения ВЗК: увеличение доли деформированных клеток ($p = 0,0001$), измененный характер поверхности эритроцитов ($p = 0,011$), повышенная электропроводность мембран ($p = 0,0019$), сниженный дипольный момент ($p = 0,0015$) и скорость поступательного движения эритроцитов к электродам ($p = 0,005$) (парный и непарный методы Volcano plot), сниженная амплитуда деформации на частоте 5×10^5 Гц ($p = 0,009$) и емкость мембран эритроцитов ($p = 0,029$) (непарный метод Volcano plot). Значимыми оказались показатели, связанные с изменением заряда эритроцитов, структурой их мембран и уровнем энергетического обмена. Установлена высокая диагностическая точность как предикторов следующих показателей: доля деформированных клеток (AUC 0,939), обобщенный показатель вязкости (AUC 0,932). Кластерный анализ значений параметров эритроцитов – предикторов обострения – позволил провести стратификацию риска развития обострения: при максимально измененной величине – развитие обострения через 2,5–4,5 месяца, при промежуточном уровне – через 4–6 месяцев, при минимальных изменениях – через 8–12 месяцев (предсказательная точность – 92 %). **Заключение.** Выявленные электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов следует рассматривать как перспективные предикторы развития обострения у пациентов с ВЗК.

Ключевые слова: электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов, предикторы, обострение, воспалительные заболевания кишечника.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках темы «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению» ГЗ № 0324-2018-0001, рег. № AAAA-A17-117112850280-2.

Автор для переписки: Кручинина М.В., e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Для цитирования: Кручинина М.В., Светлова И.О., Азгалдян А.В., Громов А.А., Генералов В.М., Яковина И.Н., Шестов А.А. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов как предикторы обострения при воспалительных заболеваниях кишечника. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 96–112. doi: 10.18699/SSMJ20210513

Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes as predictors of exacerbation in inflammatory bowel diseases

M.V. Kruchinina^{1,2}, I.O. Svetlova^{1,2}, A.V. Azgaldyan¹, A.A. Gromov¹, V.M. Generalov³, I.N. Yakovina⁴, A.A. Shestov⁵

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS 630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

² Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia 630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

³ State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor 630559, Koltsovo, Novosibirsk region

⁴ Novosibirsk State Technical University 630073, Novosibirsk, Karl Marx av., 20

⁵ University of Pennsylvania USA, PA 19104, Pennsylvania, Walnut str., 3101

Abstract

The aim of this work is to study the electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes for patients with inflammatory bowel diseases (IBD), examined in dynamics, as possible predictors of exacerbation of the disease. **Material and methods.** In dynamics, 23 patients with IBD (37.9 ± 4.3 years) were examined. The first examination was carried out in the stage of exacerbation, the second – after 6–12 months – in the stage of remission of IBD. Additionally, 36 patients with IBD in remission were examined to assess the predictive capabilities of erythrocyte parameters with subsequent monitoring of their condition for 6–12 months. The electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes were investigated by dielectrophoresis. Statistical processing was carried out using a system of machine learning methods – Random Forest, MATLAB (R2019a, MathWorks). **Results and discussion.** The parameters of erythrocytes, which are predictors of exacerbation of IBD, were revealed: an increase in the proportion of deformed cells ($p = 0.0001$); altered nature of the erythrocyte surface ($p = 0.011$); increased electrical conductivity of membranes ($p = 0.0019$); reduced dipole moment ($p = 0.0015$), the rate of directional movement of erythrocytes to the electrodes ($p = 0.005$) (paired and unpaired Volcano plot methods), reduced deformation amplitude at a frequency of 5×10^5 Hz ($p = 0.009$), capacity of erythrocyte membranes ($p = 0.029$) (unpaired Volcano plot method). Indicators associated with changes in the charge of cells, the structure of erythrocyte membranes and the level of energy metabolism of the cell turned out to be significant. A high diagnostic accuracy of these indicators was established as predictors: the proportion of deformed cells (AUC 0.939), a summarized viscosity index (AUC 0.932). Cluster analysis of the values of erythrocyte parameters – predictors of exacerbation made it possible to stratify the risk of exacerbation: at the most altered levels of parameters – the development of exacerbation after 2.5–4.5 months, intermediate levels – after 4–6 months, minimally changed – after 8–12 months (predictive accuracy – 92 %). **Conclusions.** The revealed electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes should be considered as promising predictors of exacerbation in patients with IBD.

Key words: electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes, predictors, exacerbation, inflammatory bowel disease.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the theme «Epidemiological monitoring of the state of health of the population and the study of molecular genetic and molecular biology mechanisms of the development of common therapeutic diseases in Siberia to improve approaches to their diagnosis, prevention and treatment» GZ No. 0324-2018-0001, Reg. No. AAAA-A17-117112850280-2.

Corresponding author: Kruchinina M.V., e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Citation: Kruchinina M.V., Svetlova I.O., Azgaldyan A.V., Gromov A.A., Generalov V.M., Yakovina I.N., Shestov A.A.: Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes as predictors of exacerbation in inflammatory bowel diseases. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 96–112. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210513

Введение

Нарастающая распространенность воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) в популяции, тяжелое осложненное течение у значительной части пациентов, существенно снижающее качество их жизни, большие материальные затраты на лечение и социальную поддержку определяют актуальность поиска новых диагностических подходов к данной патологии. Неясность этиологии язвенного колита (ЯК) и болезни Крона (БК), частое сходство их клинико-эндоскопических проявлений, отсутствие «золотого стандарта» диагностики, затрудняющего выбор прицельной терапии, настоятельно требуют повышения эффективности имеющихся в настоящее время диагностических технологий [1].

Значительные усилия направлены на поиск биомаркеров, которые могут быть использованы для выявления пациентов с высоким риском рецидива ВЗК, нуждающихся в более интенсивном наблюдении и терапии на ранних стадиях заболевания для предотвращения долгосрочных необратимых структурных повреждений. В качестве биомаркеров прогнозирования течения ВЗК рассматривают содержание С-реактивного белка [2], фекального кальпротектина, лактоферрина [3], сывороточного альбумина [4], антител к порину внешней мембраны (OmpC) [5], полиморфизм гена *NOD2*, ассоциированный со стриктурой кишки [6], с уровнем диагностической точности от 71,2 до 94,8 %. Однако использование данных параметров не лишено недостатков, связанных как со сложностью определения ряда показателей, так и с влиянием ряда дополнительных неспецифических факторов, затрудняющих трактовку полученных результатов.

Данные литературы свидетельствуют о том, что эритроцит весьма чувствителен к воздействию внешних и внутренних факторов, в ответ на которые изменяются электрические и вязкоупругие характеристики клетки [7–9]. Можно предположить, что электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом диэлектрофореза, имеют связанные со стадией заболевания особенности, которые можно использовать в качестве предикторов обострения ВЗК.

Цель работы – у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике, изучить электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов в качестве возможных предикторов обострения заболевания.

Материал и методы

Обследовано 23 больных ВЗК (средний возраст $37,9 \pm 4,3$ года), из них 10 пациентов с ЯК,

9 – с БК, 4 – с неклассифицируемым колитом (НКК). Первое обследование проведено в стадию обострения заболевания, второе – через 6–12 месяцев, в стадию ремиссии. Электрические и вязкоупругие показатели эритроцитов изучали до начала терапии. У всех пациентов с ВЗК диагностировано поражение толстой кишки. Преобладали лица с рецидивирующим течением заболевания, средняя продолжительность заболевания в группе составила $5,1 \pm 3,6$ года, а также со среднетяжелым течением (17 человек, 73,9 %; остальные 6 (23,1 %) человек имели легкое течение). На момент первого обследования в стадии обострения у пациентов с ВЗК отмечена умеренная клиническая и эндоскопическая активность. При оценке тяжести настоящей атаки установлено, что у четырех больных (17,4 %) (по два пациента с ЯК и НКК) индекс Мейо составлял от 3 до 5, что соответствовало легкой атаке, в то время как у большей части больных с ЯК и НКК (10 человек, 43,5 %) он находился в пределах от 6 до 9 баллов (среднетяжелая атака). Оценка индекса активности БК (индекса Беста) показала, что у пациентов в стадии обострения он составлял $173,2 \pm 28,5$ балла, что соответствовало легкой атаке. У большей части обследованных (16 человек, 69,6 %) в стадии обострения выявлена анемия легкой и средней степени тяжести, при этом у пациентов с ЯК преобладала железодефицитная анемия, у больных БК – анемия воспалительных заболеваний и смешанного генеза. Из внекишечных проявлений ВЗК наблюдались артропатии (10 человек, 43,5 %), у 5 пациентов (21,7 %) выявлен стеатоз печени и стеатогепатит.

Второе исследование параметров эритроцитов у больных ВЗК проведено через 6–12 месяцев. Пациенты получали терапию кортикостероидами, аминосалицилатами, иммуномодуляторами. К моменту второго обследования индекс Мейо у лиц с ЯК и НКК не превышал 2 баллов, у больных с БК индекс Беста составил $135,0 \pm 6,5$ балла, что свидетельствовало о ремиссии заболевания.

После проведенных в динамике исследований параметров эритроцитов наблюдение за пациентами с ВЗК выполнено в течение последующих 6–12 месяцев с целью оценки сохранения ремиссии или наступления обострения.

Для проверки предиктивных возможностей параметров эритроцитов дополнительно обследованы 36 пациентов с ВЗК в стадии ремиссии (средний возраст $38,1 \pm 5,7$ года), которая длилась от 6 до 12 месяцев. Из них 13 пациентов страдали ЯК, 10 – БК, 13 – НКК; в 25 (71,4 %) случаях течение было среднетяжелым рецидивирующим, в 11 – легким. На момент обследования неактивная стадия заболевания подтверждена данными кли-

ники, эндоскопии, биохимии и фекальными маркерами. Изменения характеристик заболевания в данной группе отслеживались в течение последующего года.

Для исследования эритроцитов методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле клетки красной крови получали из цельной крови пациентов, взятой из вены. Подробно методика описана в монографии [9]. Оценивали долю дискоцитов, сфероцитов, деформированных клеток (%), характер поверхности (усл. ед.), поляризуемость клеток на разных частотах диапазона (м^3), относительную поляризуемость (соотношение величин показателя на 10^6 Гц и 10^5 Гц), обобщенные показатели жесткости (Н/м), вязкости ($\text{Па} \times \text{с}$), электропроводность мембран (См/м), амплитуду деформации эритроцитов на частоте 10^6 Гц (м), степень деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц (%), емкость мембран эритроцитов (Ф), скорость движения клеток к электродам (мкм/с), положение равновесной частоты (Гц), величину дипольного момента ($\text{Кл} \times \text{м}$). Для компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода составляла 7–12 %.

При статистической обработке данных определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова – Смирнова. В случаях нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD), данные представлялись как $M \pm SD$, при отклонении распределения от нормального вычислялись медианы (Me) с указанием межквартильного размаха (Me [Q1; Q3]); значимость различий показателей оценивалась с использованием соответственно критериев Стьюдента, Пирсона или Манна – Уитни, Краскела – Уоллиса, χ^2 , связи между признаками – вычислением коэффициента линейной корреляции Пирсона или рангового коэффициента корреляции Спирмена. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05.

Для определения параметров эритроцитов, являющихся предикторами обострения, проведена процедура нормализации уровней показателей. Для визуализации наблюдаемых отличий в уровнях параметров эритроцитов в стадии обострения и ремиссии, а также корреляций показателей красной крови использованы тепловые карты (heatmap). Для выявления различий между параметрами эритроцитов, ассоциированными с разными стадиями ВЗК, применяли дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов (partial least squares discriminant

analysis – ortho-PLS-DA). Для выявления электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, являющихся предикторами обострения, использованы парный (сопоставление величин параметра одного пациента в стадии обострения и ремиссии) и непарный (сравнение величин параметров всей группы больных в стадии обострения и ремиссии) t -тест и метод Volcano plot, кластерный анализ (K-means clustering) (система методов машинного обучения – Random Forest) с применением программного обеспечения MATLAB (R2019a, MathWorks) и языка программирования R с использованием стандартных библиотек обучающих классификаций и наборов инструментов статистики [10].

Оценка диагностической точности показателей в качестве предикторов обострения произведена с помощью ROC-анализа.

Исследование выполнено с одобрения Комитета биомедицинской этики НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» (17.12.2018, протокол № 120). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты

Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов в группе пациентов с ВЗК с наступившей ремиссией в ходе динамического наблюдения представлены в табл. 1.

Анализ изменения функциональных параметров клеток красной крови в группе пациентов с динамикой «обострение – ремиссия» показал, что наступление ремиссии ассоциировано со снижением доли деформированных, сфероцитарных форм эритроцитов с измененным характером поверхности при увеличении доли дискоцитарных форм, увеличением скорости движения клеток к электродам, величины дипольного момента, емкости мембран, тенденцией к нарастанию амплитуды деформации на высоких частотах, снижением обобщенных показателей вязкости и жесткости. Отмечено возрастание поляризуемости на низких частотах при развитии ремиссии. Выявлено отчетливое смещение равновесной частоты в низкочастотный диапазон в динамике по оси «обострение – ремиссия».

Наиболее значимыми параметрами, различающими обострение и ремиссию в данной группе пациентов, оказались измененный характер поверхности клеток ($p < 0,001$), доля деформированных клеток ($p = 0,006$), обобщенный показатель жесткости ($p = 0,042$), электропроводность ($p = 0,042$), положение равновесной ча-

Таблица 1. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов пациентов с ВЗК в динамике наблюдения

Table 1. Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes of patients with IBD during follow-up

Показатель	Пациенты с ВЗК в стадии обострения, $n = 23$	Пациенты с ВЗК в стадии ремиссии при наблюдении в динамике, $n = 23$	p
Доля дискоцитов, %	65 [47; 73]	70 [60; 85]	0,269
Доля сфероцитов, %	24 [21; 43]	19 [11; 23]	0,170
Доля деформированных клеток, %	70 [57; 80]	28 [21; 38]	0,0069
Измененный характер поверхности клеток, усл. коэффициент	$1,74 \pm 0,37$	$1,21 \pm 0,42$	0,0001
Амплитуда деформации (м) на частоте 10^6 Гц	$6,21 \times 10^{-6}$ [$5,22 \times 10^{-6}$; $6,52 \times 10^{-6}$]	$6,74 \times 10^{-6}$ [$6,47 \times 10^{-6}$; $6,91 \times 10^{-6}$]	0,093
Степень изменения амплитуды деформации на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, %	54 [38; 58]	64 [57; 73]	0,063
Обобщенный показатель жесткости, Н/м	$9,51 \times 10^{-6}$ [$9,18 \times 10^{-6}$; $10,12 \times 10^{-6}$]	$8,67 \times 10^{-6}$ [$8,44 \times 10^{-6}$; $9,02 \times 10^{-6}$]	0,042
Обобщенный показатель вязкости, Па $\times$ с	0,74 [0,72; 0,79]	0,69 [0,68; 0,72]	0,093
Поляризуемость (m^3) на частоте 10^6 Гц	$5,67 \times 10^{-15}$ [$2,99 \times 10^{-15}$; $6,38 \times 10^{-15}$]	$5,34 \times 10^{-15}$ [$4,72 \times 10^{-15}$; $5,96 \times 10^{-15}$]	0,791
Поляризуемость (m^3) на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц	$4,74 \times 10^{-15}$ [$2,13 \times 10^{-15}$; $5,93 \times 10^{-15}$]	$3,9 \times 10^{-15}$ [$2,95 \times 10^{-15}$; $8,56 \times 10^{-15}$]	0,929
Поляризуемость (m^3) на частоте $0,1 \times 10^6$ Гц	$-4,99 \times 10^{-15}$ [$-3,14 \times 10^{-15}$; $-7,99 \times 10^{-15}$]	$-4,13 \times 10^{-15}$ [$-2,82 \times 10^{-15}$; $-5,2 \times 10^{-15}$]	0,536
Поляризуемость (m^3) на частоте $0,05 \times 10^6$ Гц	$-3,04 \times 10^{-15}$ [$-2,33 \times 10^{-15}$; $-5,36 \times 10^{-15}$]	$-3,71 \times 10^{-15}$ [$-2,11 \times 10^{-15}$; $-5,35 \times 10^{-15}$]	0,859
Относительная поляризуемость	0,92 [0,74; 1,12]	1,15 [1,09; 1,44]	0,251
Электропроводность, См/м	$8,64 \times 10^{-5}$ [$7,23 \times 10^{-5}$; $9,12 \times 10^{-5}$]	$5,71 \times 10^{-5}$ [$5,42 \times 10^{-5}$; $6,23 \times 10^{-5}$]	0,042
Емкость клеточной мембраны, Ф	$3,7 \times 10^{-14}$ [$3,4 \times 10^{-14}$; $4,6 \times 10^{-14}$]	$6,84 \times 10^{-14}$ [$5,04 \times 10^{-14}$; $7,78 \times 10^{-14}$]	0,111
Скорость движения эритроцитов к электродам, мкм/с	4 [3; 5]	4,9 [4,1; 5,1]	0,063
Равновесная частота, Гц	$0,77 \times 10^6$ [$0,71 \times 10^6$; $1,58 \times 10^6$]	$0,39 \times 10^6$ [$0,28 \times 10^6$; $0,47 \times 10^6$]	0,042
Дипольный момент, Кл $\times$ м	$3,92 \times 10^{-21}$ [$3,68 \times 10^{-21}$; $4,98 \times 10^{-21}$]	$6,17 \times 10^{-21}$ [$4,76 \times 10^{-21}$; $6,92 \times 10^{-21}$]	0,021

стоты ($p = 0,042$), величина дипольного момента ($p = 0,021$).

Для дальнейшей статистической обработки с целью определения предикторов обострения проведена нормализация электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике (рис. 1).

Визуализация различий вязкоупругих параметров эритроцитов в зависимости от стадии заболевания представлена на тепловой карте (рис. 2), где слева – величины параметров эритроцитов

пациентов в стадии ремиссии, справа – в стадии обострения.

Выявлено восемь показателей, потенциальных биомаркеров предикции обострения, при использовании парного t-теста и 11 параметров – при использовании непарного подхода (рис. 3, а), величины некоторых из них представлены на рис. 3, б.

На первом этапе к числу наиболее значимых параметров предикции обострения были отнесены доля деформированных клеток, обобщенные

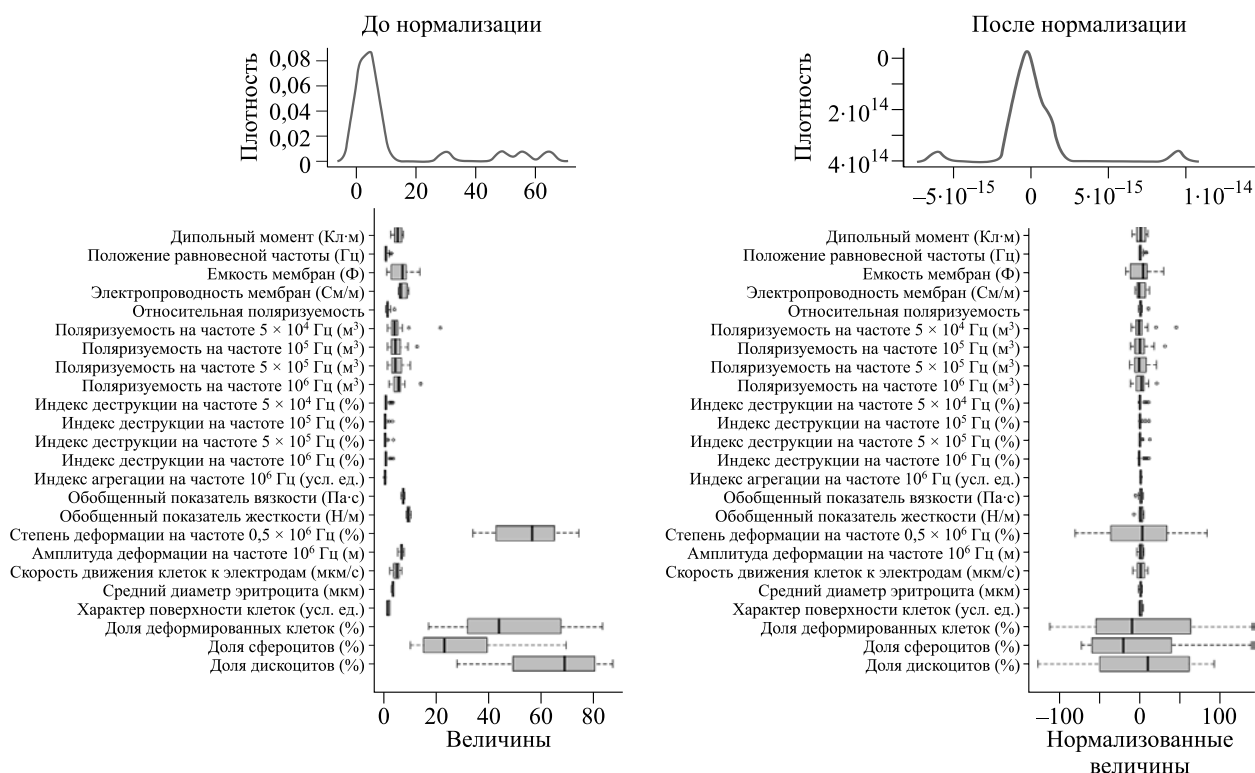


Рис. 1. Нормализация уровней электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике (слева – параметры до нормализации, справа – после нормализации)

Fig. 1. Normalization of the levels of electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes for patients with IBD examined in dynamics (on the left – parameters before normalization, on the right – after normalization)

показатели вязкости и жесткости, амплитуда деформации клеток на частоте 10^6 Гц.

Применение на втором этапе анализа метода Volcano plot (парная статистика) выявила пять вязкоупругих показателей, претендующих на роль маркеров предикции обострения – доля деформированных клеток, характер поверхности клеток, электропроводность, дипольный момент и скорость поступательного движения клеток к электродам (рис. 4, табл. 2). Использование метода Volcano plot (непарная статистика) электрических и вязкоупругих показателей эритроцитов для выявления маркеров предикции обострения позволило выявить ряд совпадающих с результатами парной статистики и перечень отличающихся параметров эритроцитов (табл. 3).

Данные парной и непарной статистики при использовании метода Volcano plot совпали по перечню параметров эритроцитов – доля деформированных клеток, величина дипольного момента, электропроводность мембран, скорость поступательного движения эритроцитов к электродам, характер поверхности клеток. Вместе с тем непарная статистика позволила выявить еще два показателя эритроцитов, претендующих на роль предикторов обострения, – степень изменения амплитуды деформации на частоте

5×10^5 Гц ($p = 0,0098$) и емкость мембран эритроцитов ($p = 0,029$).

Возможности корректного различения электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов при применении парной статистики модифицированным методом главных компонент (ortho-PLS-DA) представлены на рис. 5. Кроме пересекающейся области, отражающей совпадающие по уровню параметры эритроцитов, отчетливо видны отличающиеся характеристики.

Наличие устойчивых «кластеров» на тепловой карте корреляций электрических и вязкоупругих показателей эритроцитов (парная статистика) у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике, свидетельствует о тесной взаимосвязи параметров, ассоциированных со стадией ВЗК (рис. 6).

На рис. 7 представлены корреляции одного из маркеров предикции – доли деформированных клеток – с большей частью вязкоупругих параметров эритроцитов. При этом наиболее тесные прямые ассоциации выявлены с обобщенными показателями вязкости, жесткости, характером поверхности клеток, электропроводностью и индексом агрегации на частоте 10^6 Гц, а обратные – с амплитудой деформации на частоте 10^6 Гц, скоростью поступательного движения клеток к электродам, величиной дипольного момента, средним

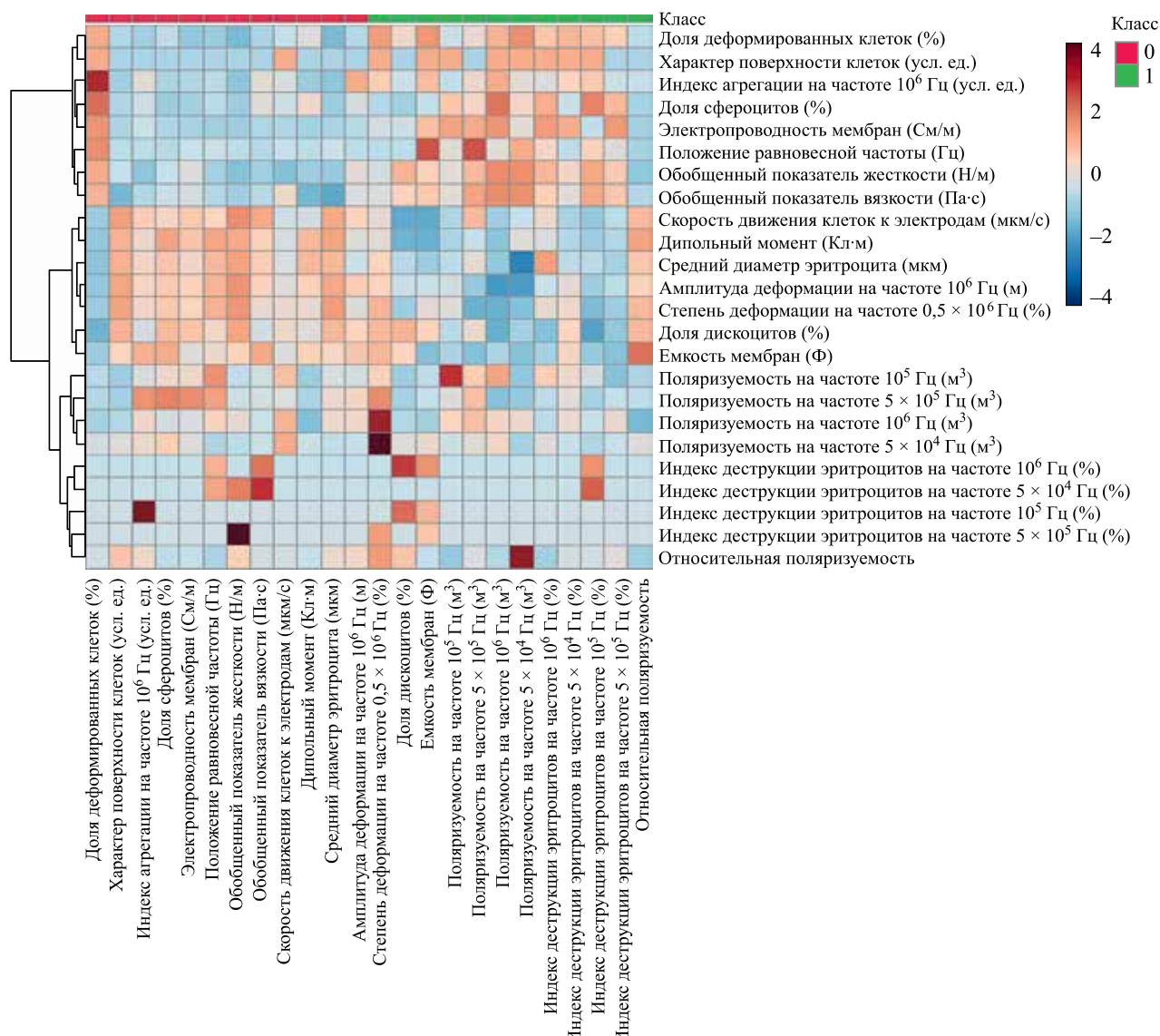


Рис. 2. Тепловая карта (heatmap) визуализации электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике: слева (красная полоса) – величины параметров эритроцитов в стадии ремиссии, справа (зеленая полоса) – в стадии обострения

Fig. 2. Heatmap for visualization of electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes for patients with IBD examined in dynamics: on the left (red bar) – the levels of parameters of erythrocytes in remission, on the right (green bar) – in the stage of exacerbation

диаметром эритроцитов, степенью деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц, емкостью мембран.

При проведении ROC-анализа для предикции обострения высокий диагностический потенциал продемонстрировали даже отдельные показатели. На рис. 8 показаны ROC-кривые для доли деформированных клеток (AUC 0,939) и обобщенного показателя вязкости (AUC 0,932), а также значения показателей при обострении и ремиссии в виде диаграмм размаха.

Проведение кластерного анализа с учетом выявленных уровней электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, претендующих на роль предикторов обострения (рис. 9), позволи-

ло выявить три кластера со сходными значениями параметров эритроцитов. На данном рисунке зеленое облако – это кластер пациентов с ВЗК в стадии ремиссии; синее и розовое – кластеры пациентов с ВЗК в стадии обострения; красные точки – пациенты в стадии ремиссии, синие – в стадии обострения.

Из рис. 9 видно, что установленные уровни электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов достаточно четко выделяют пациентов в стадии ремиссии (зеленый кластер), за исключением одного человека, который оказался в данной группе, имея активность ВЗК.

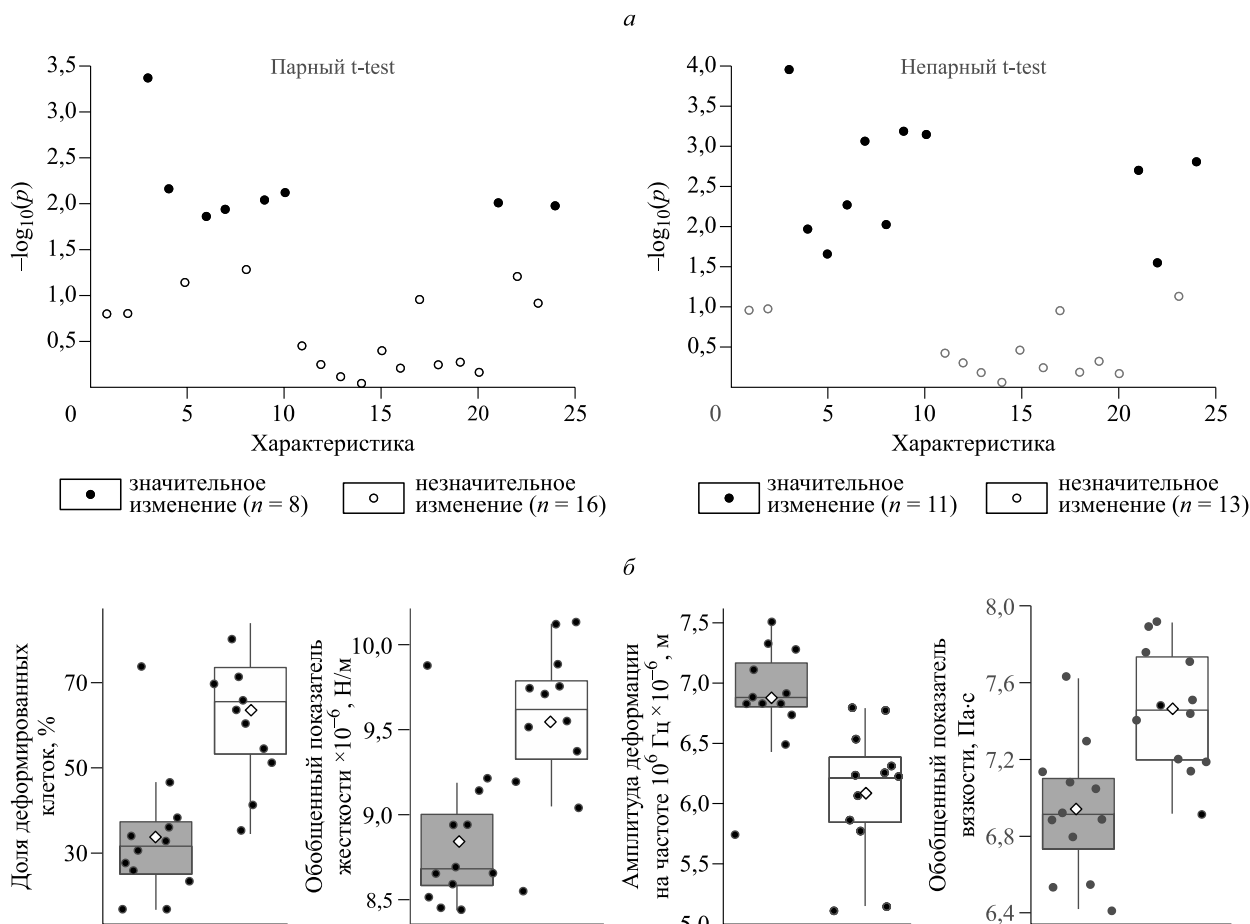


Рис. 3. Выявление предикторов обострения среди электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов с помощью парного и непарного t-теста (а) и их примеры (здесь и на рис. 4, рис. 8 белые столбики – величины показателей в стадии обострения, серые – в стадии ремиссии; данные представлены в виде диаграмм размаха («ящик с усами»): границами ящика служат первый и третий квартили, линия в середине «ящика» — медиана, концы «усов» — минимальное и максимальное значения выборки, точки черного цвета – значения параметра для отдельных пациентов, ромб внутри ящика – среднее арифметическое для данного параметра) (б)

Fig. 3. Predictors of exacerbation among the electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes identified using paired and unpaired t-test (a) and some of them (here and in Fig. 4, 8 white bars – indicator value in the stage of exacerbation, grey bars – in the stage of remission) (b)

Пациенты в стадии обострения четко разделились по уровню параметров эритроцитов на два кластера, один из них – голубой – включал лиц с максимально выраженной активностью с наиболее выраженными отклонениями по параметрам эритроцитов. Среди больных данной группы оказался пациент с ЖК в стадии ремиссии. Мониторинг его состояния позволил выявить развитие обострения заболевания через месяц после проведения исследования эритроцитов.

Пациенты, оказавшиеся в стадии обострения в пределах розового кластера, имели промежуточные величины параметров эритроцитов между максимально отклоняющимися при активном заболевании в пределах голубого кластера и минимальными в стадии ремиссии (зеленый кластер). Подобное промежуточное положение, возможно,

отражает затухание обострения. Действительно, проспективный анализ больных данной группы установил развитие ремиссии через 2,5–3,5 месяца после проведенного исследования эритроцитов методом диэлектрофореза.

Для оценки предсказательных возможностей установленных ранее электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов был исследован ряд из них (доля деформированных клеток, доля клеток с измененным характером поверхности, электропроводность мембран, дипольный момент, скорость поступательного движения эритроцитов к электродам, степень изменения амплитуды деформации на частоте 5×10^5 Гц и емкость мембран) у пациентов с ВЗК – 36 человек, находившихся в стадии ремиссии. Применение кластерного анали-

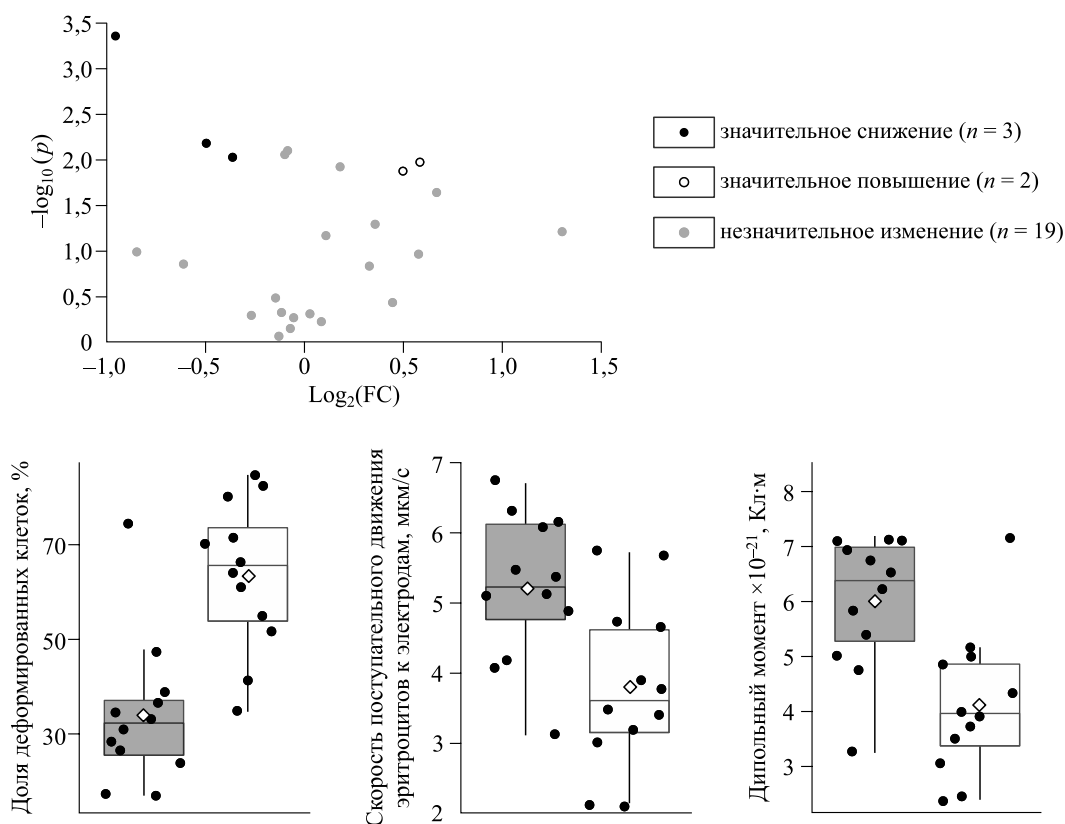


Рис. 4. Исследование методом Volcano plot (парная статистика) электрических и вязкоупругих показателей эритроцитов, претендующих на роль маркеров предикции обострения, и величины некоторых из них в форме диаграмм размаха у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике

Fig. 4. Volcano plot (paired statistics) of electrical and viscoelastic indicators of erythrocytes, claiming to be markers of predicting exacerbation, and some of them in the form of box plot in patients with IBD examined in dynamics

за выявило три основных группы по уровням данных параметров эритроцитов (рис. 10).

В кластере с максимально измененными уровнями параметров эритроцитов (голубой) оказались по три пациента с ЯК и БК и один – с НКК. У шестерых больных развилось обострение заболевания в сроки от 2,5 до 4,5 месяца после исследования клеток красной крови. Три человека

с БК и один с ЯК, находившиеся в зоне перекрытия голубого и розового кластеров, оказались в активной фазе заболевания через 4–6 месяцев. У пациентов, входящих в розовый кластер, выявлено обострение через 8–12 месяцев ($n = 15$) или сохранялась ремиссия ($n = 3$). У больных, входящих в кластер с минимально измененными параметрами эритроцитов (зеленый), сохранялась

Таблица 2. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом Volcano plot (парная статистика) и претендующие на роль предикторов обострения у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике

Table 2. Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes, studied by the Volcano plot method (pair statistics) and claiming to be predictors of exacerbation in patients with IBD, examined in dynamics

Параметр	Кратность изменений (FC)	$\log_2(FC)$	p	$-\log_{10}(p)$
Доля деформированных клеток, %	0,50977	– 0,97208	0,000442	3,3546
Характер поверхности клеток, усл. ед.	0,70711	– 0,5	0,006872	2,1629
Электропроводность, См/м	0,77197	– 0,37338	0,009948	2,0023
Дипольный момент, Кл × м	1,4839	0,56943	0,011346	1,9451
Скорость движения эритроцитов к электродам, мкм/с	1,4064	0,49202	0,013671	1,8642

Таблица 3. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом Volcano plot (непарная статистика) и претендующие на роль предикторов обострения у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике

Table 3. Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes, studied by the Volcano plot method (unpaired statistics) and claiming to be predictors of exacerbation in patients with IBD, examined in dynamics

Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов	Кратность изменений (FC)	$\log_2(FC)$	p	$-\log_{10}(p)$
Доля деформированных клеток, %	0,53491	-0,90262	0,000125	3,9046
Дипольный момент, Кл × м	1,4503	0,53632	0,001572	2,8037
Электропроводность, См/м	0,76876	-0,37939	0,001918	2,7171
Скорость движения эритроцитов к электродам, мкм/с	1,3684	0,45251	0,005699	2,2442
Степень изменения амплитуды деформации на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, %	1,2598	0,33315	0,00988	2,0052
Характер поверхности клеток, усл. ед.	0,7000	-0,51457	0,011436	1,9417
Емкость клеточной мембраны, Ф	1,718	0,78076	0,029885	1,5245

ремиссия в течение года. Предсказательная точность предложенного подхода составила 92 %.

Обсуждение

Проблема поиска биомаркеров прогнозирования рецидива ВЗК продолжает оставаться весьма актуальной. На данную роль претендуют как фекальные, так и некоторые биохимические показатели.

Ряд исследований показал, что у пациентов с неактивной стадией заболевания увеличение содержания фекального кальпротектина предсказывает рецидив заболевания от 1 до 12 месяцев, особенно у больных ЯК [3, 11–15]. В более ранних исследованиях установлено, что повышение величины данного показателя выявляет пациентов, перенесших рецидив в течение 12 месяцев, с чувствительностью примерно 90 % и специфичностью 82 % [11, 12]. F. Costa et al. сообщили, что повышенный уровень фекального кальпротектина имел положительное прогностическое значение 81 % и отрицательное прогностическое значение – 90 % для рецидива ЯК, у пациентов с БК – соответственно 87 и 43 % [14].

Увеличение содержания кальпротектина и лактоферрина выявляли у пациентов с неактивным ВЗК, у которых в течение ближайших 12 месяцев наступал рецидив (для кальпротектина чувствительность составила 69 %, специфичность – 69 %, для лактоферрина – соответственно 62 и 65 %) [15], хотя эти значения были ниже, чем сообщалось в других исследованиях [16–20]. T. Sipponen, K.L. Kolho сообщили, что частота рецидивов среди пациентов с повышенным уровнем фекального кальпротектина была низ-

кой, хотя в этом исследовании более 50 % пациентов находились в ремиссии более одного года [19]. Увеличение концентрации кальпротектина (и, вероятно, лактоферрина) вскоре после разви-

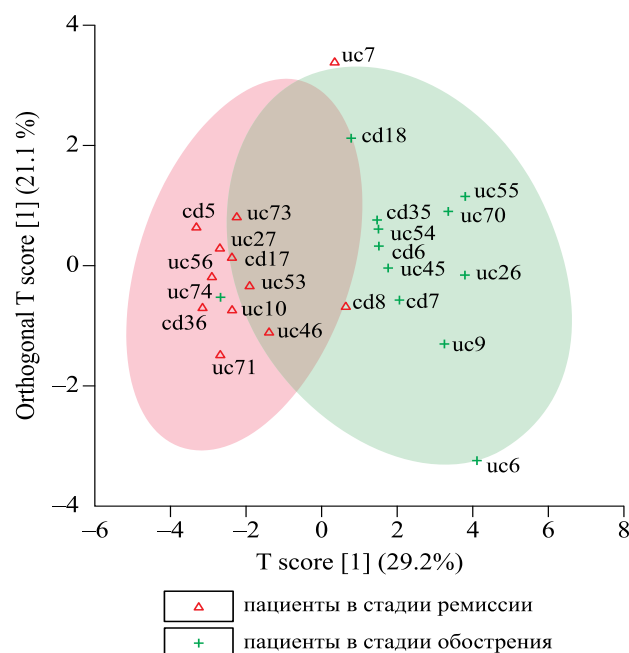


Рис. 5. Метод ortho-PLS-DA в различении электрических и вязкоупругих показателей эритроцитов (парная статистика) у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике, между стадией обострения (зеленое облако) и ремиссии (розовое облако)

Fig. 5. The ortho-PLS-DA method in distinguishing the electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes (paired statistics) in patients with IBD, examined in dynamics, between the stage of exacerbation (green cloud) and remission (pink cloud)

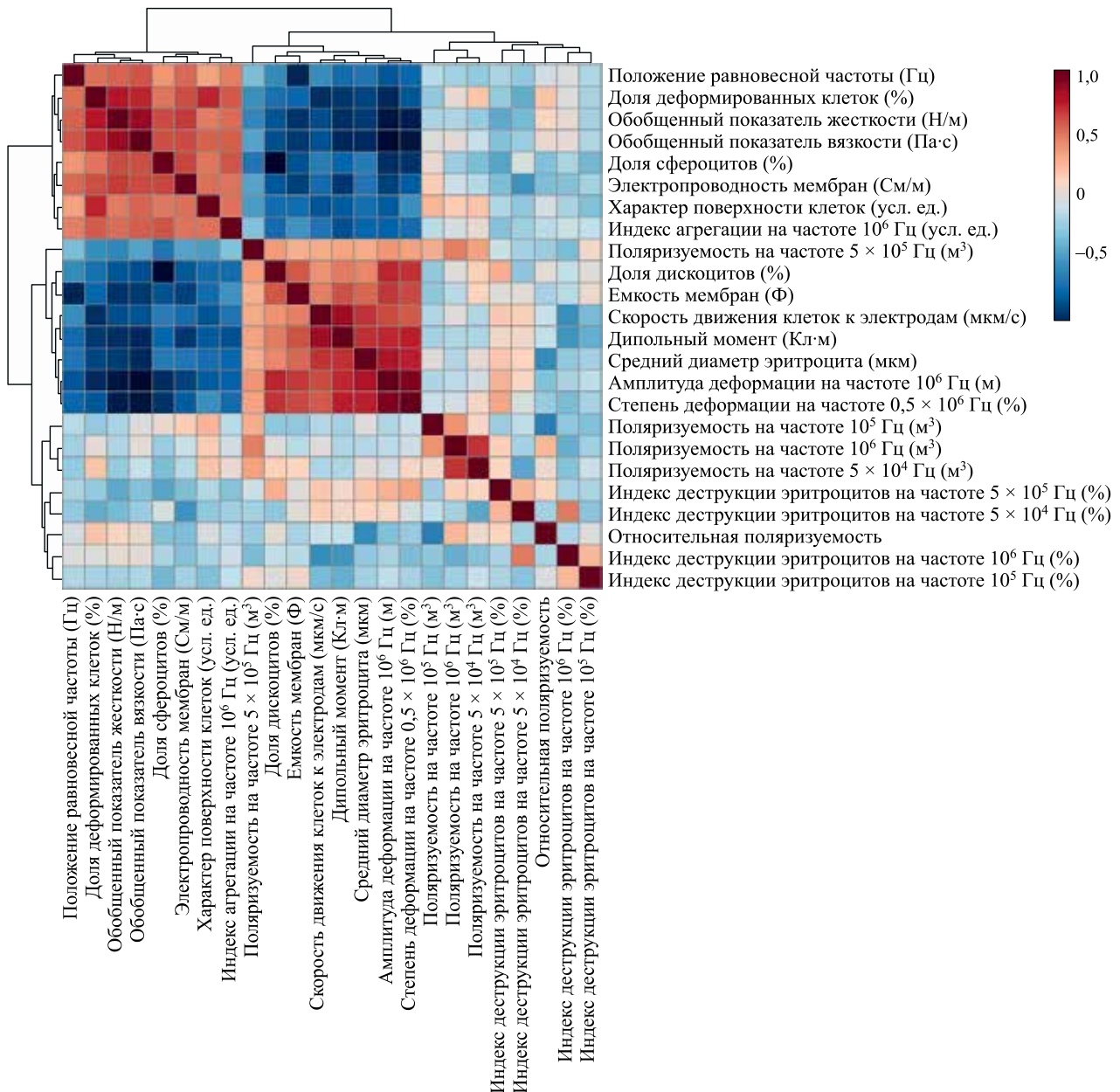


Рис. 6. Тепловая карта (heatmap) корреляций электрических и вязкоупругих показателей эритроцитов (парная статистика) у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике

Fig. 6. Heatmap of correlations of erythrocyte electrical and viscoelastic parameters (pair statistics) in patients with IBD examined in dynamics

тия ремиссии может быть лучшим предиктором рецидива в сравнении с повышенным уровнем кальпротектина через 6 месяцев или более после наступления ремиссии.

При интерпретации данных этих исследований важно понимать ограниченность измерения значений фекальных маркеров. Исследование, в котором сравнивались шесть различных результатов определения содержания кальпротектина в кале пациентов с ВЗК, выявило 5-кратную количественную разницу между полученными данными, что показывает необходимость введе-

ния стандартизации [16]. Помимо необходимости продольного измерения, существует значительная внутрииндивидуальная вариативность уровня кальпротектина фекалий в течение дня, поэтому единичное измерение может не быть основой для принятия терапевтических решений [17].

Также изучена возможность по концентрации С-реактивного белка (СРБ) и СОЭ выявлять пациентов, у которых развитие рецидива заболевания наиболее вероятно. Ряд исследований ассоциировал повышение уровня СРБ и/или СОЭ у пациентов с БК с развитием рецидива заболевания

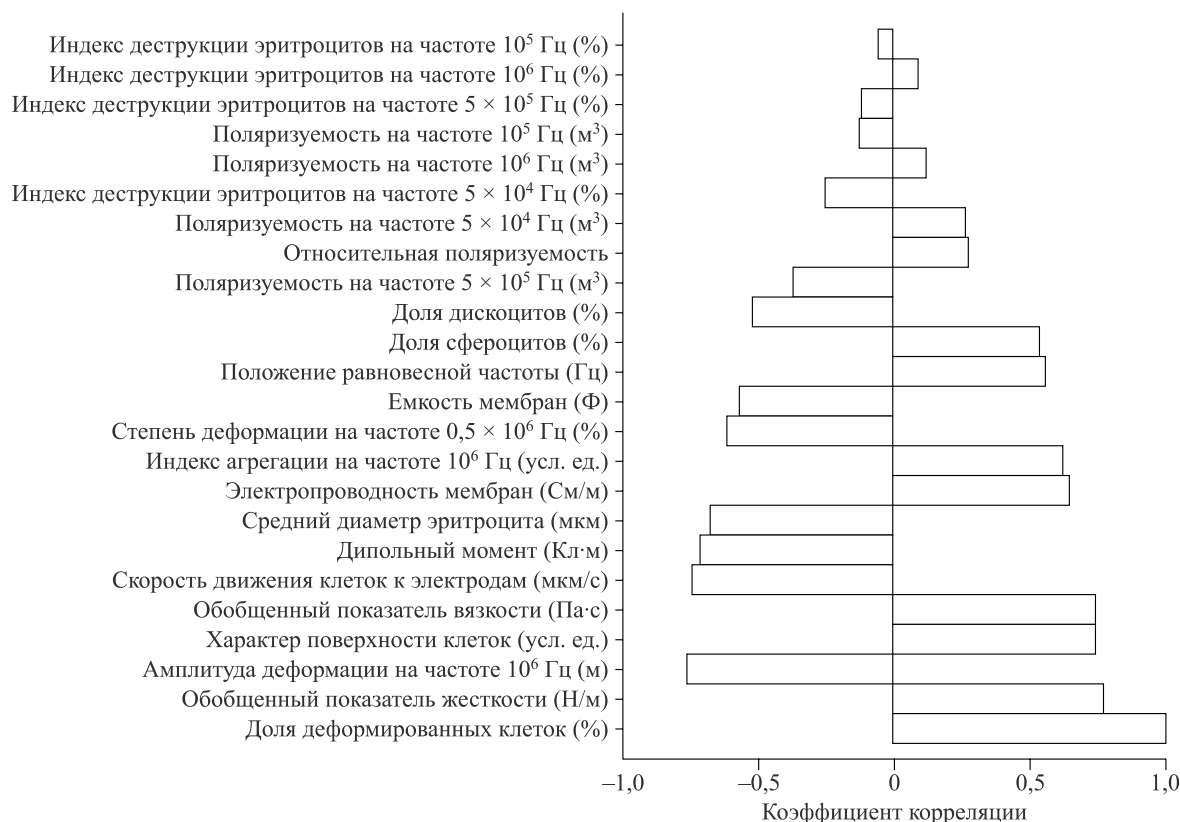


Рис. 7. Корреляции доли деформированных клеток с электрическими и вязкоупругими параметрами эритроцитов

Fig. 7. Correlation of the proportion of deformed cells with the electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes

[18–22]; имеется меньшее количество данных, позволяющих связать содержание этих маркеров с рецидивом ЯК. Так, A. Bitton et al. исследовали маркеры рецидива у 74 пациентов с клинически и эндоскопически неактивным ЯК (27 больных имели рецидив в течение периода наблюдения); с рецидивом заболевания было связано выявление базального плазмозитоза в образцах ректальных биоптатов, но не повышение уровня СРБ или СОЭ [23].

Кроме СОЭ, ряд показателей эритроцитов используется для оценки тяжести настоящей атаки, степени тяжести течения заболевания (количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит [24, 25]. Показано, что показатель RDW – ширина распределения клеток по объему – коррелирует с активностью заболевания при ВЗК и может служить для дифференцирования БК от ЯК [26].

Следует отметить, что значимыми маркерами обострения ВЗК оказались показатели, связанные с изменением заряда (скорость поступательного движения к электродам, дипольный момент), структурой мембран (электропроводность, емкость мембран, измененный характер поверхности) и энергетическим обменом эритроцитов (степень деформации). Вероятно, эти параме-

тры первыми реагируют на изменения, связанные с развитием рецидива заболевания. Заряд эритроцитов существенно модифицируется при изменении содержания воспалительных белков, соотношения альбуминов и глобулинов в сыворотке крови, что наблюдается на ранних этапах обострения и может быть его предиктором до развертывания клинических, эндоскопических признаков [27]. Рассмотрение С-реактивного белка в качестве предиктора рецидива косвенно подтверждает эту точку зрения.

Изменения структуры мембран эритроцитов с последующим снижением их поверхностного электрического заряда сопряжены со сдвигами содержания как фосфолипидных фракций и холестерина, так их составляющих – жирных кислот [7]. Последние тесно ассоциированы с паттерном цитокинов, гормонов, связанных с активацией воспаления [28, 29].

Преобладающее число мембранно-связанных ферментов, включая Mg^{2+} -зависимую Na^+/K^+ -АТФазу мембран эритроцитов, являются вискозизависимыми, т.е. их активность во многом определяется липидным окружением [30]. Активация перекисного окисления липидов, арахидонового цикла в мембранах приводит к истоще-

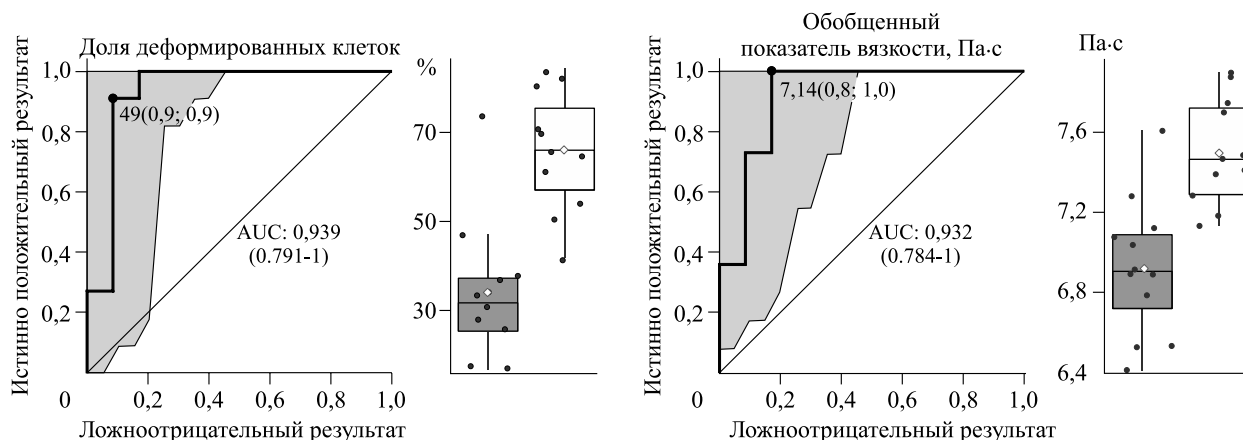


Рис. 8. ROC-кривые для доли деформированных клеток и обобщенного показателя вязкости, уровни значений показателей при обострении и ремиссии

Fig. 8. ROC curves for the proportion of deformed cells and the summarized viscosity, the levels of values of indicators during exacerbation and remission

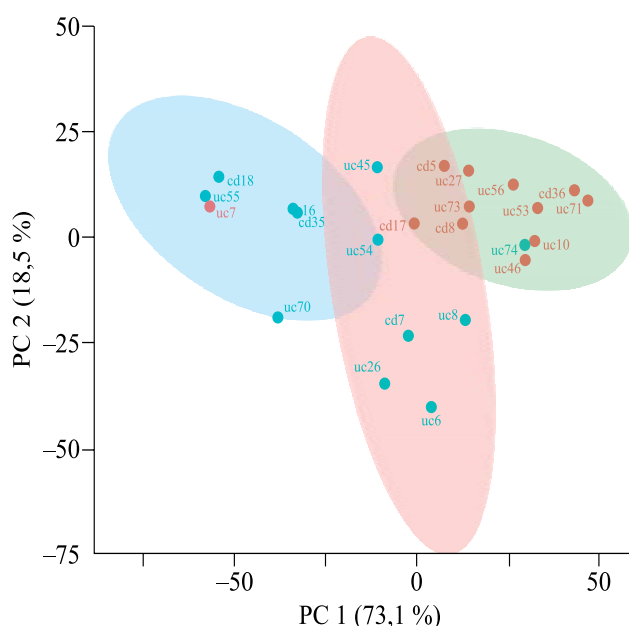


Рис. 9. Кластерный анализ электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов – предикторов обострения у пациентов с ВЗК, обследованных в динамике

Fig. 9. K-means clustering of electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes – predictors of exacerbation in patients with IBD, examined over time

нию запасов АТФ внутри клетки со снижением способности к деформации [31].

Вероятно, изменения параметров эритроцитов, выявляемые методом диэлектрофореза, происходят гораздо раньше, чем сдвиги показателей обострения, доступных к измерению в рутинной

клинической практике [9]. Вместе с тем в литературе имеются данные, что некоторые традиционно используемые показатели эритроцитов могут служить предикторами ухудшения течения заболевания. Так, исследование параметров клеток красной крови в динамике у беременных женщин позволило выявить снижение концентрации гемоглобина в эритроците и увеличение среднего объема клеток за месяц до развития гестоза [32].

Изучение параметров эритроцитов, претендующих на роль маркеров обострения, на втором этапе было проведено в группе пациентов с ВЗК ($n = 36$), которые находились в стадии ремиссии. Гипотеза состояла в том, что параметры эритроцитов больных, находящихся в состоянии ремиссии, могут отличаться, что и предскажет грядущее обострение. Поскольку состояние ремиссии у обследованных длилось от 6 до 12 месяцев, изменения показателей клеток красной крови не могли быть связаны с предшествующей активностью заболевания. Применение кластерного анализа позволило выделить три основные группы пациентов с ВЗК по уровню параметров эритроцитов. За течением заболевания в каждой из групп проводилось годовое наблюдение. Установлено, что у большей части больных с максимально измененными параметрами эритроцитов развилось обострение в достаточно короткие сроки – от 2,5 до 4,5 месяца, «пограничные» величины параметров эритроцитов предполагали более отдаленные сроки наступления обострения (4–6 месяцев) и, наконец, минимально измененные были ассоциированы с развитием активности ВЗК через 8–12 месяцев или с сохранением ремиссии. Из полученных данных следует, что установленные в ка-

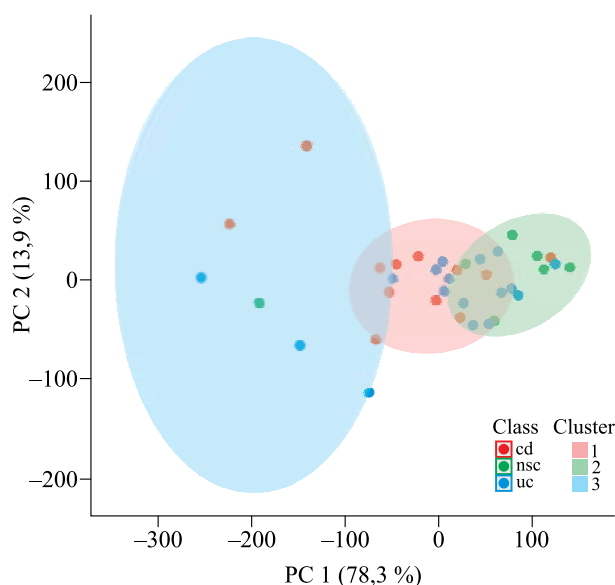


Рис. 10. Кластерный анализ электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов – предикторов обострения у пациентов с ВЗК в стадии ремиссии ($n = 36$). Зеленое, розовое и голубое облако – соответственно кластеры пациентов с ВЗК в стадии ремиссии с минимально измененными, промежуточными и максимально измененными величинами параметров эритроцитов. Красные, синие и зеленые точки – соответственно пациенты с БК, ЯК и НКК

Fig. 10. Cluster analysis (K-means clustering) of electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes – predictors of exacerbation in patients with IBD in remission ($n = 36$). Green, pink and blue cloud – a cluster of patients with IBD in remission with minimally changed, intermediate and most altered erythrocyte parameters, respectively. Red, blue and green dots are Crohn's disease, ulcerative colitis and unclassified colitis patients, respectively

честве предикторов обострения показатели эритроцитов могут не только предсказать развитие активности ВЗК, но и стратифицировать ее риск.

Предложенный подход – использовать параметры эритроцитов для прогнозирования течения заболевания – не нов. Исследование показателей красной крови как биомаркеров и предикторов активно проводится при целом ряде патологий: в кардиологической практике показатель распределения эритроцитов по объему (RDW) рассматривается как долговременный прогностический фактор течения острого инфаркта миокарда [33], величина омега-3 индекса мембран эритроцитов дает стратификацию риска развития внезапной коронарной смерти [34], острого инфаркта миокарда [35, 36]; в неврологии микро-РНК эри-

троцитов рассматриваются как потенциальный биомаркер течения рассеянного склероза [37]; проведен анализ уровня RDW для прогноза течения колоректального рака [38]. Настоящая работа, находясь в тренде подобных исследований, демонстрирует возможности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, измеренных методом диэлектрофореза, отличающегося минимальной пробоподготовкой, высокой скоростью выполнения, малой затратностью и трудоемкостью, высокой информативностью и наглядностью [9].

Таким образом, выявлены электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, являющиеся предикторами обострения ВЗК: увеличение доли деформированных клеток, измененный характер поверхности эритроцитов, повышенная электропроводность мембран, сниженные дипольный момент, скорость поступательного движения эритроцитов к электродам (парный и непарный методы Volcano plot), а также сниженные степень изменения амплитуды деформации на частоте 5×10^5 Гц ($p = 0,009$) и емкость мембран эритроцитов ($p = 0,029$) (непарный метод Volcano plot).

Установлена высокая диагностическая точность как предикторов обострения ВЗК следующих показателей: доля деформированных клеток (AUC 0,939), обобщенный показатель вязкости (AUC 0,932). Кластерный анализ данных параметров подтвердил их прогностический потенциал в сроки от 1 до 3,5 месяца. Кластерный анализ значений параметров эритроцитов – предикторов обострения, выполненный у пациентов с ВЗК в стадии ремиссии, позволил провести стратификацию риска развития обострения: при их максимальных изменениях – развитие обострения через 2,5–4,5 месяца, промежуточных значениях – через 4–6 месяцев, минимальных изменениях – через 8–12 месяцев (предсказательная точность 92 %).

Список литературы / References

1. Головенко О.В., Хомерики С.Г., Иванова Е.В., Федоров Е.Д., Головенко А.О. Воспалительные заболевания кишечника. Клинические, эндоскопические, морфологические аспекты диагностики. Принципы современной терапии. М.: Прима Принт, 2017. 180 с.
2. Golovenko O.V., Khomeriki S.G., Ivanova E.V., Fedorov E.D., Golovenko A.O. Inflammatory bowel disease. Clinical, endoscopic, morphological aspects of diagnostics. Principles of modern therapy. Moscow: Prima Print, 2017. 180 p. [In Russian].
3. Boirivant M., Leoni M., Tariciotti D., Fais S., Squarcia O., Pallone F. The clinical significance of serum C

active protein levels in Crohn's disease. Results of a prospective longitudinal study. *J. Clin. Gastroenterol.* 1988; 10: 401–405. doi: 10.1097/00004836-198808000-00011

3. Gisbert J.P., Bermejo F., Perez-Calle J.L., Taxonera C., Vera I., McNicholl A.G., Algaba A., Lopez P., Lopez-Palacios N., Calvo M., Gonzalez-Lama Y., Carneros J.A., Velasco M., Mate J. Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. *Inflamm. Bowel Dis.* 2009; 15: 1190–1198. doi: 10.1002/ibd.20933

4. Chen P., Zhou G., Lin J., Li L., Zeng Z., Chen M., Zhang S. Serum biomarkers for inflammatory bowel disease. *Front. Med. (Lausanne).* 2020; 7: 123. doi:10.3389/fmed.2020.00123

5. Joossens S., Colombel J.F., Landers C., Poullain D., Geboes K., Bossuyt X., Targan S., Rutgeerts P., Reinisch W. Anti-outer membrane of porin C and anti-I2 antibodies in indeterminate colitis. *Gut.* 2006; 55: 1667–1669. doi: 10.1136/gut.2005.089623

6. Long W.Y., Chen L., Zhang C.L., Nong R.-M., Lin M.-J., Zhan L.-L., Lv X.-P. Association between NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Zhuang patients. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20 (16): 4737–4744. doi: 10.3748/wjg.v20.i16.4737

7. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 202 с.

Novitskiy V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A. Physiology and pathophysiology of erythrocyte. Tomsk: Publishing House of Tomsk University, 2004. 202 p. [In Russian].

8. Dupire J., Socol M., Viallat A. Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109 (51): 20808–20813. doi: 10.1073/pnas.1210236109

9. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Буряк Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: ЦЭРИС, 2011. 172 с.

Generalov V.M., Kruchinina M.V., Durymanov A.G., Medvedev A.A., Safatov A.S., Sergeev A.N., Buryak G.A., Kurilovich S.A., Gromov A.A. Dielectrophoresis in the diagnosis of infectious and non-infectious diseases. Novosibirsk: TSERIS, 2011. 172 p. [In Russian].

10. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning.* 2001; 45: 5–32. doi: 10.1023/A:1010933404324

11. Amre D.K., Lu S.E., Costea F., Seidman E.G. Utility of serological markers in predicting the early occurrence of complications and surgery in pediatric Crohn's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* 2006; 101: 645–652. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00468.x

12. Dubinsky M.C., Lin Y.C., Dutridge D., Picornell Y., Landers C.J., Farrior S., Wrobel I., Quiros A., Vasiliasukas E.A., Grill B., Israel D., Bahar R., Chris-

tie D., Wahbeh G., Silber G., Dallazadeh S., Shah P., Thomas D., Kelts D., Hershberg R.M., Elson C.O., Targan S.R., Taylor K.D., Rotter J.I., Yang H., Western Regional Pediatric IBD Research Alliance. Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: immune responses predict disease progression. *Am. J. Gastroenterol.* 2006; 101: 360–367. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00456.x

13. Dubinsky M.C., Kugathasan S., Mei L., Picornell Y., Nebel J., Wrobel I., Quiros A., Silber G., Wahbeh G., Katzir L., Vasiliasukas E., Bahar R., Otley A., Mack D., Evans J., Rosh J., Hemker M.O., Leleiko N., Crandall W., Langton C., Landers C., Taylor K.D., Targan S.R., Rotter J.I., Markowitz J., Hyams J. Increased immune reactivity predicts aggressive complicating Crohn's disease in children. Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice. *J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2008; 6: 1105–1111. doi: 10.1016/j.cgh.2008.04.032

14. Costa F., Mumolo M.G., Ceccarelli L., Bellini M., Romano M.R., Sterpi C., Ricchiuti A., Marchi S., Bottai M. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut.* 2005; 54: 364–368. doi: 10.1136/gut.2004.043406

15. Tibble J.A., Sigthorsson G., Bridger S., Fagerhol M.K., Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2000; 119: 15–22. doi: 10.1053/gast.2000.8523

16. Labaere D., Smismans A., Van Olmen A., Christiaens P., D'Haens G., Moons V., Cuyle P.-J., Frans J., Bossuyt P. Comparison of six different calprotectin assays for the assessment of inflammatory bowel disease. *United Eur. Gastroenterol J.* 2014; 2: 30–37. doi: 10.1177/2050640613518201

17. Calafat M., Cabre E., Manosa M., Lobatón T., Marín L., Domènech E. High within-day variability of fecal calprotectin levels in patients with active ulcerative colitis: what is the best timing for stool sampling? *Inflamm. Bowel Dis.* 2015; 21: 1072–1076. doi: 10.1097/MIB.0000000000000349

18. D'Inca R., Dal Pont E., di Leo V., Benazzato L., Martinato M., Lamboglia F., Oliva L., Sturmiolo G.C. Can calprotectin predict relapse risk in inflammatory bowel disease? *Am. J. Gastroenterol.* 2008; 103: 2007–2014. doi: 10.1111/j.1572-0241.2008.01870.x

19. Sipponen T., Kolho K.L. Faecal calprotectin in children with clinically quiescent inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2010; 45: 872–877. doi: 10.3109/00365521003782389

20. Walkiewicz D., Werlin S.L., Fish D., Scanlon M., Hanaway P., Kugathasan S. Fecal calprotectin is useful in predicting disease relapse in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2008; 14: 669–673. doi: 10.1002/ibd.20376

21. Consigny Y., Modigliani R., Colombel J.F., Dupas J.L., Lemann M., Mary J.Y., Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Diges-

tives (GETAID). A simple biological score for predicting low risk of short-term relapse in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2006; 12: 551–557. doi: 10.1097/01.ibd.0000225334.60990.5b

22. Brignola C., Campieri M., Bazzocchi G., Faruggia P., Tragnone A., Lanfranchi G.A. A laboratory index for predicting relapse in asymptomatic patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1986; 91: 1490–1494. doi: 10.1016/0016-5085(86)90206-4

23. Bitton A., Peppercorn M.A., Antonioli D.A., Niles J.L., Shah S., Bousvaros A., Ransil B., Wild G., Cohen A., Edwardes M.D., Stevens A.C. Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2001; 120 (1): 13–20. doi: 10.1053/gast.2001.20912

24. Клинические рекомендации «Язвенный колит» (утв. Минздравом России). Режим доступа: <https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-iazvennyi-kolit-utv-minzdravom-rossii/>

Clinical guidelines «Ulcerative colitis» (approved by the Minzdrav of Russia). Available at: <https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-iazvennyi-kolit-utv-minzdravom-rossii/> [In Russian].

25. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Крона у взрослых (Проект). *Колонпроктология.* 2020; 19 (2): 8–38. doi: 10.33878/2073–7556–2020–19–2–8–38

Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of Crohn's disease in adults (Draft). *Kolonproktologiya = Coloproctology.* 2020; 19 (2): 8–38. [In Russian]. doi: 10.33878 / 2073–7556–2020–19–2–8–38

26. Katsaros M., Paschos P., Giouleme O. Red cell distribution width as a marker of activity in inflammatory bowel disease: a narrative review. *Ann. Gastroenterol.* 2020; 33 (4): 348–354. doi: 10.20524/aog.2020.0486

27. Шиффман Ф.Дж. Патофизиология крови. М.; СПб.: БИНОМ–Невский диалог, 2000. 448 с.

Schiffman F.J. Pathophysiology of blood. Moscow – Saint-Petersburg: BINOM Publishing House–Nevsky Dialogue, 2000. 448 p. [In Russian].

28. Scoville E.A., Allaman M.M., Adams D.W., Motley A.K., Peyton S.C., Ferguson S.L., Horst S.N., Williams C.S., Beaulieu D.B., Schwartz D.A., Wilson K.T., Coburn L.A. Serum polyunsaturated fatty acids correlate with serum cytokines and clinical disease activity in Crohn's disease. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 2882. doi: 10.1038/s41598-019-39232-z

29. Wiese D.M., Horst S.N., Brown C.T., Allaman M.M., Hodges M.E., Slaughter J.C., Druce J.P., Beaulieu D.B., Schwartz D.A., Wilson K.T., Coburn L.A. Serum fatty acids are correlated with inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *PLoS ONE.* 2016; 11 (5): e0156387. doi: 10.1371/journal.pone.0156387

30. Gatto C., Milanick M. Red blood cell Na pump: Insights from species differences. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2009; 42 (3): 192–200. doi: 10.1016/j.bcmd.2009.01.011

31. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты. *Успехи физиол. наук.* 2001; 30 (3): 66–76.

Zinchuk V.V. Deformability of erythrocytes: physiological aspects. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in Physiological Sciences.* 2001; 30 (3): 66–76. [In Russian].

32. Михайленко Е.Г., Василенко Л.В. Прогнозирование вероятности развития гестозов. *Акушерство и гинекол.* 1991; 6: 10–13.

Mikhailenko E.G., Vasilenko L.V. Predicting the likelihood of developing gestosis. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology.* 1991; 6: 10–13. [In Russian].

33. Uyarel H., Ergelen M., Cicek G., Kaya M.G., Ayhan E., Turkkan C., Yildirim E., Kirbas V., Onturk E.T., Erer H.B., Yesilcimen K., Gibson C.M. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Coron. Artery Dis.* 2011; 22 (3): 138–144. doi: 10.1097/MCA.0b013e328342c77b

34. von Schacky C. Omega-3 Index and sudden cardiac death. *Nutrients.* 2010; 2 (3): 375–388. doi: 10.3390/nu2030375

35. Salisbury A.C., Amin A.P., Harris W.S., Chan P.S., Gosch K.L., Rich M.W., O'Keefe J.H.Jr, Spertus J.A. Predictors of omega-3 index in patients with acute myocardial infarction. *Mayo Clinic. Proc.* 2011; 86 (7): 626–632. doi: 10.4065/mcp.2011.0005

36. Harris W.S., Kennedy K.F., O'Keefe J.H.Jr, Spertus J.A. Red blood cell fatty acid levels improve GRACE score prediction of 2-yr mortality in patients with myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2013; 168 (1): 53–59. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.09.076

37. Groen K., Maltby V.E., Scott R.J., Tajouri L., Lechner-Scott J. Erythrocyte microRNAs show biomarker potential and implicate multiple sclerosis susceptibility genes. *Clin. Transl. Med.* 2020; 10 (1): 74–90. doi: 10.1002/ctm2.22

38. Pedrazzani C., Tripepi M., Turri G., Fernandes E., Scotton G., Conci S., Campagnaro T., Ruzzenente A., Guglielmi A. Prognostic value of red cell distribution width (RDW) in colorectal cancer. Results from a single-center cohort on 591 patients. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1): 1072. doi: 10.1038/s41598-020-57721-4

Сведения об авторах:

Маргарита Витальевна Кручинина, д.м.н., ORCID: 0000-0003-0077-3823, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Ирина Олеговна Светлова, к.м.н., e-mail: iosvetlova@yandex.ru

Александра Викторовна Азгалдян, e-mail: communis2016@gmail.com

Андрей Александрович Громов, к.м.н., e-mail: gromov.center@rambler.ru

Владимир Михайлович Генералов, д.т.н., ORCID: 0000-0001-7544-187X, e-mail: vmgeneral@mail.ru

Ирина Николаевна Яковина, к.т.н., e-mail: i1i2i3@bk.ru

Александр Александрович Шестов, к.х.н., e-mail: ashestov@gmail.com

Information about the authors:

Margarita V. Kruchinina, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0003-0077-3823, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Irina O. Svetlova, candidate of medical sciences, e-mail: iosvetlova@yandex.ru

Alexandra V. Azgaldyan, e-mail: communis2016@gmail.com

Andrey A. Gromov, candidate of medical sciences, e-mail: gromov.center@rambler.ru

Vladimir M. Generalov, doctor of technical sciences, ORCID: 0000-0001-7544-187X, e-mail: vmgeneral@mail.ru

Irina N. Yakovina, candidate of technical sciences, e-mail: i1i2i3@bk.ru

Alexander A. Shestov, candidate of chemical sciences, e-mail: ashestov@gmail.com

Поступила в редакцию 22.07.2021

Принята к публикации 19.09.2021

Received 22.07.2021

Accepted 19.09.2021

Мониторинг открытой популяции среднеурбанизированного сибирского города: пятнадцатилетние тренды артериальной гипертензии у мужчин

Е.В. Акимова, Е.И. Гакова, М.М. Каюмова, Т.И. Петелина

Тюменский кардиологический научный центр Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
625026, г. Тюмень, ул. Мельникайте, 111

Резюме

Артериальная гипертензия (АГ) остается одним из самых распространенных заболеваний в развитых странах мира, при этом отмечается тенденция к увеличению частоты АГ по мере роста уровня урбанизации. Согласно данным эпидемиологических исследований по сибирскому региону конца прошлого века, неблагоприятная эпидемиологическая ситуация в отношении распространенности АГ среди лиц экономически востребованного возраста выявлена как у мужчин организованных популяций, занятых на нефтегазодобывающем комплексе региона Крайнего Севера, так и на открытых городских популяциях разной степени урбанизации. Целью исследования явилось определение динамики уровня и распространенности артериальной гипертензии у мужчин трудоспособного возраста за 15-летний период мониторинга открытой популяции среднеурбанизированного города Западной Сибири. **Материал и методы.** Два одномоментных эпидемиологических исследования были проведены по четырем десятилетиям жизни мужчин 25–64 лет, проживающих в Центральном административном округе г. Тюмени, в 1996 и 2010 гг. Выяснялась информированность участника скрининга о повышении артериального давления в анамнезе и учитывался прием гипотензивных препаратов в течение двух недель до обследования. АГ регистрировалась при уровнях систолического АД ≥ 140 мм рт. ст. и/или диастолического АД ≥ 90 мм рт. ст. **Результаты.** По данным 15-летнего мониторинга у мужчин открытой популяции среднеурбанизированного города Западной Сибири определена позитивная тенденция к снижению распространенности АГ за счет возрастной категории 25–34 лет. Снижение распространенности АГ у мужчин молодого возраста за 15-летний период мониторинга популяции установлено в связи с положительной динамикой уменьшения систолического АД в возрастной категории 25–34 лет. **Заключение.** Результаты настоящей работы могут служить базой и отправной точкой для развертывания комплексной профилактической программы в открытой популяции Тюмени, эффективность которой в значительной степени зависит от объективной оценки вектора движения эпидемиологической ситуации в отношении основных факторов риска ССЗ в различных возрастных категориях.

Ключевые слова: артериальное давление, артериальная гипертензия, мониторинг популяции, мужчины.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Акимова Е.В., e-mail: akimova@cardio.tmn.ru

Для цитирования: Акимова Е.В., Гакова Е.И., Каюмова М.М., Петелина Т.И. Мониторинг открытой популяции среднеурбанизированного сибирского города: пятнадцатилетние тренды артериальной гипертензии у мужчин. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 113–120. doi: 10.18699/SSMJ20210514

Monitoring an open population of the middle-organized Siberian city: fifteen-years trends of arterial hypertension in men

E.V. Akimova, E.I. Gakova, M.M. Kayumova, T.I. Petelina

Tyumen Cardiology Research Center of Tomsk National Research Medical Center of RAS
625026, Tyumen, Melnikayte str., 111

Abstract

Arterial hypertension remains one of the most common diseases in the developed countries of the world, while there is a tendency to increase the frequency of arterial hypertension as the level of urbanization increases. According to epidemiological studies in the Siberian region at the end of the last century, an unfavorable epidemiological situation regarding the prevalence of hypertension among people of economically desirable age was revealed both in men of

organized populations employed in the oil and gas complex of the Far North region and in open urban populations of varying degrees of urbanization. The aim of the study was to determine the dynamics of the levels and prevalence of arterial hypertension in men of working age over a 15-year period of monitoring the open population of the mid-urban city of Western Siberia. **Material and methods.** Two simultaneous epidemiological studies were conducted among men aged 25–64 over four decades of life in the Central Administrative District of Tyumen in 1996 and 2010. The screening participant was informed about the history of high blood pressure and taking antihypertensive drugs for two weeks before the examination was taken into account. AH was recorded at systolic blood pressure levels of 140 mm Hg. Art. and / or diastolic blood pressure ≥ 90 mm RT. Art. **Results.** According to the 15-year monitoring of men in the open population of the mid-urbanized city of Western Siberia, a positive trend was identified for a decrease in the prevalence of hypertension due to the age category of 25–34 years. A decrease in the prevalence of hypertension in young men over a 15-year period of the population monitoring was established in connection with the positive dynamics of a decrease in systolic blood pressure levels in the age category of 25–34 years. **Conclusion.** The results of this work can serve as a basis and starting point for the development of a comprehensive preventive program in the open population of Tyumen, the effectiveness of which largely depends on an objective assessment of the motion vector of the epidemiological situation with respect to the main risk factors for cardiovascular diseases in various age categories.

Key words: blood pressure, arterial hypertension, population monitoring, men.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Akimova E.V., e-mail: akimova@cardio.tmn.ru

Citation: Akimova E.V., Gakova E.I., Kayumova M.M., Petelina T.I. Monitoring an open population of the middle-organized Siberian city: fifteen-years trends of arterial hypertension in men. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 113–120. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210514

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) сегодня является одним из ведущих факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [1–4]. Во всем мире ею страдают по меньшей мере 970 млн человек. В развитых странах, по приблизительным оценкам, около 300 млн человек имеют повышенное артериальное давление (АД), что касается развивающихся стран, то эта цифра приближается к 650 млн человек. Согласно данным ВОЗ, АГ – одна из важнейших причин преждевременной смертности, и, к сожалению, данная проблема только усугубляется. К 2025 году, по предварительным оценкам, 1,56 млрд взрослого населения будут страдать данным заболеванием [5].

К немодифицируемым факторам риска развития АГ кроме генетических относятся такие, как возраст (риск инсульта удваивается каждые десять лет после 55 лет) и пол (мужской пол имеет большую степень риска ССЗ, чем женский) [3, 6, 7]. В отношении модифицируемых факторов риска неоднократно доказано, что отказ от курения, уменьшение потребления соли, регулярные физические нагрузки, наличие в рационе достаточного количества овощей и фруктов, а также исключение избыточного потребления алкоголя значительно снижают риск развития АГ [8].

Несмотря на прогрессирование цифровизации в Российской Федерации, медико-информационные системы и медицинская статистика не в полной мере отражают реальную картину заболе-

ваемости в популяции. Те данные, которыми мы располагаем, не могут полностью объяснить высокий уровень распространенности АГ и других факторов риска ССЗ, в том числе поведенческого и социального их компонента в процессе мониторинга популяции, к тому же затруднена оценка долгосрочного прогноза и требуемого количества профилактических и лечебных мероприятий для предотвращения распространения ССЗ [9].

Одна из ключевых ролей в данном вопросе отводится политике здравоохранения и государства в целом, цель которой стоит в создании здорового образа жизни более доступным для населения и тем самым в мотивировании его к принятию и регулярному поддержанию такого жизненного уклада. Исходя из этого, мониторинг профиля факторов риска ССЗ, к числу наиболее важных из которых относится высокий уровень АД, представляется необходимым в условиях меняющегося общества в РФ и, в частности, в среднеурбанизированных городах Западной Сибири [3, 10, 11].

Показатели крупномасштабных популяционных исследований свидетельствуют о том, что связь АД с риском развития ССЗ устойчива и не зависит от пола и других характеристик популяции. Вместе с тем АД является непрерывно распределенной величиной, независимо от того, в какой группе населения оно измеряется, а граница между «нормальным» и «высоким» АД в определенной степени условна [12]. Согласно данным эпидемиологических исследований по сибирскому региону, неблагоприятная эпидемиологическая ситуация в отношении распространенности

АГ среди лиц экономически востребованного возраста выявлена как у мужчин региона Крайнего Севера, так и в открытых городских популяциях разной степени урбанизации [11, 13, 14].

Следовательно, проблема уточнения распространенности АГ в регионе остается чрезвычайно актуальной и требует дальнейшего изучения ее тенденций на популяционном уровне в процессе мониторинга. С учетом вектора изменения эпидемиологической ситуации в разных возрастных категориях мужчин экономически востребованного трудоспособного возраста необходима постоянная коррекция основных положений мероприятий по первичной профилактике ССЗ, планируемых в условиях среднеурбанизированных сибирских городов [14].

Целью исследования явилось определение динамики уровня и распространенности АГ у мужчин трудоспособного возраста за 15-летний период мониторинга открытой популяции среднеурбанизированного города Западной Сибири.

Материал и методы

Два одномоментных эпидемиологических исследования были проведены по четырем десятилетиям жизни мужчин 25–64 лет, проживающих в Центральном административном округе г. Тюмени, в 1996 и 2010 гг. Методом «случайных чисел» из избирательных списков среди мужчин 25–64 лет были сформированы репрезентативные выборки по 1000 человек каждая (по 250 человек в десятилетиях жизни: 25–34, 35–44, 45–54, 55–64 лет). Отклик на скрининге в 1996 г. составил 79,5 %, на скрининге в 2010 г. – 85,0 %. В табл. 1 представлена повозрастная структура обследованных. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом. До включения в исследование у всех участников получено письменное информированное согласие.

АД измерялось с точностью до 2 мм рт. ст., предпочтение отдавалось верхней четной цифре. Определялись средние значения для систолического (САД) и диастолического АД (ДАД). Выяснялась информированность участника скрининга о повышении АД в анамнезе и учитывался прием гипотензивных препаратов в течение двух недель до обследования. АГ регистрировалась при уровнях САД ≥ 140 мм рт. ст. и/или ДАД ≥ 90 мм рт. ст.

Стандартизация данных по возрасту проводилась прямым методом стандартизации с использованием по возрастной структуры городского населения РФ – мужчин в возрастной категории 25–64 лет по четырем десятилетиям жизни.

Проверка соответствия распределения результатов измерений в каждом опыте эксперимента закону нормального распределения осуществлялась с помощью анализа стандартизованных показателей асимметрии и эксцесса, значения которых должны находиться в интервале от $-2,0$ до $+2,0$, а также по критериям Пирсона и Колмогорова – Смирнова. Распределение в популяции количественных показателей оценивалось с помощью процентильного анализа. Анализ проводился отдельно в возрастных категориях 25–34, 35–44, 45–54, 55–64 лет, а также для объединенного массива 25–64 лет. Различия в динамике определяли с помощью парного t-критерия и дисперсионного анализа повторных измерений. Статистически значимыми считались различия показателей на уровне значимости $p < 0,05$. Для категориальных переменных результаты представлены как доля (в процентах) в четырех анализируемых десятилетиях жизни. Для оценки значимости различий показателей между группами использовался критерий Пирсона χ^2 . Статистически значимыми считались значения $p < 0,05$.

Результаты

В открытой популяции у мужчин 25–64 лет распределение показателей САД и ДАД по данным как первого, так и на второго кардиологического скрининга носило нормальный характер. По крайним децилям распределение САД и ДАД

Таблица 1. Структура обследованных мужчин тюменской популяции на скринингах в 1996 и 2010 гг. по возрасту

Table 1. The structure of the examined men of the Tyumen population at screenings in 1996 and 2010 by age

Возрастная категория (лет)	Число включенных в выборку, <i>n</i>		Число обследованных, <i>n</i>		Отклик, %	
	I скрининг	II скрининг	I скрининг	II скрининг	I скрининг	II скрининг
25–34	250	250	200	177	80,0	70,8
35–44	250	250	194	228	77,6	91,2
45–54	250	250	205	231	82,0	92,4
55–64	250	250	196	214	78,4	85,6
25–64	1000	1000	795	850	79,5	85,0

Таблица 2. Величина САД у мужчин открытой популяции по данным первого и второго скринингов**Table 2.** Systolic blood pressure in men of the open population according to the first and second screenings

Возраст, лет	САД, мм рт. ст.							ДАД, мм рт. ст.						
	M	m	Процентили, %					M	m	Процентили, %				
			10	25	50	10	90			10	25	50	10	90
I скрининг														
25–34	127,3	2,0	110	120	126	136	145	83,3	1,3	70	78	84	90	94
35–44	131,9***	2,2	113	120	131	141	151	86,6***	1,3	74	80	88	93	98
45–54	138,0***	2,5	116	125	138	150	161	89,2**	1,3	77	83	89	95	100
55–64	148,6***	2,9	122	135	145	162	175	90,7*	1,6	76	82	90	98	107
25–64	136,5	1,3	115	122	135	146	162	87,4	0,7	75	80	87	94	100
СП	134,5	–	–	–	–	–	–	86,7	–	–	–	–	–	–
II скрининг														
25–34	122,0	13,5	103	112	122	131	140	81,6	7,1	72	77	81	86	90
35–44	130,3***	15,6	110	120	130	140	153	86,5***	9,3	74	80	85	90	100
45–54	138,6***	18,2	118	124	139	151	164	89,7***	9,9	77	83	90	97	105
55–64	140,6	17,2	120	129	140	152	166	92,5**	9,5	81	84	92	100	108
25–64	133,4	17,8	110	120	130	145	160	87,9	9,9	76	80	87	95	101
СП	130,8	–	–	–	–	–	–	86,9	–	–	–	–	–	–

Примечание. Здесь и в табл. 3 обозначены статистически значимые различия между двумя последующими возрастными группами: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$; СП – стандартизованный по возрасту показатель.

показало большее разнообразие показателей на втором скрининге.

По средним уровням и процентильному распределению наиболее низкие показатели САД на первом и втором скринингах отмечались в третьем десятилетии жизни. По результатам первого скрининга САД существенно нарастало в каждой последующей возрастной группе ($p < 0,001$), в результате за весь анализируемый возрастной период средний уровень САД увеличился в 1,7 раза (табл. 2). По результатам второго скрининга САД существенно нарастало от третьего до пятого десятилетия жизни (122,0–138,6 мм рт. ст., $p < 0,001$), в шестом десятилетии оставаясь практически стабильным. В целом за весь анализируемый возрастной период средний уровень САД повысился в 1,2 раза (см. табл. 2). ДАД по результатам обоих скринингов статистически значимо нарастало с возрастом от третьего до шестого десятилетия жизни, увеличиваясь в обоих случаях за изучаемый возрастной период в 1,1 раза (см. табл. 2).

Распространенность АГ по результатам первого скрининга в мужской популяции существенно нарастала с увеличением возраста на протяжении всего изучаемого возрастного периода. По результатам второго скрининга с увеличением возраста распространенность АГ также возрастала, значимо увеличиваясь при переходе от тре-

тьего к четвертому и от четвертого к пятому десятилетиям жизни (табл. 3). За 15-летний период мониторинга мужской популяции существенных различий по динамике распространенности АГ не отмечалось. Вместе с тем статистически значимое снижение показателя выявлено в младшей возрастной категории – третьем десятилетии жизни (см. табл. 3). Такая тенденция имела место за

Таблица 3. Динамика распространенности артериальной гипертензии у мужчин 25–64 лет открытой популяции Тюмени**Table 3.** The dynamics of arterial hypertension prevalence in men aged 25–44 years in the open population of Tyumen

Возраст, лет	I скрининг	II скрининг
25–34	69 (34,5 %)	36 ^{##} (20,3 %)
35–44	92** (47,4 %)	126*** (55,3 %)
45–54	124* (60,5 %)	159** (68,8 %)
55–64	147** (75,0 %)	152 (71,0 %)
25–64	432 (54,3 %)	473 (55,6 %)
СП	(50,4 %)	(48,7 %)

Примечание. ## – отличие от величины соответствующего показателя на I скрининге статистически значимо при $p < 0,01$.

счет существенного уменьшения изолированной систолической АГ за период мониторинга мужской популяции в возрасте 25–34 лет, когда зарегистрированный средний уровень САД от 127,3 мм рт. ст. на первом кардиологическом скрининге снизился до 122,0 мм. рт. ст. на втором кардиологическом скрининге ($p < 0,01$), см. табл. 2.

Обсуждение

Возрастная динамика средних величин и отрезных точек, соответствующих верхним 10 % распределения САД и ДАД в тюменской популяции, была сопоставимой с данными, полученными по мегаполису Западной Сибири – г. Новосибирску. В целом распределение САД и ДАД по возрасту у мужчин г. Тюмени были несколько выше по обоим показателям сравнительно с результатами последнего скрининга в г. Новосибирске в каждой возрастной группе и, как в большинстве других эпидемиологических исследований, существенно увеличивались с возрастом [11]. Распространенность повышенного АД в среднем по регионам, включенным в исследование ЭССЕ-РФ, среди мужчин 25–64 лет составила 41,1 % [15]. Эти результаты, даже с учетом некоторого снижения показателя на втором скрининге, были все же значительно меньше полученных нами и отражали, скорее, тенденции к снижению показателя у молодых мужчин г. Тюмени, выявленные на втором кардиологическом скрининге. Вместе с тем, в соответствии с данными первого кардиологического скрининга в г. Тюмени, распространенность АГ по результатам национальной российской выборки в половозрастной категории, соответствующей тюменским результатам, также была меньше [16].

Анализ данных промежуточного исследования на тюменской популяции показал, что существенной динамики распространенности АГ у мужчин за время пятилетнего мониторинга популяции с 1995 по 2000 г. не отмечалось [14]. Следовательно, полученные тенденции к снижению распространенности АГ у мужчин молодого возраста связаны, вероятно, с изменением поведенческих факторов, факторов хронического социального стресса и отношения к своему здоровью в связи с изменением менталитета и внедрением норм здорового образа жизни в России последнего десятилетия, что в соответствии с данными, полученными на тюменской популяции, коснулось преимущественно этой возрастной категории. Так, мужчины в возрасте 25–34 лет, особенно с повышением уровня образования, проявляли большее стремление в отношении заботы о своем здоровье, в этой же возрастной категории определялось наибольшее число никогда не куривших

и стремившихся повышать свою физическую активность [17]. В соответствии с данными литературы, можно предположить благоприятное влияние на позитивное снижение АД в популяции и неконвенционных факторов риска ССЗ, которые у мужчин молодого возраста г. Тюмени также оказались наименее выраженными [18].

Распространенность АГ в РФ, по данным исследования ЭССЕ-РФ, остается на стабильно высоком уровне [19]. Вследствие наблюдающегося демографического старения российской популяции прогнозируемо увеличивается общее число больных АГ. В российском исследовании у мужчин по стандартизованному по возрасту показателю, согласно данным первого и второго этапов исследования ЭССЕ-РФ, показана тенденция к росту распространенности АГ [15, 19], тогда как в настоящей работе по динамике распространенности АГ, прослеженной десятилетием ранее, показатель оставался стабильно высоким. В связи с этим оказалась оправданной и интерпретация полученных данных на тюменской популяции с точки зрения их динамики в группах молодого возраста, где распространенность АГ в четвертом десятилетии оказалась значительно выше российских данных, а в третьем десятилетии снизилась до российских результатов к 2010 г. Так, если по общепопуляционному показателю распространенности АГ в РФ у мужчин (49,1 %) была сопоставимой с таковой в тюменской популяции по результатам базового исследования среди неорганизованного населения г. Тюмени (48,7 %) [14, 19], то среди мужчин молодого возраста ситуация была несколько иной.

Общероссийские результаты, даже с учетом некоторого снижения показателя на втором скрининге в г. Тюмени, были все же значительно меньше полученных нами и отражали, скорее, тенденции к снижению показателя у молодых мужчин г. Тюмени, выявленные на втором кардиологическом скрининге. Тем не менее, поскольку данные ЭССЕ-РФ были получены на выборках, сформированных на базе лечебно-профилактических учреждений (поликлиник), настоящие результаты, полученные на открытой популяции, не могут быть вполне сопоставимыми с результатами ЭССЕ-РФ. Это относится и к данным, полученным в рамках исследования ЭССЕ-РФ в г. Тюмени, где САД и ДАД в группах мужчин молодого возраста было значительно меньше, что определило и более низкую распространенность АГ у молодых мужчин относительно результатов, полученных в настоящем исследовании [9].

Вместе с тем, в соответствии с данными первого кардиологического скрининга в г. Тюмени, распространенность АГ по результатам нацио-

нальной российской выборки конца прошлого века в половозрастной категории, соответствующей тюменским данным, также была несколько ниже [10]. Негативные результаты среди лиц молодого возраста, полученные на открытой популяции г. Тюмени, объясняются, вероятно, большим числом мигрантов с территорий Крайнего Севера, где у работников, занятых на предприятиях нефтегазодобывающего комплекса, установлена высокая распространенность АГ [13]. Кроме того, по данным наших предыдущих исследований, в группах молодого возраста тюменской популяции определен высокий уровень факторов хронического социального стресса, в частности, стресса в семье и на рабочем месте, также, возможно, оказавшим влияние на высокий популяционный уровень распространенности АГ у молодых мужчин [18].

Результаты настоящей работы могут служить базой и отправной точкой для развертывания комплексной профилактической программы в открытой популяции Тюмени, эффективность которой в значительной степени зависит от объективной оценки вектора движения эпидемиологической ситуации в отношении основных факторов риска ССЗ в различных возрастных категориях.

Выводы

1. По данным 15-летнего мониторинга, у мужчин открытой популяции среднеурбанизированного города Западной Сибири определена позитивная тенденция к уменьшению распространенности АГ за счет возрастной категории 25–34 лет.

2. Снижение распространенности АГ у мужчин молодого возраста за 15-летний период мониторинга популяции установлено в связи с положительной динамикой уменьшения уровней систолического АД в возрастной категории 25–34 лет.

Список литературы / References

1. Timmis A., Townsend N., Gale C., Torbica A., Lettino M., Petersen S.E., Mossialos E., Maggioni A.P., Kazakevich D., May H.M., De Smedt D., Flater M., Zulke L., Beltram J.F., Huculeci R., Tavazzi L., Hindricks G., Bucks J., Kasadey B., Achenbach S., Wright L., Vardas P. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019 *Eur. Heart J.* 2020; 41 (1): 12–85. doi: 10.1093/eurheartj/ehz859
2. Чазова И.Е., Жернакова Ю.В. От имени экспертов. Клинические рекомендации. Диагностика и лечение артериальной гипертонии. *Систем. гипертензии.* 2019; 16 (1): 6–31. doi: 10.26442/2075082X.2019.1.190179

Chazova I.E., Zhernakova Yu.V. On behalf of the experts. Clinical guidelines. Diagnosis and treatment of arterial hypertension. *Sistemnye gipertenzii = Systemic Hypertension.* 2019; 16 (1): 6–31. [In Russian]. doi: 10.26442/2075082X.2019.1.190179

3. Кардиоваскулярная профилактика 2017. Российские национальные рекомендации. *Рос. кардиол. ж.* 2018; 23 (6): 7–122. doi: 10.15829/1560-4071-2018-6-7-122

Cardiovascular prevention 2017. National guidelines. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology.* 2018; 23 (6): 7–122. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2018-6-7-122

4. Оганов Р.Г., Симаненков В.И., Бакулин И.Г., Бакулина Н.В., Барбараш О.Л., Бойцов С.А., Болдуева С.А., Гарганеева Н.П., Дошицин В.Л., Каратеев А.Е., Котовская Ю.В., Лила А.М., Лукьянов М.М., Морозова Т.Е., Переверзев А.П., Петрова М.М., Поздняков Ю.М., Сыров А.В., Тарасов А.В., Ткачева О.Н., Шальнова С.А. Коморбидная патология в клинической практике. Алгоритмы диагностики и лечения. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика.* 2019; 18 (1): 5–66. doi: 10.15829/1728-8800-2019-1-5-66

Oganov R.G., Simanenkov V.I., Bakulin I.G., Bakulina N.V., Barbarash O.L., Boytsov S.A., Boldueva S.A., Garganeeva N.P., Doshchitsin V.L., Karateev A.E., Kotovskaya Yu.V., Lila A.M., Lukyanov M.M., Morozova T.E., Pereverzev A.P., Petrova M.M., Pozdnyakov Yu.M., Syrov A.V., Tarasov A.V., Tkacheva O.N., Shalnova S.A. Comorbidities in clinical practice. Algorithms for diagnostics and treatment. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2019; 18 (1): 5–66. [In Russian]. doi: 10.15829/1728-8800-2019-1-5-66

5. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013; 310 (20): 2191–2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053

6. Конради А.О. Эпигенетические механизмы в становлении и прогрессировании артериальной гипертензии и ее осложнений. *Артериал. гипертензия.* 2015; 21 (6): 559–566. doi: 10.18705/1607-419X-2015-21-6-559-566

Konradi A.O. Epigenetic mechanisms in hypertension and its complications. *Arterial'naya gipertenziya = Arterial Hypertension.* 2015; 21 (6): 559–566. [In Russian]. doi: 10.18705/1607-419X-2015-21-6-559-566

7. Ротарь О.П., Толкунова К.М. Сосудистое старение в концепциях EVA и SUPERNOVA: непрерывный поиск повреждающих и протективных факторов. *Артериал. гипертензия.* 2020; 26 (2): 133–145. doi: 10.18705/1607-419X-2020-26-2-133-1

Rotar O.P., Tolkunova K.M. Vascular aging in the EVA and SUPERNOVA concepts: continuous search for damaging and protective factors. *Arterial'naya gipertenziya = Arterial Hypertension.* 2020; 26 (2):

133–145. [In Russian]. doi: 10.18705/1607-419X-2020-26-2-133-145

8. Arnett D.K., Blumenthal R.S., Albert M.A., Buoker A.B., Goldberger E.Z.D., Hahn E.J., Himmelfarb C.D., Khera A., Lloyd-Jones D., McEvoy J.W., Michos E.D., Miedema M.D., Munoz D., Smith S.C., Virani S.S., Williams K.A., Yeboah J., Ziaeian B. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019; 140: 563–595. doi: 10.1161/CIR.0000000000000678

9. Townsend N., Wilson L., Bhatnagar P., Wickramasinghe K., Rayner M., Nicols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur. Heart J.* 2016; 37 (42): 3232–3245. doi: 10.1093/eurheartj/ehy342

10. Шальнова С.А., Деев А.Д., Баланова Ю.А., Капустина А.В., Имаева А.Э., Муромцева Г.А., Киселева Н.В., Бойцов С.А. Двадцатилетние тренды ожирения и артериальной гипертензии и их ассоциации в России. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*. 2017; 16 (4): 4–10. doi: 10.15829/1728-8800-2017-4-4-10

Shalnova S.A., Deev A.D., Balanova Yu.A., Kapustina A.V., Imaeva A.E., Muromtseva G.A., Kiseleva N.V., Boytsov S.A. Twenty years trends of obesity and arterial hypertension and their association in Russia. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2017; 16 (4): 4–10. [In Russian]. doi: 10.15829/1728-8800-2017-4-4-10

11. Гафаров В.В., Гафарова А.В., Гагулин И.В. Артериальное давление, ишемическая болезнь сердца и психосоциальные факторы (эпидемиологическое исследование на основе программы ВОЗ «MONICA-психосоциальная»). *Артериал. гипертензия*. 2010; 16 (6): 608–612. doi: 10.18705/1607-419X-2010-6-

Gafarov V.V., Gafarova A.V., Gagulin I.V. Blood pressure, coronary artery disease and psychosocial factors (epidemiological study based program WHO «MONICA-psychosocial»). *Arterial'naya gipertenziya = Arterial Hypertension*. 2010; 16 (6): 608–612. [In Russian]. doi: 10.18705/1607-419X-2010-6-

12. Stamler J., Stamler R., Neaton J.D. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks: US population data. *Arch. Intern. Med.* 1993; 153: 598–615. doi: 10.1001/archinte.153.5.598

13. Гафаров В.В., Акимова Е.В. Динамика распространенности основных факторов риска ИБС у мужчин, занятых экспедиционно-вахтовой формой труда на нефтедобывающем комплексе Западной Сибири. *Терапевт. арх.* 1995; 67 (1): 22–25.

Gafarov V.V., Akimova E.V. Prevalence of major risk factors for coronary heart disease in men employed expeditionary form of shift work on oil production

complex of Western Siberia. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive*. 1995; 67 (1): 22–25. [In Russian].

14. Акимова Е.В., Гафаров В.В., Кузнецов В.А. Пятилетняя динамика основных факторов риска развития ишемической болезни сердца среди неорганизованного населения Тюмени. *Терапевт. арх.* 2005; 77 (9): 31–35.

Akimova E.V., Gafarov V.V., Kuznetsov V.A. Five-year trends in main risk of coronary heart disease among open population of Tyumen. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*. 2005; 77 (9): 31–35. [In Russian].

15. Муромцева Г.А., Концевая А.В., Константинов В.В., Артамонова Г.В., Гатагонова Т.М., Дупляков Д.В., Ефанов А.Ю., Жернакова Ю.В., Ильин В.А., Конради А.О., Либис Р.А., Минаков Э.В., Недогода С.В., Ощепкова Е.В., Романчук С.В., Ротарь О.П., Трубачева И.А., Деев А.Д., Шальнова С.А., Чазова И.Е., Шляхто Е.В., Бойцов С.А., Баланова Ю.А., Гомыранова Н.В., Евстифеева С.Е., Капустина А.В., Литинская О.А., Мамедов М.Н., Метельская В.А., Оганов Р.Г., ... Толпаров Г.В. Распространенность факторов риска неинфекционных заболеваний в российской популяции в 2012–2013 гг. Результаты исследования ЭССЕ-РФ. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*. 2014; 13 (6): 4–11. doi: 10.15829/1728-8800-2014-6-4-11

Muromtseva G.A., Kontsevaya A.V., Konstantinov V.V., Artamonova G.V., Gatagonova T.M., Duplyakov D.V., Efanov A.Yu., Zhernakova Yu.V., Il'in V.A., Konradi A.O., Libis R.A., Minakov E.V., Nedogoda S.V., Oshchepkova E.V., Romanchuk S.V., Rotar O.P., Trubacheva I.A., Deev A.D., Shalnova S.A., Chazova I.E., Shlyakhto E.V., Boytsov S.A., Balanova Yu.A., Gomyranova N.V., Evstifeeva S.E., Kapustina A.V., Litinskaya O.A., Mamedov M.N., Metelskaya V.A., Oganov R.G., ... Tolparov G.V. The prevalence of non-infectious diseases risk factors in Russian population in 2012–2013 years. The results of ECVD-RF. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014; 13 (6): 4–11. [In Russian]. doi: 10.15829/1728-8800-2014-6-4-11

16. Шальнова С.А., Деев А.Д., Оганов Р.Г., Шестов Д.Б. Роль систолического и диастолического артериального давления для прогноза смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*. 2002; 1 (1): 10–15.

Shalnova S.A., Deev A.D., Oganov R.G., Shestov D.B. The role of systolic and diastolic blood pressure in predicting mortality from cardiovascular disease. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2002; 1 (1): 10–15. [In Russian].

17. Акимов А.М. Отношение мужчин к здоровью: образовательные предпочтения. *Изв. вузов. Социол. Экон. Политика*. 2013; (4): 50–52.

Akimov A.M. The attitude of men to health: educational preferences *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Sotsiologiya. Ekonomika. Politika = Pro-*

ceedings of Higher Educational Institutions. Sociology. Economics. Politics. 2013; (4): 50–52. [In Russian].

18. Акимов А.М., Каюмова М.М., Акимов М.Ю., Кузнецов В.А. Стресс в семье в открытой городской популяции, гендерные различия. *Сиб. науч. мед. ж.* 2018; 18 (4): 127–129. doi: 10.15372/SSMJ20180417

Akimov A.M., Kayumova M.M., Akimov M.Yu., Kuznetsov V.A. Stress in the family in the open urban population, gender differences. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2018; 18 (4): 127–129. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20180417

19. Баланова Ю.А., Шальнова С.А., Имаева А.Э., Капустина А.В., Муромцева Г.А., Евстифеева С.Е., Тарасов В.И., Редько А.Н., Викторова И.А., Прищепа Н.Н., Якушин С.С., Бойцов С.А., Драпкина О.М., Константинов В.В., Покровская М.С., Ефимова И.А., Сивакова О.В., Алексеенко С.Н., Губарев С.В., Ливзан М.А., Журавлева И.А., Рожкова М.Ю., Везикова Н.Н., Скопец И.С., Филиппов Е.В., Добрынина Н.В.,

Никулина Н.Н., Переверзева К.Г., Мосейчук К.А. Распространенность артериальной гипертензии, охват лечением и эффективность в Российской Федерации (данные наблюдательного исследования ЭССЕ-РФ-2). *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2019; 15 (4): 450–466. doi: 10.20996/1819-6446-2019-15-4-450-466

Balanova Yu.A., Shalnova S.A., Imaeva A.E., Kapustina A.V., Muromtseva G.A., Evstifeeva S.E., Tarasov V.I., Redko A.N., Victorova I.A., Prishchepa N.N., Yakushin S.S., Boytsov S.A., Drapkina O.M., Konstantinov V.B., Pokrovskaya M.S., Efimova I.A., Sivakova O.V., Alekseenko S.N., Gubarev S.V., Livzan M.A., Zhuravleva I.A., Rozhkova M.Yu., Vezikova N.N., Skopets I.S., Filippov E.V., Dobrynina N.V., Nikulina N.N., Pereverzeva K.G., Moseichuk K.A. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Russian Federation (Data of Observational ESSE-RF-2 Study). *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii = Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2019; 15 (4): 450–466. [In Russian]. doi: 10.20996/1819-6446-2019-15-4-450-466

Сведения об авторах:

Екатерина Викторовна Акимова, д.м.н., ORCID: 0000-0002-9961-5616, e-mail: akimovaev@infarkta.net

Екатерина Ивановна Гакова, к.м.н., ORCID: 0000-0002-0225-697X, e-mail: gakova@infarkta.net

Марина Михайловна Каюмова, к.м.н., ORCID: 0000-0001-5326-119X, e-mail: kayumova@infarkta.net

Татьяна Ивановна Петелина, д.м.н., ORCID: 0000-0001-6251-4179, e-mail: petelina@infarkta.net

Information about authors:

Ekaterina V. Akimova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9961-5616, e-mail: akimovaev@infarkta.net

Ekaterina I. Gakova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-0225-697X, e-mail: gakova@infarkta.net

Marina M. Kayumova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-5326-119X, e-mail: kayumova@infarkta.net

Tatiana I. Petelina, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6251-4179, e-mail: petelina@infarkta.net

Поступила в редакцию 24.04.2021

После доработки 25.05.2021

Принята к публикации 13.06.2021

Received 24.04.2021

Revision received 25.05.2021

Accepted 13.06.2021

Компоненты метаболического синдрома по разным критериям оценки среди женщин среднеурбанизированного города Западной Сибири

М.М. Каюмова, Е.И. Гакова, Т.И. Петелина, Е.В. Акимова

Тюменский кардиологический научный центр Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
625026, г. Тюмень, ул. Мельникайте, 111

Резюме

Распространенность компонентов метаболического синдрома на популяционном уровне определялась преимущественно на контингентах, ограниченных возрастом, критериями его оценки, либо на селективных выборках населения, тогда как проведение корректных эпидемиологических исследований на открытых женских популяциях с использованием разных критериев оценки представляется крайне актуальным. Цель работы – установление распространенности компонентов метаболического синдрома в открытой женской популяции по разным критериям оценки (на модели г. Тюмени). **Материал и методы.** Кросс-секционное эпидемиологическое исследование проводилось среди лиц женского пола одного из административных округов г. Тюмени. Репрезентативная выборка была сформирована из избирательных списков среди женщин 25–64 лет методом «случайных чисел» – 1000 обследуемых (по 250 лиц в четырех десятилетиях жизни), отклик на исследование составил 70,3 %. Для анализа использованы критерии оценки метаболического синдрома NCEP ATP III (2004) и IDF (2005). **Результаты.** В открытой популяции среднеурбанизированного города Западной Сибири среди женщин 25–64 лет выявлена высокая распространенность абдоминального ожирения по критериям NCEP ATP III и IDF оценки стандартизованного по возрасту показателя (33,5 и 49,8 % соответственно), определена положительная связь с возрастом. Распространенность артериальной гипертензии, гипергликемии и гипертриглицеридемии занимает срединные позиции с существенным ростом показателей в старших возрастных категориях. У женщин городской популяции выявлена высокая распространенность гипохолестеринемии липопротеинов высокой плотности в молодом и среднем возрасте (от 18,5 до 31,3 %). **Заключение.** Полученные данные распространенности компонентов метаболического синдрома у женщин открытой популяции позволяют определить группы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и наметить мероприятия по первичной профилактике среди населения среднеурбанизированного города Западной Сибири.

Ключевые слова: открытая популяция, женщины, компоненты метаболического синдрома.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Каюмова М.М., e-mail: kayumova@infarkta.net

Для цитирования: Каюмова М.М., Гакова Е.И., Петелина Т.И., Акимова Е.В. Компоненты метаболического синдрома по разным критериям оценки среди женщин среднеурбанизированного города Западной Сибири. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 121–128. doi: 10.18699/SSMJ20210515

Metabolic syndrome components for different assessment criteria among women of a middle-urbanized city of Western Siberia

M.M. Kayumova, E.I. Gakova, T.I. Petelina, E.V. Akimova

Tyumen Cardiology Research Center of Tomsk National Research Medical Center of RAS
625026, Tyumen, Melnikayte str., 111

Abstract

The prevalence of metabolic syndrome components at the population level was determined mainly in age-limited contingents, by criteria for assessing metabolic syndrome, or on selective samples of the population, while conducting correct epidemiological studies in open female populations to study the prevalence of metabolic syndrome components according to various assessment criteria seems to be extremely relevant. Aim of the study was to establish the prevalence of metabolic syndrome components in an open female population according to different assessment criteria (on the

model of Tyumen). **Material and methods.** A cross-sectional epidemiological study was carried out among females in one of the administrative districts of Tyumen. A representative sample was formed from electoral lists among women 25-64 years old by the method of «random numbers» – 1000 subjects (250 persons in four decades of life). The response to the study was 70.3 %. The NCEP ATP III (2004) and IDF (2005) criteria for assessing the metabolic syndrome were used for the analysis. **Results.** In an open population of a moderately urbanized city of Western Siberia among women 25-64 years old, a high prevalence of abdominal obesity was revealed according to various criteria for assessing age-standardized indicator (33.5 and 49.8 %), a positive relationship with age was determined. The prevalence of arterial hypertension, hyperglycemia and hypertriglyceridemia HTG occupies the middle position with a significant increase in indicators in older age categories. In women of the urban population, a high prevalence of high density lipoprotein hypocholesterolemia was revealed in young and middle age (from 18.5 to 31.3 %). **Conclusion.** The obtained data on the prevalence of metabolic syndrome components in women in an open population help to identify risk groups for the development of cardiovascular diseases and to outline measures for primary prevention among the population of a medium-urbanized city of Western Siberia.

Key words: open population, women, metabolic syndrome components.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Kayumova M.M., e-mail: kayumova@infarkta.net

Citation: Kayumova M.M., Gakova E.I., Petelina T.I., Akimova E.V. Metabolic syndrome components for different assessment criteria among women of a middle-urbanized city of Western Siberia. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 121–128. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210515

Введение

На основании данных мировых исследований установлено, что метаболический синдром (МС) и его компоненты являются факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) атеросклеротического генеза. Анализ результатов экспериментальных и клинических исследований показал, что наличие единого связующего звена между компонентами МС и формированием кластеров увеличивает атерогенный потенциал каждого компонента, что в конечном итоге в 2–3 раза ускоряет развитие атеросклероза [1].

Кросс-секционные исследования, касающиеся анализа распространенности компонентов МС, за последние два десятилетия выполнялись в США, в большинстве крупных европейских стран, а также в части стран Латинской Америки, Азии, Австралии [2, 3]. Определены региональные и этнические особенности формирования кластеров МС на основании эпидемиологических исследований, проведенных на различных популяциях. Показаны существенные вариации по окружности талии среди женщин, являющиеся предиктором возникновения кардиометаболических расстройств [1]. Необходимость дальнейшего изучения возможности и вариабельности развития осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы при различных кластерах МС, а также доминировании отдельных его компонентов широко обсуждается в научной литературе [4]. В рамках одномоментных и проспективных эпидемиологических исследований на сибирских популяциях были изучены ассоциации конвенци-

онных и неконвенционных факторов риска ССЗ среди женщин [5–7]. Вместе с тем распространенность компонентов МС на популяционном уровне определялась преимущественно на контингентах, ограниченных возрастом, критериями оценки МС, либо на селективных выборках населения. Следовательно, проведение корректных эпидемиологических исследований на открытых популяциях среди женщин трудоспособного возраста по изучению распространенности компонентов МС по разным критериям оценки в российских популяциях представляется крайне актуальным [8, 9].

Цель исследования – установление распространенности компонентов МС в открытой женской популяции по разным критериям оценки (на модели г. Тюмени).

Материал и методы

Кросс-секционное исследование проводилось среди лиц женского пола Центрального административного округа г. Тюмени. Репрезентативная выборка была сформирована из избирательных списков среди женщин 25–64 лет методом «случайных чисел» – 1000 человек (по 250 человек в четырех десятилетиях жизни), отклик составил 70,3 %.

Для анализа использованы следующие критерии оценки компонентов МС для женщин. Артериальная гипертензия (АГ): по критериям NCEP ATP III (2004), IDF (2005) – артериальное давление (АД) $\geq 130/85$ мм рт. ст., абдоминальное ожирение (АО) – окружность талии соответственно ≥ 88 и

≥ 80 см. Гипергликемия: NCEP ATR III – гликемия ≥ 6,1 ммоль/л, IDF – гликемия ≥ 5,6 ммоль/л. Гипертриглицеридемия (ГТГ): NCEP ATR III, IDF – содержание ТГ ≥ 1,7 ммоль/л. Гипохолестеринемия липопротеидов высокой плотности (гипо-ХС ЛПВП): NCEP ATR III, IDF – концентрация ХС ЛПВП < 1,29 ммоль/л.

Исследование выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, протокол его проведения одобрен этическими комитетами всех участвующих центров. До включения в исследование у всех участников получено письменное информированное согласие.

Стандартизация данных по возрасту проведена прямым методом с использованием повозрастной структуры городского населения 25–64 лет РФ. Сравнивали показатели в возрастных десятилетиях жизни и стандартизованные по возрасту (СП) с использованием критерия Пирсона χ^2 , статистически значимыми считали значения $p < 0,05$.

Результаты

СП распространенности АГ у женщин 25–64 лет открытой городской популяции (на модели г. Тюмени) составил 36,8 %. В возрастном диапазоне установлена статистически значимая положительная связь распространенности АГ с возрастом начиная с четвертого десятилетия жизни. Так, в диапазоне 35–44 – 45–54 лет она увеличилась в 3,3, в диапазоне 45–54 – 55–64 лет – в 1,4 раза. Существенные различия с СП определялись во всех возрастных категориях: в третьем и четвертом десятилетиях жизни распространенность АГ была существенно ниже, чем в популяции в

целом, в пятом и шестом десятилетиях – значимо выше (рис. 1).

Распространенность АО по разным критериям оценки МС формировала последовательный возрастной тренд у женщин тюменской популяции: за возрастной период 25–64 лет она увеличилась в 3,7 и 4,0 раза согласно критериям IDF и NCEP ATR соответственно (рис. 2). Во всех возрастных категориях выявлены статистически значимые различия распространенности АО с СП как по критериям IDF, так и по критериям NCEP ATR, в третьем и четвертом десятилетиях жизни она была существенно ниже СП, в возрастных десятилетиях 45–54 и 55–64 лет – значимо больше (см. рис. 2).

Независимо от критериев оценки, в популяции имел место существенный рост распространенности гипергликемии по возрасту от четвертого до шестого десятилетия жизни. По критериям IDF показатель увеличился за возрастной период в 4,6 раза (рис. 3). По критериям NCEP ATR темп прироста показателя по возрасту был еще более выраженным – распространенность гипергликемии возросла в 7,3 раза (рис. 4). В третьем, четвертом и шестом десятилетиях жизни также независимо от критериев оценки определялись статистически значимые различия по распространенности гипергликемии с общепопуляционным показателем. В группах молодого возраста (25–34 и 35–44 лет) величина показателя была существенно ниже, чем в целом в популяции, в возрасте 55–64 лет – значимо больше СП по обоим критериям оценки МС (см. рис. 3).

Распространенность ГТГ не формировала последовательного возрастного тренда в популяции, статистически значимая тенденция к ее росту определялась лишь при переходе от пятого к ше-

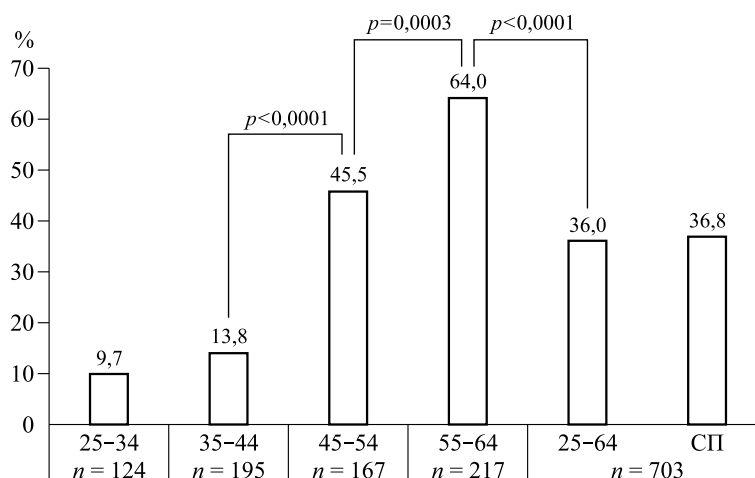


Рис. 1. Распространенность АГ у женщин 25–64 лет открытой популяции Тюмени по критериям IDF, NCEP ATR

Fig. 1. Prevalence of arterial hypertension in women 25–64 years old in the open population of Tyumen according to the criteria of IDF, NCEP ATR

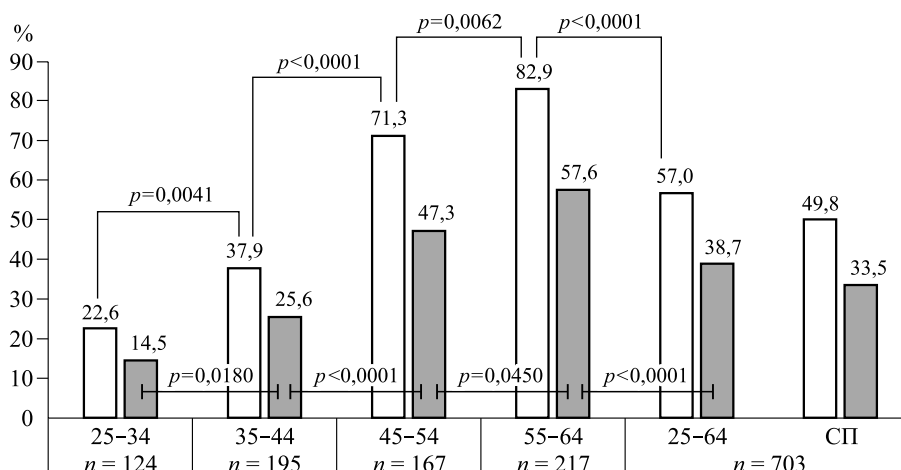


Рис. 2. Распространенность АО у женщин 25–64 лет открытой популяции Тюмени по критериям IDF (белые столбики) и NCEP ATP (серые столбики)

Fig. 2. Prevalence of abdominal obesity in women 25–64 years old in the open population of Tyumen according to the criteria of IDF (white bars) and NCEP ATP (grey bars)

стому десятилетию жизни (см. рис. 4). Величина показателя за весь возрастной период возросла в 2,1 раза. Статистически значимые различия по распространенности ГТГ с общепопуляционным показателем определялись в третьем, четвертом и шестом десятилетиях жизни. В возрастных категориях 25–34 и 35–44 лет она была существенно ниже, чем в целом в популяции, в возрасте 55–64 лет – значительно больше СП (см. рис. 4). Распространенность гипо-ХС ЛПВП в женской популяции не формировала последовательного возрастного тренда, однако за анализируемый возрастной период возросла в 1,3 раза. Статистически значимые отличия от величины общепопуляционного показателя выявлены в старшей возрастной группе 55–64 лет (рис. 5).

Обсуждение

Согласно известной концепции, уровень и распространенность факторов риска, а соответственно, и компонентов МС, подвержены большим колебаниям среди населения, даже проживающего на сравнительно близких в географическом отношении территориях. В свою очередь, это обстоятельство исключает целесообразность переноса полученных результатов на другие популяции и обуславливает необходимость изучения профиля факторов риска в конкретных условиях, без чего невозможно прогнозировать эффективность научно обоснованных превентивных мероприятий в регионе. По мнению Е.В. Шляхто и А.О. Конради, изучение эпидемиологии МС в настоящее время имеет целый ряд проблем. С одной сто-

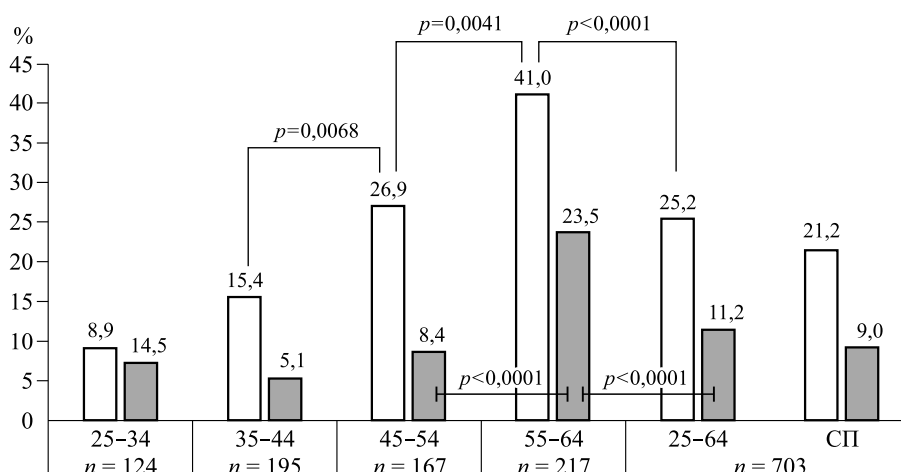


Рис. 3. Распространенность гипергликемии у женщин 25–64 лет открытой популяции Тюмени по критериям IDF (белые столбики) и NCEP ATP (серые столбики)

Fig. 3. Prevalence of hyperglycemia in women 25–64 years old in the open population of Tyumen according to the criteria of IDF (white bars) and NCEP ATP (grey bars)

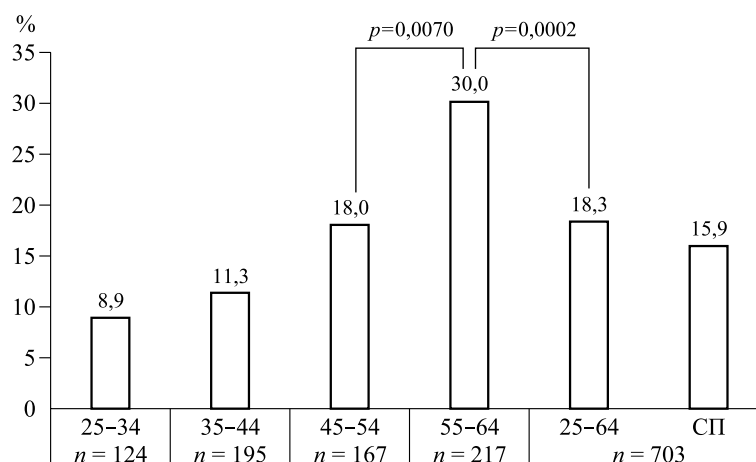


Рис. 4. Распространенность ГТГ у женщин 25–64 лет открытой популяции Тюмени по критериям IDF (белые столбики) и NCEP ATP (серые столбики)

Fig. 4. Prevalence of hypertriglyceridemia in women 25–64 years old in the open population of Tyumen according to the criteria of IDF (white bars) and NCEP ATP (grey bars)

роны, накоплено достаточно много данных по распространенности как МС, так и отдельных его составляющих в самых различных регионах планеты. С другой стороны, сопоставление полученных данных практически невозможно в связи с отсутствием стандартизации в проводимых исследованиях [10].

Анализ результатов фундаментальных научных исследований показал, что в гендерном аспекте нарушенная толерантность к глюкозе чаще встречается у женщин, а средний уровень гликемии натощак является более низким сравнительно с показателем у мужчин. Установлено, что у женщин изолированная постпрандиальная гипергликемия является независимым предиктором развития ССЗ [11]. В соответствии с этим у

женщин с ожирением и диабетом риск развития хронической сердечной недостаточности существенно выше, чем у мужчин [12].

Независимо от того, какие дефиниции МС используются, центральное ожирение постулируется как ключевой компонент МС и имеет важное значение в патогенезе нарушений углеводного обмена [13]. Вместе с тем Г.И. Симонова и др. показали, что по результатам возраст-стандартизованного анализа АО не оказывает значимого влияния на риск общей и сердечно-сосудистой смерти у женщин. Кроме того, по данным новосибирских исследователей, и наличие МС в целом не увеличивает риск смерти в женской популяции, хотя у женщин в увеличении риска смерти существенное значение имеет АД $\geq 130/85$ мм рт. ст. [8]. По

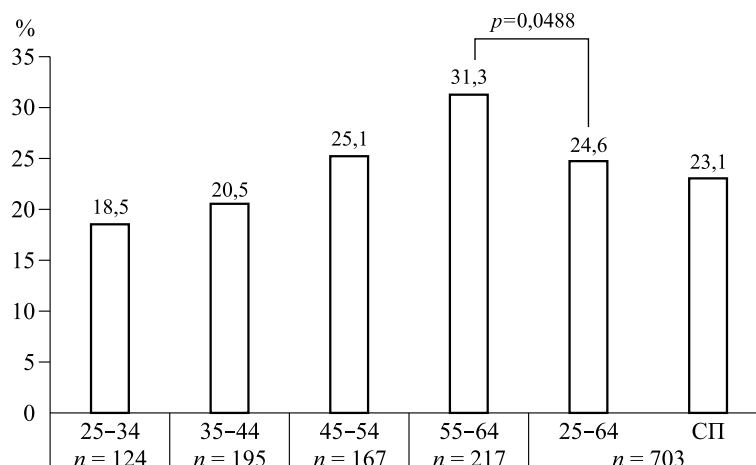


Рис. 5. Распространенность гипо-ХС ЛПВП у женщин 25–64 лет открытой популяции Тюмени по критериям IDF, NCEP ATP

Fig. 5. Prevalence of high density lipoprotein hypocholesterolemia in women aged 25–64 years in the open population of Tyumen according to IDF, NCEP ATP criteria

данным А.В. Соловьевой и И.И. Дубининой, сердечно-сосудистый риск нарастает с увеличением длительности АО и с понижением уровня ЛПВП [14].

Безусловно, развитие МС у женщин имеет свои особенности, связанные с разными периодами гормональной перестройки [14], в связи с чем и тенденции к росту распространенности компонентов МС, выявленные у женщин открытой популяции в разные возрастные периоды, оказались различными. В репродуктивном периоде у молодых женщин (в настоящем исследовании – третье и четвертое десятилетия жизни) нельзя не оценивать факторы, влияющие на формирование МС, – это повторные беременности, количество родов, аборт, выкидышей, наличие патологии беременности. Исследования показали, что большое число беременностей и родов является независимым предиктором развития МС [15]. Вместе с тем низкий риск развития МС ассоциирован с длительным грудным вскармливанием [16].

В зависимости от традиций, связанных в свою очередь с социальной структурой отдельно взятого региона, факторы риска репродуктивного возраста во взаимосвязи с факторами хронического социального стресса также могут иметь свои особенности и оказывать определенное влияние на распространенность компонентов МС у женщин молодого возраста, проживающих в среднеурбанизированном сибирском городе [5, 6]. В группах среднего возраста, в периоде гормональной перестройки, в организме женщины (в представленном исследовании – пятое и шестое десятилетия жизни) преобладают факторы, связанные с менопаузой. Исследования R. Eshtiaghi et al. показали, что менопауза является независимым предиктором развития МС. В связи с дефицитом эстрогенов в организме женщины в этот период снижается чувствительность тканей к инсулину, а распределение жировой ткани меняется с периферического типа на центральный [17].

Иранские ученые установили, что одним из факторов риска развития МС у женщин является депрессия [18]. В соответствии с этим и более ранние исследования на тюменской популяции показали ассоциативные взаимосвязи распространенности психосоциальных и конвенционных факторов риска ССЗ, что также в совокупности с поведенческими факторами риска ССЗ определяет особенности распространенности компонентов МС среди женщин среднеурбанизированного города Западной Сибири [6, 7, 19].

Таким образом, полученные данные распространенности компонентов МС у женщин открытой популяции позволяют определить группы риска для развития ССЗ и наметить мероприятия по

первичной профилактике среди населения среднеурбанизированного города Западной Сибири.

Выводы

В открытой популяции среднеурбанизированного города Западной Сибири среди женщин 25–64 лет выявлена высокая распространенность АО по критериям NCEP ATP III и IDF оценки СП (33,5 и 49,8 % соответственно), определена положительная связь с возрастом.

В открытой популяции среднеурбанизированного города Западной Сибири среди женщин 25–64 лет распространенность АГ, гипергликемии и ГТГ занимает срединные позиции с существенным ростом величин показателей в старших возрастных категориях, выявлена высокая распространенность гипо-ХС ЛПВП в молодом и среднем возрасте (от 18,5 до 31,3 % соответственно).

Список литературы / References

1. Simmons R.K., Alberti K.G., Gale E.A., Colagiuri S., Tuomilehto J., Qiao Q., Ramachandran A., Tajima N., Brajkovich M., Ben-Nakhi A., Reaven G., Hama Sambo B., Mendis S., Roglic G. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia*. 2010; 53 (4): 600–605. doi: 10.1007/s00125-009-1620-4
2. Rodriguez-Colon S.M., Mo J., Duan Y., Liu J., Caulfield J.E., Jin X., Liao D. Metabolic syndrome clusters and the risk of incident stroke: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Stroke*. 2009; 40 (1): 200–205. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.523035
3. Hao C., Zhang C., Chen W.Z., Shi Z. Prevalence and risk factors of diabetes and impaired fasting glucose among university applicants in Eastern China: findings from a population-based study. *Diabet Med*. 2014; 31 (10): 1194–1198. doi: 10.1111/DME.12473
4. Груздева О.В., Паличева Е.И., Максимов С.А., Дылева Ю.А., Жилиева Т.П., Макаров С.А. Метаболические факторы риска развития болезней системы кровообращения в разных возрастных группах. *Клин. мед.* 2017; 95 (11): 1035–1041. doi: 10.18821/0023-2149-2017-95-11-1035-1041
5. Груздева О.В., Паличева Е.И., Максимов С.А., Дылева Ю.А., Жилиева Т.П., Макаров С.А. Метаболические факторы риска развития болезней системы кровообращения в разных возрастных группах. *Клиническая медицина = Clinical Medicine*. 2017; 95 (11): 1035–1041. [In Russian]. doi: 10.18821/0023-2149-2017-95-11-1035-1041
6. Акимов А.М., Каюмова М.М., Акимов М.Ю., Кузнецов В.А. Стресс в семье в открытой городской популяции, гендерные различия. *Сиб. науч. мед. ж.* 2018; 4 (18): 127–129. doi: 10.15372/SSMJ20180417

- Akimov A.M., Kayumova M.M., Akimov M.Yu., Kuznetsov V.A. Stress in the family in the open urban population, gender differences. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2018; 4 (18): 127–129. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20180417
6. Акимов А.М., Гакова Е.И., Акимова А.А., Гафаров В.В., Кузнецов В.А. Ассоциации параметров стресса на рабочем месте и характера труда у женщин открытой городской популяции. *Сиб. ж. клин. и эксперим. мед.* 2016; 4 (31): 76–79. doi: 10.29001/2073-8552-2016-31-4-76-79
- Akimov A.M., Gakova E.I., Akimova A.A., Gafarov V.V., Kuznetsov V.A. The association between parameters of stress in the workplace and nature of work in women of the urban population. *Sibirskiy zhurnal klinicheskoy i eksperimental'noy meditsiny = Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2016; 4 (31): 76–79. [In Russian]. doi: 10.29001/2073-8552-2016-31-4-76-79
7. Акимов А.М., Гакова Е.И., Акимова А.А., Кузнецов В.А. Физическая активность при наличии и отсутствии ишемической болезни сердца в открытой популяции (гендерные различия). *Сиб. науч. мед. ж.* 2018; 38 (1): 77–80. doi: 10.15372/SSMJ20180112
- Akimov A.M., Gakova E.I., Akimova E.V., Kuznetsov V.A. Physical activity in the presence and absence of ischemic heart disease in an open population (gender differences). *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2018. 38. (1). 77–80. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20180112
8. Симонова Г.И., Мустафина С.В., Рымар О.Д., Щербакова Л.В., Никитенко Т.М., Бобак М., Малютина С.К. Метаболический синдром, риск общей и сердечно-сосудистой смертности по данным четырнадцатилетнего проспективного когортного исследования в Сибири. *Рос. кардиол. ж.* 2020; 25 (6): 3821. doi: 10.15829/1560-4071-2020-3821
- Simonova G.I., Mustafina S.V., Rymar O.D., Scherbakova L.V., Nikitenko T.M., Bobak M., Malyutina S.K. Metabolic syndrome and the risk of cardiovascular and all-cause mortality: data of 14-year prospective cohort study in Siberia. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Cardiology Journal*. 2020; 25 (6): 3821. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2020-3821
9. Токарева З.Н., Мамедов М.Н., Деев А.Д., Евдокимова А.А., Оганов Р.Г. Распространенность и особенности проявлений метаболического синдрома во взрослой городской популяции. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*. 2010; 9 (1): 10–14.
- Tokareva Z.N., Mamedov M.N., Deev A.D., Evdokimova A.A., Oganov R.G. Prevalence and specific features of metabolic syndrome in urban adult population. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2010; 9 (1): 10–14. [In Russian].
10. Шляхто Е.В., Конради А.О. Эпидемиология метаболического синдрома в различных регионах. Зависимость от используемых критериев и прогностическое значение. *Артериал. гипертензия*. 2007; 13 (2): 95–112. doi: 10.18705/1607-419X-2007-13-2-95-112
- Shlyakhto E.V., Konrady A.O. Epidemiology of metabolic syndrome in different regions. Impact of used definitions and prognostic value. *Arterial'naya gipertenziya = Arterial Hypertension*. 2007; 13 (2): 95–112. [In Russian]. doi: 10.18705/1607-419X-2007-13-2-95-112
11. Barrett-Connor E., Ferrara A. Isolated postchallenge hyperglycemia and the risk of fatal cardiovascular disease in older women and men. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*. 1998; 21 (8): 1236–1239. doi:10.2337/diacare.21.8.1236
12. Кононенко И.В., Смирнова О.М. Значение комплексного контроля гликемии при сахарном диабете 2 типа. *Пробл. эндокринолог.* 2010; (5): 43–51. doi:10.14341/probl201056543-51
- Kononenko I.V., Smirnova O.M. The importance of combined glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Problemy endocrinologii = Problems of Endocrinology*. 2010; 56 (5): 43–51. [In Russian]. doi:10.14341/probl201056543-51
13. Мустафина С.В., Щербакова Л.В., Козупеева Д.А., Малютина С.К., Рагино Ю.И., Рымар О.Д. Распространенность метаболически здорового ожирения по данным эпидемиологического обследования выборки 45–69 лет г. Новосибирска. *Ожирение и метаболизм*. 2018; 15 (4): 31–37. doi:10.14341/omet9615
- Mustafina S.V., Shcherbakova L.V., Kozupееva D.A., Malyutina S.K., Ragino Yu.I., Rymar O.D. The prevalence of metabolically healthy obesity: data from the epidemiological survey in of Novosibirsk. *Ozhireniye i metabolism = Obesity and Metabolism*. 2018; 15 (4): 31–37. [In Russian]. doi:10.14341/omet9615
14. Соловьева А.В., Дубинина И.И. Особенности развития метаболического синдрома у женщин. *Сах. диабет*. 2012; 15 (1): 57–62. doi:10.14341/2072-0351-5980
- Solov'eva A.V., Dubinina I.I. Characteristics of metabolic syndrome in women. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*. 2012; 15 (1): 57–62. [In Russian]. doi:10.14341/2072-0351-5980
15. Cohen A., Pieper C.F., Brown A.J., Bastian L.A. Number of children and risk of metabolic syndrome in women. *J. Womens Health (Larchmt)*. 2006; 15 (6): 763–773. doi: 10.1089/jwh.2006.15.763
16. Gunderson E.P., Jacobs D.R.Jr., Chiang V., Lewis C.E., Feng J., Quesenberry C.P.Jr., Sidney S. Duration of lactation and incidence of the metabolic syndrome in women of reproductive age according to gestational diabetes mellitus status: A 20-year prospective study in CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults). *Diabetes*. 2010; 59 (2): 495–504. doi: 10.2337/db09-1197

17. Eshtiaghi R., Esteghamati A., Nakhjavani M. Menopause is an independent predictor of metabolic syndrome in Iranian women. *Maturitas*. 2010; 65 (3): 262–266. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.11.004

18. Goldbacher E.M., Bromberger J., Matthews K.A. Lifetime history of major depression predicts the development of the metabolic syndrome in middle-aged women. *Psychosom. Med.* 2009; 71 (3): 266–272. doi: 10.1097 / PSY.0b013e318197a4d5

19. Акимова Е.В., Гафаров В.В., Гакова Е.И., Акимов А.М., Каюмова М.М. Изучение связи депрессии и ишемической болезни сердца у

мужчин и женщин открытой популяции среднеурбанизированного города Западной Сибири. *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика*. 2021; 20 (2): 2557. doi: 10.15829/1728-8800-2021-2557

Akimova E.V., Gafarov V.V., Gakova E.I., Akimov A.M., Kayumova M.M. Relationship between depression and coronary artery disease in an open female and male population of a middle-urbanized city of Western Siberia. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021; 20 (2): 2557. [In Russian]. doi: 10.15829/1728-8800-2021-2557

Сведения об авторах:

Марина Михайловна Каюмова, к.м.н., ORCID: 0000-0001-5326-119X, e-mail: kayumova@infarkta.net

Екатерина Ивановна Гакова, к.м.н., ORCID: 0000-0001-8662-8760, e-mail: gakova@infarkta.net

Татьяна Ивановна Петелина, д.м.н., ORCID: 0000-0001-6251-4179, e-mail: petelina@infarkta.net

Екатерина Викторовна Акимова, д.м.н., ORCID: 0000-0002-9961-5616, e-mail: akimovaev@infarkta.net

Information about the authors:

Marina M. Kayumova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-5326-119X, e-mail: kayumova@infarkta.net

Ekaterina I. Gakova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-8662-8760, e-mail: gakova@infarkta.net

Tatyana I. Petelina, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6251-4179, e-mail: petelina@infarkta.net

Ekaterina V. Akimova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9961-5616, e-mail: akimovaev@infarkta.net

Поступила в редакцию 24.05.2021

Принята к публикации 15.08.2021

Received 24.05.2021

Accepted 15.08.2021