



FUNDAMENTAL AND CLINICAL MEDICINE

2020 | TOM 5, № 3 | VOL. 5, № 3

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



16+

DOI 10.23946/2500-0764-2020-5-3

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор), свидетельство о регистрации ПИ №ФС77-65159 от 28 марта 2016 г.

Журнал основан в 2016 г.

Учредитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 650056, Кемеровская область, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а

ISSN 2500-0764 (Print)

ISSN 2542-0941 (Online)

Адрес редакции и издателя: 650056, Кемеровская область, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а, Тел./факс: (3842) 73-48-56, e-mail: journal_author@kemsma.ru

Адрес типографии: 650024, Кемеровская область, г. Кемерово, ул. Сибирская, д.35а, ООО «Принт», тел. (3842) 35-21-19

Периодичность: 4 раза в год.

Подписано в печать 29.09.2020 г.
Дата выхода в свет 30.09.2020 г.

Печать офсетная.
Тираж 950 шт.
Заказ № 1697.

Решением Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ научно-практический рецензируемый журнал «Фундаментальная и клиническая медицина» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендована публикация основных результатов диссертационных исследований на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук по следующим специальностям:
14.01.01 – акушерство и гинекология,
14.01.04 – внутренние болезни,
14.01.05 – кардиология,
14.02.01 – гигиена,
14.02.02 – эпидемиология,
14.03.03 – патологическая физиология (медицинские науки).
Полная версия журнала в электронном виде доступна на сайте Российской электронной библиотеки (www.elibrary.ru)

Распространяется по подписке.

Подписной индекс ПЗ593 в каталоге «Почта России», 80843 в каталоге «Роспечать». Свободная цена

Журнал «Фундаментальная и клиническая медицина»

Главный редактор

- **Брусина Елена Борисовна**, д.м.н., профессор; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой эпидемиологии, г. Кемерово, РФ

Редакционная коллегия

- **Абу-Абдаллах Мишель**, доктор медицины; Ближневосточная клиника фертильности, директор, Ливан
- **Акимкин Василий Геннадьевич**, д.м.н., профессор, академик РАН; ФБН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, директор, г. Москва, РФ
- **Артымук Наталья Владимировна**, д.м.н., профессор; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии имени профессора Г.А. Ушаковой, г. Кемерово, РФ
- **Барбараш Леонид Семенович**, д.м.н., профессор, академик РАН; ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», главный научный сотрудник, г. Кемерово, РФ
- **Барбараш Ольга Леонидовна**, д.м.н., профессор; член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», директор, г. Кемерово, РФ
- **Белокриницкая Татьяна Евгеньевна**, д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии факультета повышения квалификации и постдипломной подготовки специалистов, г. Чита, РФ
- **Ботвинкин Александр Дмитриевич**, д.м.н., профессор; ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой эпидемиологии, г. Иркутск, РФ
- **Брико Николай Иванович**, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, академик РАН; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), директор института общественного здоровья, заведующий кафедрой эпидемиологии и доказательной медицины, г. Москва, РФ
- **Бухтияров Игорь Валентинович**, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН; ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова», директор, г. Москва, РФ
- **Григорьев Евгений Валерьевич**, д.м.н., профессор; ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», заместитель директора по научной и лечебной работе, г. Кемерово, РФ
- **Злобин Владимир Игоревич**, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, академик РАН; ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, г. Иркутск, РФ
- **Занько Сергей Николаевич**, заслуженный деятель науки, д.м.н., профессор; УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», заведующий кафедрой акушерства и гинекологии, г. Витебск, Республика Беларусь
- **Ивойлов Валерий Михайлович**, д.м.н., профессор; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, президент, г. Кемерово, РФ
- **Кира Евгений Федорович**, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор; ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой женских болезней и репродуктивного здоровья, г. Москва, РФ

- **Коськина Елена Владимировна**, д.м.н., профессор; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, проректор по учебной работе, заведующая кафедрой гигиены, г. Кемерово, РФ
- **Крамер Аксель**, профессор; медицинский университет Грайсвальда, институт гигиены и медицинской экологии, г. Грайсвальд, Германия
- **Кувшинов Дмитрий Юрьевич**, д.м.н., доцент; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной физиологии, г. Кемерово, РФ (**научный редактор**)
- **Куркин Владимир Александрович**, д.ф.н., профессор; ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, г. Самара, РФ
- **Леванова Людмила Александровна**, д.м.н., доцент; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии, вирусологии, г. Кемерово, РФ (**ответственный секретарь**)
- **Лех Медард**, профессор; исследовательский центр фертильности и бесплодия, г. Варшава, Польша
- **Медведев Михаил Андреевич**, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, академик РАН; ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной физиологии, г. Томск, РФ
- **Начева Любовь Васильевна**, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой биологии с основами генетики и паразитологии, г. Кемерово, РФ
- **Онищенко Александр Леонидович**, д.м.н., профессор; Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по научной работе, г. Новокузнецк, РФ
- **Попонникова Татьяна Владимировна**, д.м.н., профессор; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ректор, г. Кемерово, РФ (**заместитель главного редактора**)
- **Потеряева Елена Леонидовна**, д.м.н., профессор; ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой неотложной терапии с эндокринологией и профпатологией факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей, проректор по лечебной работе, г. Новосибирск, РФ
- **Радзинский Виктор Евсеевич**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН; ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», заведующий кафедрой акушерства и гинекологии с курсом перинатологии, г. Москва, РФ
- **Рудаков Николай Викторович**, д.м.н., профессор; ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, директор, г. Омск, РФ
- **Салмина Алла Борисовна**, д.м.н., профессор; ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник и руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, проректор по инновационному развитию и международной деятельности, г. Красноярск, РФ
- **Цубке Вольфганг**, приват-доцент, Университет Тюбингена, медицинский факультет, Тюбинген, Германия.
- **Цуканов Владислав Владимирович**, д.м.н., профессор; ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера Министерства образования и науки Российской Федерации, заведующий клиническим отделением патологии пищеварительной системы у взрослых и детей, г. Красноярск, РФ
- **Шиндлер Адольф**, профессор; Университет Эссена, институт медицинских исследований и образования, отдел акушерства и гинекологии, директор, г. Эссен, Германия
- **Уразова Ольга Ивановна**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН; ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой патологической физиологии, г. Томск, РФ
- **Эл-Джефут Моамар**, доцент; Университет Муты, доцент кафедры акушерства и гинекологии, Карак, Иордания
- **Эльнашар Абуабакр**, профессор, университет Бенхи, Бенха, Египет
- **Яковлев Сергей Владимирович**, д.м.н., профессор; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), профессор кафедры госпитальной терапии №2 лечебного факультета, г. Москва, РФ

DOI 10.23946/2500-0764-2020-5-3

The Journal is officially registered in the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media (Roskomnadzor), registration certificate PO №FS77-65159 from 2016/03/28.

Journal was founded in 2016.

Founder: Kemerovo State Medical University,
22a, Voroshilova Street,
Kemerovo, Kemerovo Region,
650056, Russian Federation

ISSN 2500-0764 (Print)
ISSN 2542-0941 (Online)

Editorial/Publisher Address:

22a, Voroshilova Street, Kemerovo, Kemerovo Region, 650056, Russian Federation
Phone: +7 (3842) 73-48-56,
e-mail:
journal_author@kemsma.ru

Printing House Address:

35a, Sibirskaia Street, Kemerovo, Kemerovo Region, 650024, Russian Federation,
LLC "Print", phone: (3842) 35-21-19

The Journal is published quarterly.

Signed and confirmed for publication on 2020/09/29
Published on 2020/09/30

Offset printing, 950 copies.

Order № 1697.

The Journal is included in the List of peer-reviewed research journals recommended by Higher Education Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the following research fields:
14.01.01 – Obstetrics and Gynecology,
14.01.04 – Internal Medicine,
14.01.05 – Cardiology,
14.02.01 – Hygiene,
14.02.02 – Epidemiology,
14.03.03 – Pathophysiology (Medical Sciences).

The Journal is entirely available at the official site of Scientific Electronic Library (www.elibrary.ru)

Subscription-based distribution.

Subscription index
P3593 (Russian Post catalogue),
80843 («Rospechat» catalogue).

Free Price

Fundamental and Clinical Medicine

Editor-in-Chief

- **Elena B. Brusina**, MD, DSc, Professor; Kemerovo State Medical University, Head of the Department of Epidemiology, Kemerovo (Russian Federation)

Editorial Board

- **Michel Abou Abdallah**, MD; Middle East Fertility Clinic, Medical Director, Beirut (Lebanon)
- **Vasiliy G. Akimkin**, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences; Central Research Institute of Epidemiology, Chief Executive Officer, Moscow (Russian Federation)
- **Moamar Al-Jefout**, MD, PhD; University of Mutah, Department of Obstetrics and Gynecology, Associate Professor, Karak (Jordan)
- **Natalia V. Artyuk**, MD, DSc, Professor; Kemerovo State Medical University, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Kemerovo (Russian Federation)
- **Leonid S. Barbarash**, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences; Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Chief Research Officer, Kemerovo (Russian Federation)
- **Olga L. Barbarash**, MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Chief Executive Officer, Kemerovo (Russian Federation)
- **Tatiana E. Belokrinitskaya**, MD, DSc, Professor; Chita State Medical Academy, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Chita, (Russian Federation)
- **Alexandr D. Botvinkin**, MD, DSc, Professor; Irkutsk State Medical University, Head of the Department of Epidemiology, Irkutsk (Russian Federation)
- **Nikolay I. Briko**, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Sechenov First Moscow State Medical University, Head of the Institute of Public Health and the Department of Epidemiology and Evidence-based Medicine, Moscow (Russian Federation)
- **Igor V. Bukhtiyarov**, MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; Izmerov Research Institute of Occupational Health, Chief Executive Officer, Moscow (Russian Federation)
- **Aboubakr M. Elnashar**, MD, PhD, Professor; Benha University, Department of Obstetrics and Gynecology, Benha (Egypt)
- **Evgeniy V. Grigoriev**, MD, DSc, Professor; Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Deputy Chief Executive Officer, Kemerovo (Russian Federation)
- **Valeriy M. Ivoylov**, MD, DSc, Professor; Kemerovo State Medical University, President, Kemerovo (Russian Federation)
- **Evgeniy F. Kira**, MD, DSc, Professor; Pirogov National Medical and Surgical Center, Head of the Department of Women's Diseases and Reproductive Health, Moscow (Russian Federation)
- **Lyudmila A. Levanova**, MD, DSc; Kemerovo State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Immunology and Virology, **Deputy Editor-in-Chief**, Kemerovo (Russian Federation)
- **Axel Kramer**, MD, PhD, Professor; Ernst Moritz Arndt University Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Greifswald (Germany)

- **Elena V. Kos'kina**, MD, DSc, Professor; Kemerovo State Medical University, Deputy Chief Executive Officer, Kemerovo (Russian Federation)
- **Dmitriy Y. Kuvshinov**, MD, DSc; Kemerovo State Medical University, Head of the Department of Physiology, **Deputy Editor-in-Chief**, Kemerovo (Russian Federation)
- **Vladimir A. Kurkin**, MD, DSc, Professor; Samara State Medical University, Head of the Department of Pharmacognosy, Botany and Phytotherapy, Samara (Russian Federation)
- **Medard Lech**, MD, PhD, Professor; Fertility and Sterility Research Center, Chief Executive Officer, Warsaw (Poland)
- **Mikhail A. Medvedev**, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences; Siberian State Medical University, Head of the Department of Physiology, Tomsk (Russian Federation)
- **Lyubov V. Nacheva**, MD, DSc, Professor; Kemerovo State Medical University, Head of the Department of Biology, Genetics and Parasitology, Kemerovo (Russian Federation)
- **Alexander L. Onishchenko**, MD, DSc; Novokuznetsk State Institute of Advanced Medical Training, Deputy Chief Executive Officer, Novokuznetsk (Russian Federation)
- **Tatiana V. Poponnikova**, MD, DSc, Professor; Kemerovo State Medical University, Chief Executive Officer, **Deputy Editor-in-Chief**, Kemerovo (Russian Federation)
- **Elena L. Poteryaeva**, MD, DSc, Professor; Novosibirsk State Medical University, Head of the Department of Emergency Therapy, Endocrinology and Occupational Medicine, Deputy Chief Executive Officer, Novosibirsk (Russian Federation)
- **Viktor E. Radzinskiy**, MD, DSc, Professor; Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow (Russian Federation)
- **Nikolay V. Rudakov**, MD, DSc, Professor; Research Institute of Zoonoses, Chief Executive Officer, Omsk (Russian Federation)
- **Alla B. Salmina**, MD, DSc, Professor; Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Head of The Department of Biochemistry, Medical, Pharmaceutical, and Toxicological Chemistry, Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Chief Executive Officer, Krasnoyarsk (Russian Federation)
- **Adolf Schindler**, MD, PhD, Professor; University of Essen, Institute for Medical Research and Education, Department of Obstetrics and Gynecology, Chief Executive Officer, Essen (Germany)
- **Olga I. Urazova**, MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; Siberian State Medical University, Head of the Department of Pathophysiology, Tomsk (Russian Federation)
- **Sergey V. Yakovlev**, MD, DSc, Professor; Sechenov First Moscow State Medical University, Department of Internal Diseases #2, Moscow (Russian Federation)
- **Sergey N. Zan'ko**, MD, DSc, Professor; Vitebsk State Medical University, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Vitebsk (Republic of Belarus)
- **Vladimir I. Zlobin**, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences; Irkutsk State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology and the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Irkutsk (Russian Federation)
- **Wolfgang Zubke**, MD, PhD; University of Tübingen, University Clinic, Medical Faculty, Associate Professor, Tübingen, (Germany)
- **Vladislav V. Tsukanov**, MD, DSc, Professor; Research Institute for Medical Problems in The North, Head of the Digestive Diseases Unit, Krasnoyarsk (Russian Federation)

СОДЕРЖАНИЕ

КОЛОНКА РЕДАКТОРА	с. 7
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	
Блох А.И., Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В., Лазарев И.И. ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ COVID-19 В ОМСКОЙ ОБЛАСТИ И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОГО ВЛИЯНИЯ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ (г. Омск, Россия)	с. 8
Успенская Ю.А., Малиновская Н.А., Моргун А.В., Осипова Е.Д., Салмина А.Б. ВЛИЯНИЕ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОСФЕР НА АНГИОГЕНЕЗ С УЧАСТИЕМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ IN VITRO (г. Красноярск, Россия)	с. 18
Веремеев А.В., Болгарин Р.Н., Нестеренко В.Г., Андреев-Андриевский А.А. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КРИТИЧЕСКИХ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ СВОДА ЧЕРЕПА КРЫС (г. Москва, Россия)	с. 24
Егорова А.А., Авраменко Е.А. ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОГО И МИОГЕННОГО МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ СЕРОТОНИНА В ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДАХ БРЫЖЕЙКИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ (г. Санкт-Петербург, Россия)	с. 35
Тхоренко Б.А., Цепочкина А.В., Лавряшина М.Б., Понасенко А.В. СОДЕРЖАНИЕ АЛЬДОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖИТЕЛЕЙ СИБИРСКОГО ПРОМЫШЛЕННОГО РЕГИОНА (НА ПРИМЕРЕ КУЗБАССА): ОЦЕНКА МОДУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ЭНДОГЕННЫХ ФАКТОРОВ (г. Кемерово, Россия)	с. 42
Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г. АНАЛИЗ ВНУТРЕННЕГО ПУТИ АПОПТОЗА В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОИНОВ (г. Кемерово, Россия)	с. 50
Волков А.Н. ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА <i>UGT1A1</i> , АССОЦИИРОВАННОЙ СО СНИЖЕННОЙ ФУНКЦИЕЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ УДФ- ГЛЮКУРОНИЛТРАНСФЕРАЗЫ A1 (г. Кемерово, Россия)	с. 59
Баринев С.В., Охлопков В.А., Тирская Ю.И., Бабаева Т.Ш., Синельникова Л.Б., Терлецкая Т.В. МИКРОФЛОРА ПОЛОВЫХ ПУТЕЙ МУЖЧИН-ПАРТНЕРОВ ЖЕНЩИН С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ И ЕЕ РОЛЬ В РАЗВИТИИ РЕЦИДИВОВ ДАННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ (г. Омск, г. Москва, Россия)	с. 66
Артымук Н.В., Тачкова О.А., Сухова Н.А. ОСОБЕННОСТИ ГОРМОНАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С ОЖИРЕНИЕМ (г. Кемерово, Россия)	с. 77
ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ	
Харитонов Е.В., Лопатина О.Л., Марченко С.А., Горина Я.В., Салмина А.Б. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ МИКРОДИАЛИЗА ГОЛОВНОГО МОЗГА И СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕЙРОБИОЛОГИИ И НЕЙРОХИМИИ (г. Красноярск, Россия)	с. 85
КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ	
Ляпин А.А., Халивопуло И.К., Шушпанников П.А., Тарасов Р.С. СТЕНТИРОВАНИЕ ВЫВОДНОГО ТРАКТА ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РАДИКАЛЬНОЙ КОРРЕКЦИЕЙ У РЕБЕНКА С ТЕТРАДОЙ ФАЛЛО: РЕЗУЛЬТАТЫ ШЕСТИЛЕТНЕГО НАБЛЮДЕНИЯ (г. Кемерово, Россия)	с. 98

TABLE OF CONTENTS

EDITORIAL	p. 7
ORIGINAL RESEARCH	
Alexey I. Blokh, Natalia A. Penievskaia, Nikolay V. Rudakov, Igor I. Lazarev EPIDEMIC POTENTIAL OF COVID-19 IN OMSK REGION AND ASSESSMENT OF THE ANTI-EPIDEMIC MEASURES (Omsk, Russian Federation)	p. 8
Yulia A. Uspenskaya, Natalia A. Malinovskaya, Andrey V. Morgun, Elena D. Osipova, Alla B. Salmina MOUSE HIPPOCAMPAL NEUROSPHERES NEGATIVELY REGULATE CEREBRAL ANGIOGENESIS (Krasnoyarsk, Russian Federation)	p. 18
Alexey V. Veremeiev, Roman N. Bolgarin, Vladimir G. Nesterenko, Alexander A. Andreev-Andrievskiy HETEROLOGOUS DEMINERALISED BONE MATRIX IS EFFICIENT FOR THE REPAIR OF CRITICAL-SIZED RAT CALVARIAL DEFECTS (Moscow, Russian Federation)	p. 24
Alexandra A. Egorova, Ekaterina A. Avramenko EXPERIMENTAL FAECAL PERITONITIS ALTERS RESPONSE TO 5-HYDROXYTRYPTAMINE IN MESENTERIC LYMPHATIC VESSELS (St. Petersburg, Russian Federation)	p. 35
Boris A. Tkhoronko, Anna V. Tsepokina, Maria B. Lavryashina, Anastasia V. Ponasenka DETERMINANTS OF SERUM ALDOSTERONE IN KEMEROVO REGION (Kemerovo, Russian Federation)	p. 42
Victoria E. Markova, Daria K. Shishkova, Anton G. Kutikhin ANALYSIS OF INTRINSIC APOPTOSIS IN ENDOTHELIAL CELLS EXPOSED TO CALCIUM PHOSPHATE BIONS (Kemerovo, Russian Federation)	p. 50
Alexey N. Volkov POPULATION GENETIC RESEARCH OF THE MUTATION IN UGT1A1 GENE ASSOCIATED WITH REDUCED ACTIVITY OF LIVER UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE A1 (Kemerovo, Russian Federation)	p. 59
Sergey V. Barinov, Vitaliy A. Okhlopov, Yuliya I. Tirskaya, Turan S.-K. Babaeva, Lyudmila B. Sinel'nikova, Tatiana V. Terletskaia GENITAL MICROBIOTA OF SEXUAL PARTNERS OF FEMALE PATIENTS WITH BACTERIAL VAGINOSIS IS RESPONSIBLE FOR ITS RECURRENCES (Omsk, Moscow, Russian Federation)	p. 66
Natalia V. Artymuk, Olga A. Tachkova, Natalia A. Sukhova FEATURES OF THE HORMONAL PROFILE IN OBESE REPRODUCTIVE-AGE WOMEN (Kemerovo, Russian Federation)	p. 77
REVIEW ARTICLES	
Ekaterina V. Kharitonova, Olga L. Lopatina, Sergey A. Marchenko, Yana V. Gorina, Alla B. Salmina BRAIN MICRODIALYSIS IN NEUROBIOLOGY AND NEUROCHEMISTRY (Krasnoyarsk, Russian Federation)	p. 85
CASE REPORTS	
Anton A. Lyapin, Ivan K. Khalivopulo, Pavel A. Shushpannikov, Roman S. Tarasov STENTING OF THE RIGHT VENTRICULAR OUTFLOW TRACT WITH SUBSEQUENT RADICAL CORRECTION IN A CHILD WITH A TETRALOGY OF FALLOT: RESULTS OF SIX-YEAR FOLLOW-UP (Kemerovo, Russian Federation)	p. 98

Уважаемые коллеги!

Пандемия COVID-19 охватила все сферы жизни мирового сообщества и потребовала неординарных подходов к обеспечению безопасности населения. Изучению закономерностей распространения COVID-19 и оценке эффективности противоэпидемических мероприятий в одном из регионов Российской Федерации посвящена статья в этом номере журнала.

Публикации, посвященные патофизиологическим механизмам, охватывают широкий спектр актуальных научных проблем: авторы приводят результаты исследований причин изменения эффекта серотонина при каловом перитоните; изучения вариабельности сывороточных концентраций альдостерона у больных ишемической болезнью сердца; исследования внутреннего пути апоптоза в первичных артериальных эндотелиальных клетках в результате их экспозиции кальций-фосфатным бионам.

Экспериментальные результаты демонстрируют, что стимуляция даже небольшого пула нейрональных стволовых клеток в ткани головного мозга может редуцировать возраст-ассоциированные проявления когнитивного дефицита. В этом контексте перспективным подходом является оценка особенностей ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер, итоги которой приводятся в одной из статей.

Мы продолжаем публикации результатов фундаментального исследования эффективности замещения костных дефектов. Для решения этой проблемы активно изучается возможность форсирования естественной регенерации костной ткани вместо использования металлических и керамических имплантатов. В этом номере публикуются результаты оценки эффективности экспериментального применения гетерологического деминерализованного костного матрикса.

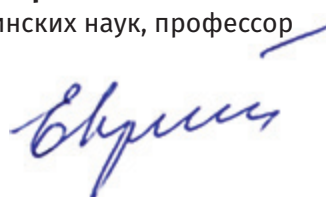
Проблемы репродуктивного здоровья обсуждаются в контексте изучения микрофлоры половых путей мужчин - партнеров женщин с бактериальным вагинозом; особенностей гормонального профиля у женщин репродуктивного возраста с ожирением.

Обзорная статья посвящена микродиализу, который благодаря своей универсальности представляет собой популярный метод, используемый в различных областях, особенно в фармакологии, неврологии и биомедицинских исследованиях. Авторы публикации рассматривают основные аспекты и параметры, содержание и области применения микродиализа в нейробиологии и нейрохимии.

Главный редактор

доктор медицинских наук, профессор

Е.Б. Бруси́на



<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-8-17>

ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ COVID-19 В ОМСКОЙ ОБЛАСТИ И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОГО ВЛИЯНИЯ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ

БЛОХ А.И.^{1,2} *, ПЕНЬЕВСКАЯ Н.А.^{1,2}, РУДАКОВ Н.В.^{1,2}, ЛАЗАРЕВ И.И.²

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, г. Омск, Россия

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Омск, Россия

Резюме

Цель. Изучить распространение COVID-19 среди населения Омской области на протяжении первых 115 дней эпидемического неблагополучия на фоне противоэпидемических мероприятий.

Материалы и методы. Выполнено описательное эпидемиологическое исследование на основе данных ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области» по официальному учёту и эпидемиологическому расследованию выявленных случаев COVID-19 на территории Омской области за период с 27 марта по 19 июля 2020 года. Для оценки потенциала COVID-19 к распространению рассчитаны экспоненциальный темп прироста (r), базовый показатель репродукции (R_0), эффективный показатель репродукции (R_t), ожидаемый естественный размах эпидемии и порог коллективного иммунитета. Обработка данных выполнена с использованием MS Excel 2010. Построение картограммы проводилось в приложении QGIS 3.12-Bukaresti в системе координат EPSG: 3576.

Результаты. За период с 27 марта по 19 июля 2020 года на территории Омской области было зарегистрировано 5503 случаев COVID-19, показатель заболеваемости составил $285,6^{0/}_{0000}$ (95% ДИ $278,1 \div 293,2$), летальность по завершённым случаям – 1,5%, по выявленным случаям – 0,9%. Наиболее активное распространение COVID-19 отмечено в г. Омске и 5 из 32 районов области (Калачинском, Нововаршавском, Русско-Полянском, Москаленском, Азовском немецком национальном). Наименее вовлечены в эпидемический процесс возрастные группы от 0

до 19 лет и 20-29 лет. Наиболее уязвимы мужчины 55-69 лет и женщины 50-64 лет. В структуре клинических форм COVID-19 на протяжении периода наблюдения отмечено уменьшение доли выявляемых бессимптомных форм и увеличение доли пневмоний. Установлено многократное увеличение числа внебольничных пневмоний в июне и июле 2020 г. по сравнению со среднемноголетними значениями 2017–2019 гг. На фоне проводимых противоэпидемических мероприятий экспоненциальный темп прироста кумулятивного количества случаев COVID-19 составлял 6,6% в сутки, R_0 1,4-1,5, R_t 1,18, порог коллективного иммунитета – 28,6%. Ожидаемый размах эпидемии при условии продолжения действия ограничительных мер может достигнуть 58,0% переболевшего населения.

Заключение. Потенциал COVID-19 к распространению среди населения Омской области подавлен недостаточно. Уменьшение количества выявляемых вирусоносителей, неполное выявление COVID-19 среди заболевших внебольничными пневмониями создают дополнительные риски для скрытого распространения инфекции и осложнения эпидемической ситуации. Сохранение ограничительных мероприятий и превышение порога коллективного иммунитета (28,6% населения) позволит значительно снизить риски усиления распространения COVID-19 в Омской области.

Ключевые слова: эпидемиология, COVID-19, экспоненциальный темп прироста, показатель репродукции, ожидаемый естественный размах эпидемии, порог коллективного иммунитета.

Для цитирования:

Блох А.И., Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В., Лазарев И.И. Эпидемический потенциал COVID-19 в Омской области и оценка возможного влияния противоэпидемических мероприятий. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3): 8-17.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-8-17>

*Корреспонденцию адресовать:

Блох Алексей Игоревич, 644050, Омск, ул. Мира, д. 9, e-mail: spy_spirit@mail.ru

© Блох А.И. и др.

Благодарности

Авторы выражают признательность сотрудникам ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области»: главному врачу Никитину С.В., заведующей отделом обеспечения эпидемиологического надзора Михайловой О.А., а также Федорову А.С. за оказанную помощь по

сбору материалов для данного исследования.

Конфликт интересов.

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

Источник финансирования.

Собственные средства.

ORIGINAL RESEARCH

EPIDEMIC POTENTIAL OF COVID-19 IN OMSK REGION AND ASSESSMENT OF THE ANTI-EPIDEMIC MEASURES

ALEXEY I. BLOKH^{1**}, NATALIA A. PENIEVSKAYA^{1,2}, NIKOLAY V. RUDAKOV^{1,2}, IGOR I. LAZAREV²

¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation ²Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Abstract

Aim. To study the spread of COVID-19 among the population of the Omsk region during the first 115 days of the epidemic.

Materials and Methods. We carried out a descriptive epidemiological study using the data from the Center for Hygiene and Epidemiology in the Omsk Region on the officially registered cases of COVID-19 in the Omsk Region from March 27 to July 19, 2020. The following indicators were calculated: exponential growth rate (r), basic reproduction number (R_0), effective reproduction number (R_t), expected natural epidemic size and herd immunity threshold.

Results. During the indicated period, there were 5,503 cases of COVID-19 in the Omsk Region. The incidence rate was 285.6⁰/₀₀₀₀ (95% CI 278.1 – 293.2), the case fatality rate was 1.5% for completed cases and 0.9[^] for all cases. The most active spread of COVID-19 was noted in Omsk and in 5 out of 32 districts of the region (Kalachinskiy, Novovarshevskiy, Russko-Polyanskiy, Moskalenskiy, and Azov German National District). Individuals < 30 years of age were among the least involved in the epidemic process. Among the most affected groups were 55-69 years-old males and 50-64-years-old females. During the observation period, the proportion of asymptomatic forms gradually reduced along with the increase in the proportion of pneumonia cases. A manifold increase in the incidence of community-acquired pneu-

monia was registered in June and July 2020 compared to the average values in 2017-2019. The exponential growth rate was 6.6% per day, R_0 was 1.4-1.5, R_t was 1.18, and herd immunity threshold was 28.6%. The expected size of the epidemic at sustained anti-epidemic measures was 58.0% of the population.

Conclusion. The spread of COVID-19 in the Omsk region is not sufficiently suppressed. Reduced number of asymptomatic cases and incomplete detection of COVID-19 among the patients with community-acquired pneumonia may contribute to the latent spread of the infection and complicated epidemic situation. Maintenance of the restrictive measures and acquirement of the herd immunity (over 28.6% population) may significantly reduce the spread of COVID-19 in the Omsk Region.

Keywords: epidemiology, COVID-19, exponential growth rate, reproduction number, epidemic, herd immunity.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the staff of the Center for Hygiene and Epidemiology in the Omsk Region: S.V. Nikitin (Chief Medical Officer), Mikhailova O.A. (Head of the Department of Epidemiological Surveillance), and to A.S. Fedorov for the assistance in collection of the materials for this study.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

There was no funding for this project.

◀ English

For citation:

Alexey I. Blokh, Natalia A. Penievskaia, Nikolay V. Rudakov, Igor I. Lazarev. Epidemic potential of COVID-19 in Omsk region and assessment of the anti-epidemic measures. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3):8-17. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-8-17>

****Corresponding author:**

Alexey I. Blokh, 7, Mira Street, Omsk, 644050, Russian Federation, e-mail: spy_spirit@mail.ru
© Alexey I. Blokh et al.

Введение

Новая коронавирусная инфекция COVID-19, впервые выявленная в городе Ухань в конце 2019 года, признана ВОЗ имеющей международное значение ситуацией в области здравоохранения [1]. К 20 июля 2020 г. COVID-19 был выявлен у 14 348 858 человек и унёс жизни 603 691 из них, при этом на долю Российской Федерации приходилось 777 486 случаев и 12 427 смертей соответственно [2]. Сложившаяся сегодня ситуация представляет уникальные возможности для эпидемиологического изучения распространения нового патогена, к которому существенная часть населения не имеет иммунитета.

Распространение COVID-19 в Омской области происходило на фоне противоэпидемических мероприятий. Первые случаи COVID-19 на территории Омской области выявлены 27 марта 2020 г., то есть на месяц позже, чем в г. Москва. Еще за 10 дней до выявления первых инфицированных в Омской области указом Губернатора был введен режим повышенной готовности с соответствующими мерами по недопущению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции, сохраняющийся до 4 августа. С 1 апреля в Омской области установлен особый режим самоизоляции, включающий перевод образовательных организаций на дистанционный режим работы, запрет массовых мероприятий, закрытие дошкольных учреждений, приостановление деятельности не системообразующих организаций и предприятий, ограничение передвижения внутри и за пределами г. Омска и прочее. Частичное ослабление полного режима самоизоляции было начато 4 июня 2020 г.

Цель исследования

Изучить распространение COVID-19 среди населения Омской области на протяжении первых 115 дней эпидемического неблагополучия на фоне противоэпидемических мероприятий.

Материалы и методы

Материалом для настоящего описательного эпидемиологического исследования послужили данные ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по Омской области» по официальному учёту и эпидемиологическому расследованию выявленных случаев COVID-19 на территории Омской области за период с 27 марта (выявление первых инфицированных) по 19 июля 2020 года. Все выявленные случаи были подтверждены методом ПЦР в одной из лабораторий, действующих

на территории региона: ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора или ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области» в соответствии с утверждённой маршрутизацией. По каждому случаю COVID-19 собиралась рутинная информация, в том числе о поле и возрасте, предполагаемом месте и источнике заражения (для местных случаев), дате появления симптомов, клиническом течении на момент регистрации.

Кроме того, в исследовании использовали данные таких интернет-ресурсов, как стопкоронавирус.рф, mzdr.omskportal.ru, а также официальных интернет-страниц оперативных штабов по предупреждению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции в соседних с Омской областью регионах РФ и Республики Казахстан.

Для оценки исходного потенциала COVID-19 к распространению на территории Омской области вычислен базовый показатель репродукции (R_0), а для оперативной оценки ситуации использовали эффективный показатель репродукции (R_t). Методика расчёта базового показателя репродукции описана Wallinga J., Lipsitch M. [3] и предполагает знание величин экспоненциального темпа прироста (*intrinsic growth factor*) и серийного интервала – СИ. Экспоненциальный темп прироста (r) вычисляли с помощью простой регрессии Пуассона [3] из кумулятивного числа случаев за период с начала регистрации до 15 апреля – даты, на которую коэффициент детерминации был наибольшим, составляя 93,3%. Оценку СИ проводили по литературным данным.

Серийный интервал является легко вычисляемой альтернативой времени генерации – промежутка между заражением двух человек в единой эпидемической цепочке. Более длительный серийный интервал является благоприятным прогностическим признаком для системы эпидемиологического надзора: он фактически означает большой запас времени на проведение эпидемиологических расследований и необходимое реагирование [4]. Серийный интервал COVID-19 сегодня оценивается в 4-8 дней, с большинством оценок около 4 дней. В расчетах мы использовали оценку в 3,96 (95% ДИ 3,53-4,39) дня из крупнейшего исследования Park M. et al. (2020) [5] с допущением двух распределений для моделирования СИ в связи с тем, что R_0 , вычисленный из дельта-распределённого серийного интервала, считается наиболее консервативной оценкой, в

то время как R_0 из экспоненциально распределённого СИ может считаться «средней» оценкой [3]. От величины R_0 зависят такие прогностические эпидемиологические показатели, как ожидаемый естественный размер эпидемии (*epidemic final size*) и порог коллективного иммунитета (*herd immunity threshold*), которые вычисляли по Miller J.C. (2012) и Rodpothong P, Auewarakul P. (2012) соответственно [6, 7]. Оценку R_t проводили по методике Cori A. et al. (2013) на основе количества выявленных случаев COVID-19 за прошедшие 7 дней [8]. В целом показатели репродукции выше 1 свидетельствуют о наличии (сохранении) потенциала инфекционного заболевания к эпидемическому распространению в конкретной популяции, в то время как показатели репродукции меньше 1 – об отсутствии такого потенциала [3]. Ретроспективные данные о количестве зарегистрированных экстренных извещений с установленным диагнозом «внебольничная пневмония» за 2017–2019 гг. были подвергнуты регрессионному анализу с помощью множественной регрессии, в которой сезонный компонент задавался синусоидальной функцией [9], а оперативные данные за 2020 год представлены без изменений.

Обработка данных выполнена с использованием MS Excel 2010. Построение картограммы проводили в приложении QGIS 3.12-Bukuresti в системе координат EPSG: 3576.

Результаты

За период с 27 марта по 19 июля 2020 года на территории Омской области было зарегистрировано 5503 случаев COVID-19, из которых 52 завершились смертью и 3217 выздоровлением. Распространение COVID-19 по территории области началось с семейного кластера из 3 завозных случаев из числа лиц, прибывших из поездки в Объединённые Арабские Эмираты, а к концу анализируемого периода было выявлено 162 завозных случая COVID-19. Местная передача отмечена немногим позднее: 30 марта выявлен кластер из 3 заболевших, не имевших в анамнезе выездов с территории области. Экспоненциальный темп прироста кумулятивного количества случаев COVID-19 за период с 27 марта по 19 июля 2020 г. составлял 6,6% в сутки (**рисунок 1**).

Первый летальный исход у пациента с COVID-19 зарегистрирован 24 апреля. Оперативные оценки летальности, произведённые на основе завершённых случаев COVID-19, в мае достигали 13,7%, а на основе выявленных случаев – 3,1%. К июлю оба показателя относительно стабилизировались на уровне 1,5% и 0,9% соответственно (**рисунок 2**).

Территориальное распределение случаев COVID-19 по состоянию на 20.07.20 г. характеризовалось выраженной неравномерностью: так 76,4% (4205/5503) случаев выявлено в г. Омске, 4,5% (245/5503) в Омском, 2,6% (144/5503)

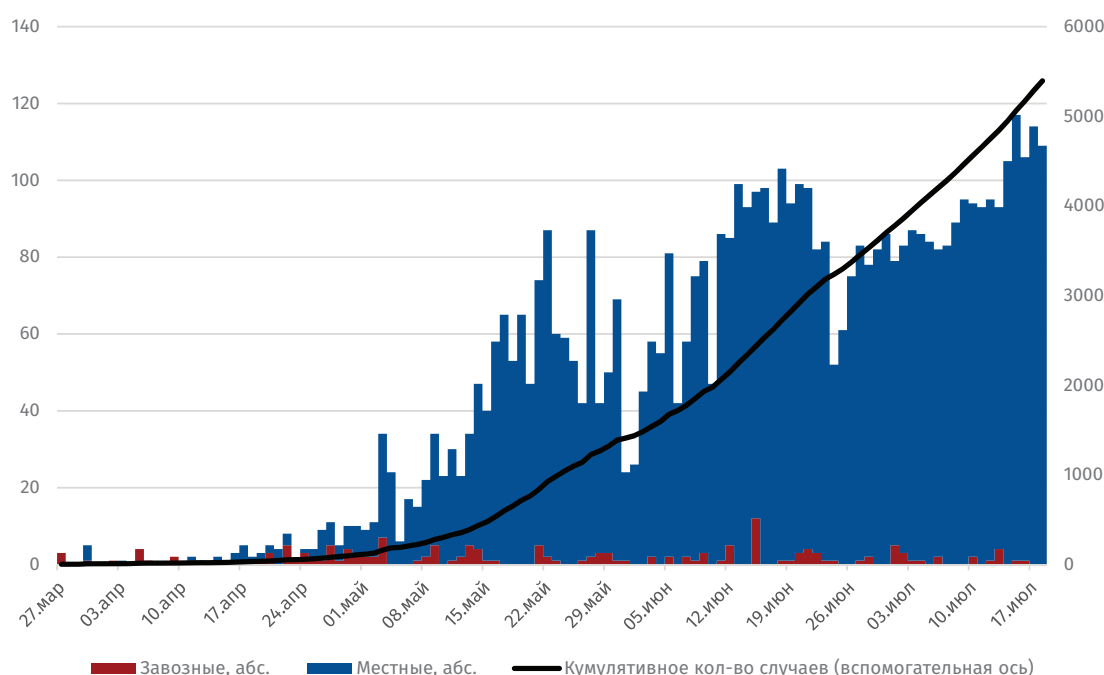


Рисунок 2.

Оценка летальности
COVID-19 в Омской
области (в %)

Figure 2.

Case fatality rate of
COVID-19 in the Omsk
Region (%)

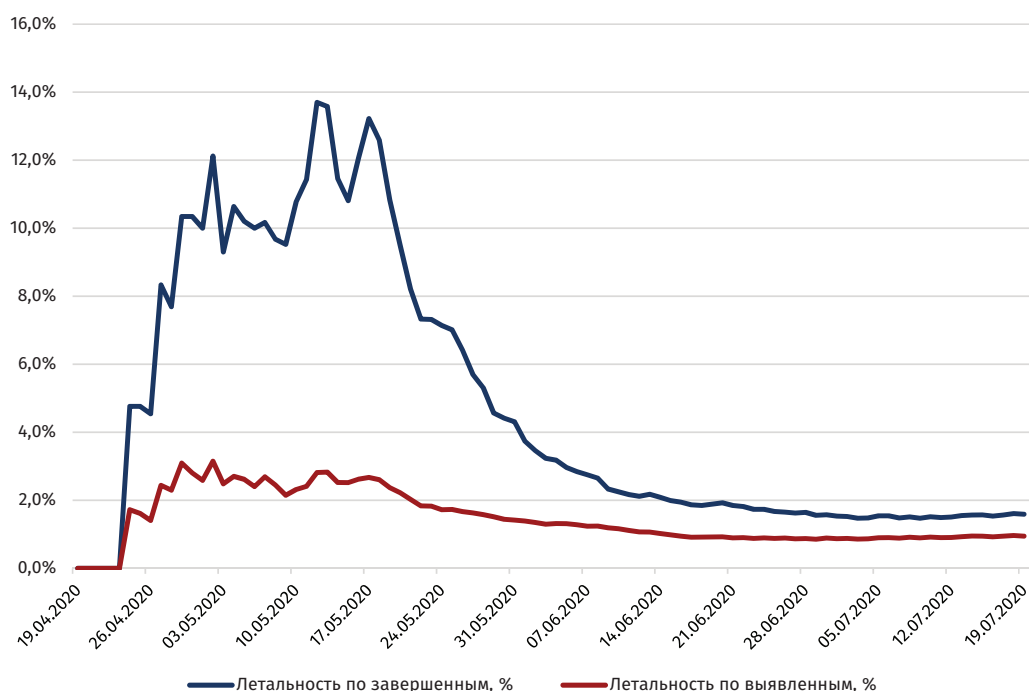


Рисунок 3.

Территориальное
распределение забо-
леваемости COVID-19
населения Омской
области на 20.07.20 г.
(на 100000 населения
соответствующей
территории)

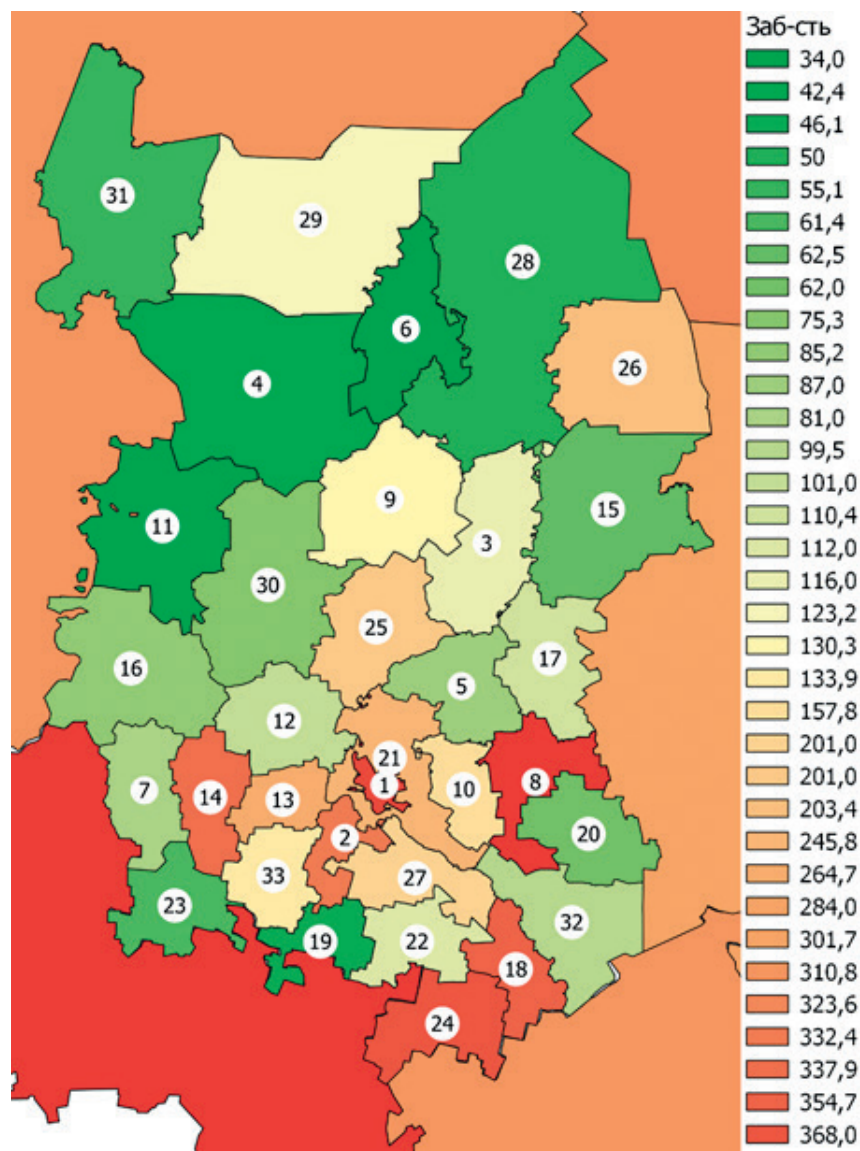
Примечание: к вос-
току от Омской
области распо-
ложена Новосиби-
рская область, к се-
веро-западу - Тю-
менская область,
на северо-востоке -
Томская область.
К юго-западу - Се-
веро-Казахстан-
ская область Респу-
блики Казахстан, к
юго-востоку - Пав-
лодарская область
Республики Казах-
стан.

Figure 3.

Spatial distribution
of COVID-19 in the
Omsk region as of
20.07.20 (per 100,000
population)

Note: Novosibirsk
Region is to the East,
Tyumen Region is to
the Northwest,
Tomsk Region is to
the Northeast,
North Kazakhstan
Region (Republic of
Kazakhstan) is to the
Southwest, Pavlodar
Region (Republic of
Kazakhstan) is to the
Southeast.

- 1 Омск
- 2 Азовский
- 3 Большереченский
- 4 Большешуковский
- 5 Горьковский
- 6 Знаменский
- 7 Исикульский
- 8 Калачинский
- 9 Колосовский
- 10 Кормиловский
- 11 Крутинский
- 12 Любинский
- 13 Марьяновский
- 14 Москаленский
- 15 Муромцевский
- 16 Называевский
- 17 Нижнеомский
- 18 Нововаршавский
- 19 Одесский
- 20 Оконешниковский
- 21 Омский
- 22 Павлоградский
- 23 Полтавский
- 24 Русско-Полянский
- 25 Саргатский
- 26 Седельниковский
- 27 Таврический
- 28 Тарский
- 29 Тевризский
- 30 Тюкалинский
- 31 Усть-Ишимский
- 32 Черлакский
- 32 Шербакульский



в Калачинском, 1,7% (94/5503) в Москаленском, 1,5% (85/5503) в Азовском немецком национальном, 1,4% (78/5503) в Нововаршавском, 1,3% (71/5503) в Марьяновском, 1,3% (69/5503) в Таврическом и 1,1% (63/5503) в Русско-Полянском муниципальных районах. На остальные районы приходилось менее 1% выявленных случаев. К концу анализируемого периода в областной структуре заболеваний COVID-19 отмечено снижение доли случаев, зарегистрированных в г. Омске, что свидетельствует об активизации эпидемического процесса в районах области.

Кумулятивный показатель заболеваемости населения Омской области COVID-19 составил 285,6 (95% ДИ 278,1÷293,2) на 100000 населения, и был превышен в Омске – 364,2 (95% ДИ 353,2÷375,2), а также в муниципальных районах: Калачинском – 370,6 (95% ДИ 310,1÷431,2) на 100000 населения, Нововаршавском – 354,7 (95% ДИ 280,4÷442,7) на 100000 населения, Русско-Полянском – 360,0 (95% ДИ 276,6÷460,6) на 100000 населения, Москаленском – 337,9 (95% ДИ 273,1÷413,5) на 100000 населения и Азовском немецком национальном 332,4 (95% ДИ 265,5÷411,0) на 100000 населения (рис. 3). Такое территориальное распределение случаев может

объясняться более интенсивным движением товаров и пассажиров в направлении восток-запад через Омск, а также из Омска на юг в Казахстан и обратно. В граничащих с Омской областью регионах России и Казахстана на 20.07.20 г. отмечены более высокие показатели заболеваемости населения COVID-19: Новосибирская область 292,5 (95% ДИ 286,2÷298,9), Томская область 323,6 (95% ДИ 312,9÷334,4) и Тюменская область 310,8 (95% ДИ 302,0÷319,7) на 100000 населения соответственно, Северо-Казахстанская область – 383,9⁰/₀₀₀₀ (95% ДИ 367,6÷400,2), Павлодарская область – 301,7⁰/₀₀₀₀ (95% ДИ 289,3÷314,0) (рисунки 3).

В результате анализа структуры заболевших COVID-19 по полу и возрасту установлено, что за анализируемый период на долю мужчин пришлось 44,1% (2463/5584) случаев, по которым имелась соответствующая информация. Медианный возраст заразившихся COVID-19 мужчин составил 45 (32; 60) лет, женщин – 52 (39; 64) лет соответственно. Распределение больных COVID-19 по возрасту и полу за анализируемый период несколько отличалось от половозрастной структуры населения Омской области (рисунки 4). Так, удельный вес лиц молодого возраста

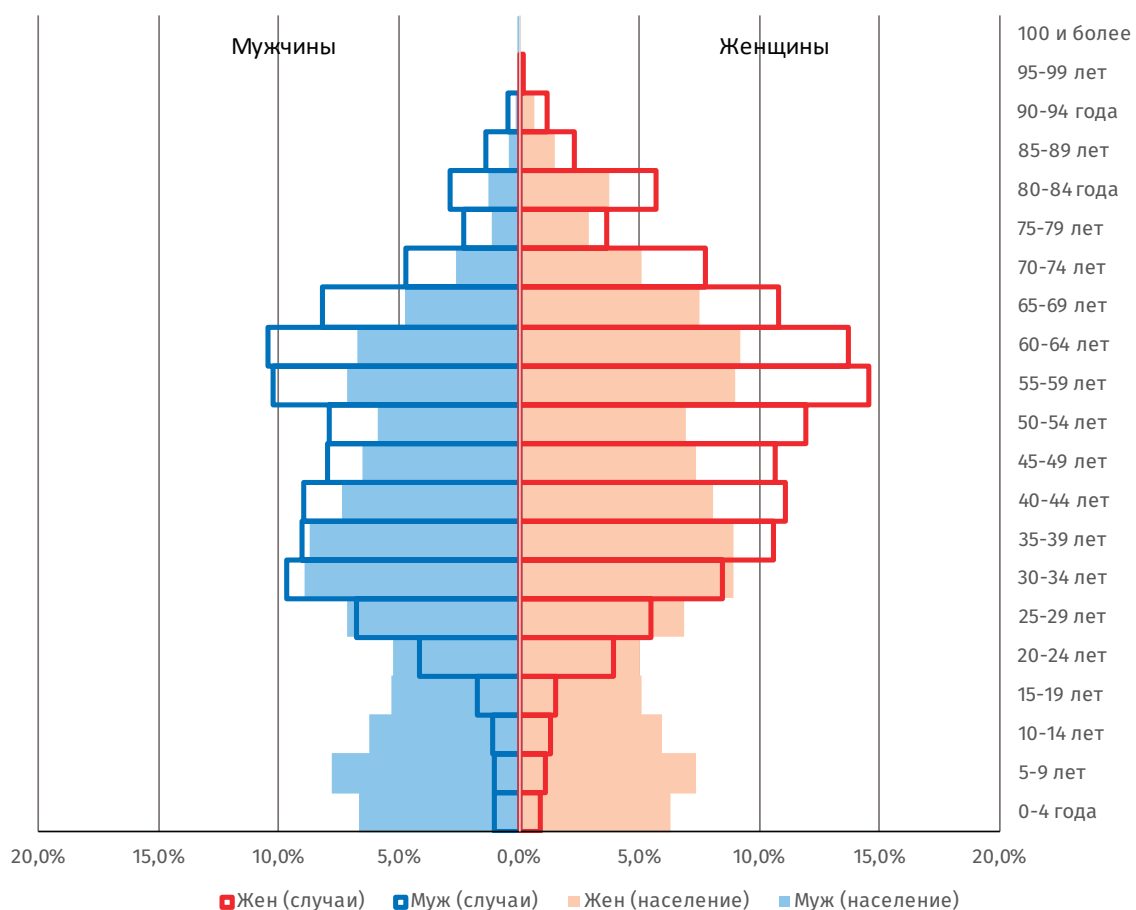


Рисунок 4.

Распределение случаев COVID-19 по полу и возрасту в период 27.03.20-19.07.20 гг. в сравнении с половозрастной структурой населения Омской области (в %)

Figure 4.

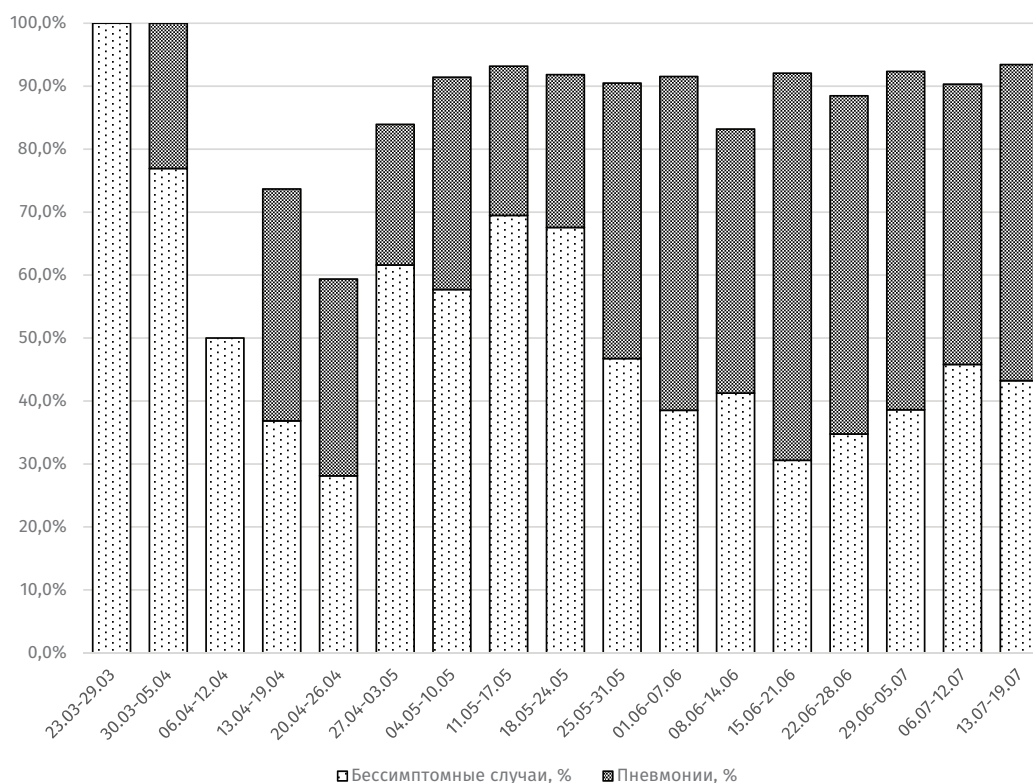
Age and sex distribution of COVID-19 cases in comparison to age and sex distribution of the population in the Omsk Region during 27.03.20-19.07.20 (%)

Рисунок 5.

Структура клинических проявлений COVID-19 на момент выявления случаев (в %)

Figure 5.

Clinical structure of COVID-19 cases (%)



та (до 19 лет включительно) в структуре случаев COVID-19 составлял 5,0% и 4,8% против 25,9% и 24,7% для мужчин и женщин соответственно в структуре всего населения, что свидетельствует об относительно малой вовлеченности указанных возрастных групп в эпидемический процесс COVID-19 на территории Омской области. Возможным объяснением является своевременное закрытие детских дошкольных учреждений и перевод образовательных учреждений на удалённый режим работы, что привело к разобщению коллективов несовершеннолетних жителей Омской области и затруднило их заражение. С этим согласуется и несколько меньший удельный вес возрастных групп 20–29 лет в структуре случаев COVID-19, составивший 10,9% и 9,4% против 12,4% и 11,9% соответственно, что может быть также связано с переводом колледжей и ВУЗов на удалённый режим работы.

Доля возрастных групп 55–69 лет у мужчин и 50–64 лет у женщин в структуре случаев COVID-19 особенно значима: она составляла 28,9% и 39,1% против 19,8% и 25,7% соответственно в структуре всего населения области.

Структура клинических форм COVID-19 на протяжении анализируемого периода наблюдения претерпевала ряд изменений (рисунок 5). В течение первых недель эпидемии, когда число вновь выявленных случаев было менее или равно 10–20 за неделю, преобладали бессимптомные формы

или заболевания с клиникой ОРВИ. По мере увеличения количества новых случаев COVID-19 доля «ковидных» ОРВИ снижалась, и в мае–июле, как правило, не превышала 10% среди всех выявленных за неделю. Удельный вес бессимптомных форм, составляя в период с 27 апреля по 24 мая 60–70%, затем опустился ниже 50%, достигая в отдельные недели 30%. Параллельно отмечался рост доли «ковидных» пневмоний, которая в середине июня (с 15 по 21 июня) составила 61,5%.

На рисунке 6 представлена сглаженная кривая среднелетней внутригодовой динамики эпидемического процесса внебольничных пневмоний в Омской области в 2017–2019 гг. (черная линия) в сопоставлении с оперативными данными за 2020 г. Заметное расхождение многолетней тенденции с данными 2020 года начинается с первых чисел мая. Вместо ожидаемого снижения наблюдается быстрый рост среднего количества экстренных извещений, поданных за неделю, по которым окончательным диагнозом указана «внебольничная пневмония». К концу анализируемого периода превышение среднелетних показателей достигло 9 раз, что не удается объяснить регистрируемыми случаями пневмоний, верифицированных как COVID-19. Это свидетельствует о неполном выявлении COVID-19-пневмоний.

Для оценки динамики распространения COVID-19 в Омской области в сравнении с

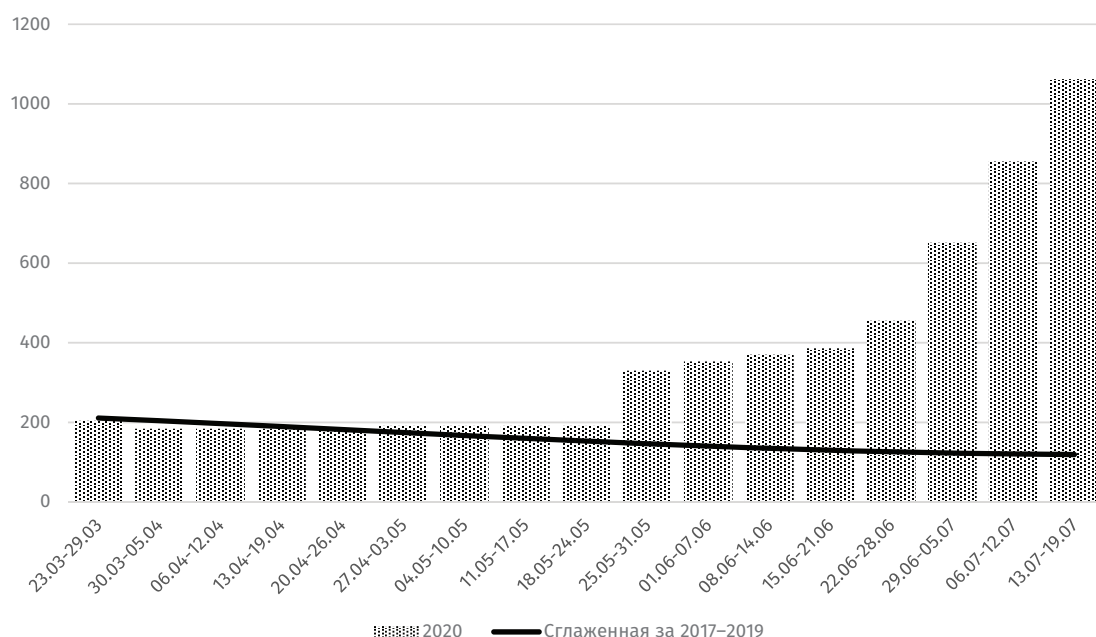


Рисунок 6.

Внутригодовая динамика регистрации случаев внебольничных пневмоний в 2020 г. сравнении со среднепогодными показателями за 2017-2019 гг. в Омской области (абс. по неделям).

Figure 6.

Seasonality of pneumonia cases in Omsk region in 2020 by week compared to the average values in 2017-2019 (absolute numbers)

г. Москва и Московской областью был построен график кумулятивного числа случаев¹. Данные по регионам были совмещены во времени по дате регистрации в регионе первых 100 случаев. Для обеспечения наглядности на графике представлены опорные линии, отмечающие удвоение числа случаев каждые пять, семь и десять дней (рисунки 7). Чем сильнее на графике кривая «изгибается» к горизонту, тем медленнее развивается эпидемический процесс: выраженный изгиб заметен на кривых столичного региона, в то время как кривая Омской области имеет слабо выраженный изгиб, что отражает значительно меньшую скорость снижения трансмиссии COVID-19. Вместе с тем увеличение времени удвоения количества случаев с 7 до 10 дней в Омской области отмечено после 26 дня от точки отсчета, а в Москве – намного позже (78 день после регистрации первых 100 случаев). Среди возможных объяснений причин выявленных различий в характере логарифмических кривых – более раннее относительно начала распространения COVID-19 введение ограничительных мероприятий, но их менее жесткий характер в Омской области по сравнению с г. Москва.

Величины базового показателя репродукции, вычисленные на основе экспоненциального темпа прироста кумулятивного числа случаев COVID-19 в течение раннего периода распространения инфекции в Омской области, составили 1,5 и 1,4 при дельта- и экспоненциально распределенном серийном интервале соответственно. Обе

эти оценки свидетельствуют о наличии потенциала COVID-19 к распространению на территории Омской области. Ожидаемый размах эпидемии в случае продолжения действия ограничительных мер может быть в пределах от 50,8% до 58,0% зараженного населения, а порог коллективного иммунитета – от 28,6% до 33,3% соответственно. В условиях изменяющейся интенсивности противоэпидемических мероприятий реальный размах эпидемии может быть иным: так, по оценкам ВОЗ [10] базовый показатель репродукции COVID-19 значительно выше 2,0÷2,5. Таким образом, при отсутствии проводимых в Омской области противоэпидемических мероприятий ожидаемый естественный размах эпидемии мог бы составить от 79,7% до 89,3% зараженного населения, а порог коллективного иммунитета – от 50,0% до 60,0% соответственно.

Средняя оценка R_t на протяжении периода наблюдения составила 1,18, варьируя от 0,75 до 1,99 (рисунки 8), что в целом наглядно демонстрирует существенно, но недостаточно подавляемый системой эпидемиологического надзора потенциал COVID-19 к распространению среди населения Омской области.

Заключение

На фоне проводимых противоэпидемических мероприятий в период с 27 марта по 19 июля 2020 г. экспоненциальный темп прироста кумулятивного количества случаев COVID-19 составлял 6,6% в сутки, базовый показатель репродукции (R_0) – 1,4-1,5, эффективный показатель репродукции (R_t) – 1,18, порог коллективного

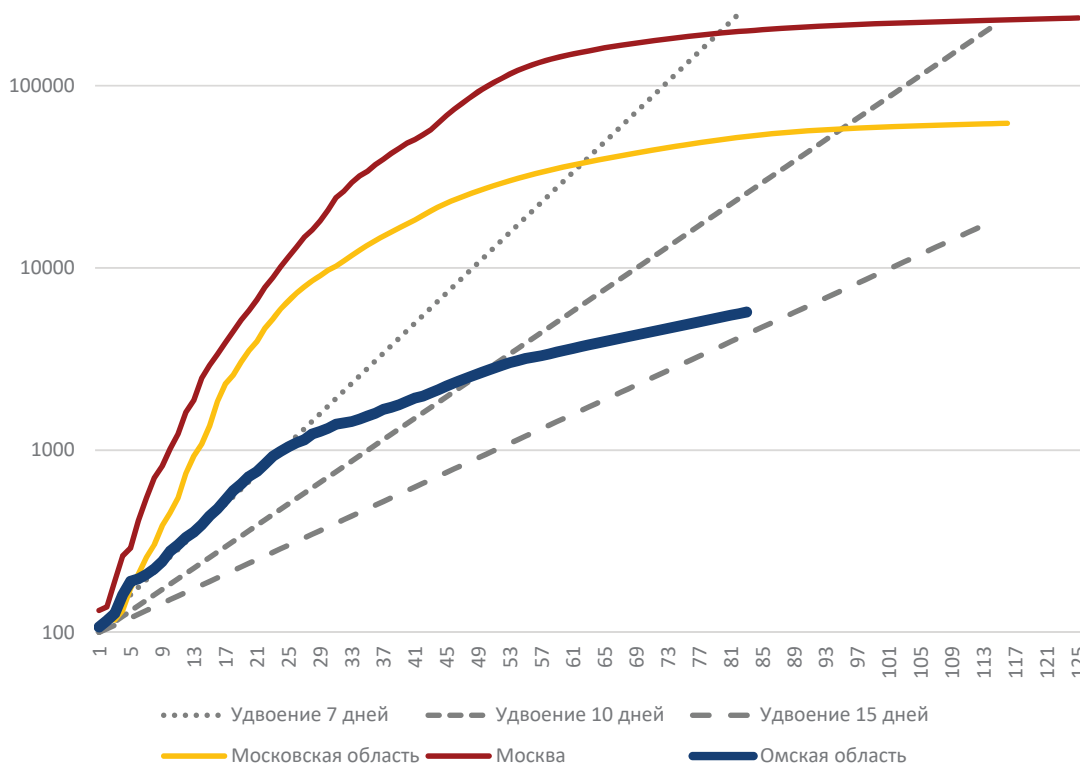
¹ По данным ресурса «стопкоронавирус.рф».

Рисунок 7.

Динамика роста кумулятивного количества заболевших COVID-19, совмещение на дате регистрации 100 случаев (абс., логарифмическая шкала).

Figure 7.

Cumulative count of COVID-19 cases, curves combined at 100 cases (absolute numbers, log scale).



иммунитета – 28,6%. Ожидаемый размах эпидемии в случае продолжения сдерживания эпидемического процесса может достигнуть 58,0% переболевшего населения.

Потенциал COVID-19 к распространению среди населения Омской области подавлен недостаточно. Уменьшение количества выявляемых вирусоносителей и неполное выявление COVID-19

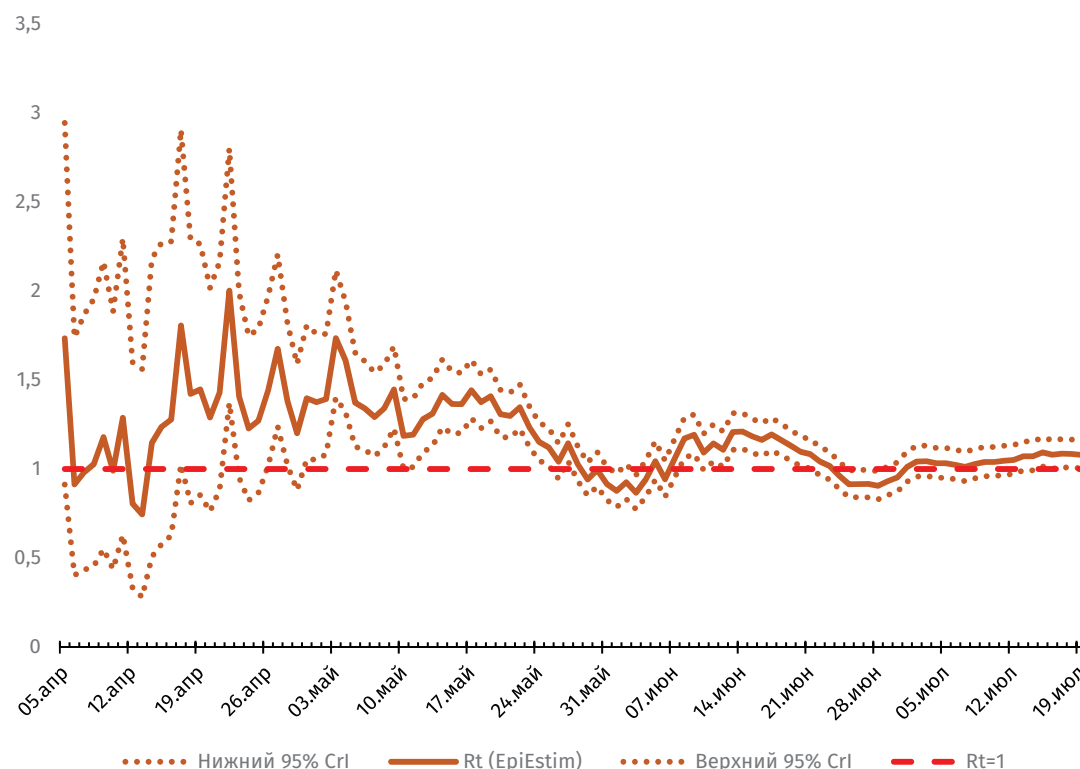
среди заболевших внебольничными пневмониями создают дополнительные риски для скрытого распространения инфекции и осложнения эпидемической ситуации. Сохранение ограничительных мероприятий и превышение порога коллективного иммунитета (28,6% населения) позволит значительно снизить риск усиления распространения COVID-19 в Омской области.

Рисунок 8.

Оперативная оценка эффективного показателя репродукции COVID-19 в Омской области в период с 05.04.20 по 19.07.20 гг.

Figure 8.

Time-varying reproduction number of COVID-19 in the Omsk Region during 27.03.20–19.07.20



Литература / References:

1. WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Accessed: 29.07.2020.
2. WHO. Coronavirus disease (COVID-19). Situation Report – 182. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200720-covid-19-sitrep-182.pdf?sfvrsn=60aabc5c_2. Accessed: 29.07.2020.
3. Wallinga J, Lipsitch M. How generation intervals shape the relationship between growth rates and reproductive numbers. *Proc Biol Sci*. 2007;274(1609):599-604. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3754>
4. Nishiura H, Linton NM, Akhmetzhanov AR. Serial interval of novel coronavirus (COVID-19) infections. *Int J Infect Dis*. 2020;93:284-286. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.060>
5. Park M, Cook AR, Lim JT, Sun Y, Dickens BL. A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. *J. Clin. Med*. 2020;9(4):967. <https://doi.org/10.3390/jcm9040967>
6. Miller JC. A note on the derivation of epidemic final sizes. *Bull Math Biol*. 2012;74(9):2125-2141. <https://doi.org/10.1007/s11538-012-9749-6>
7. Rodpothong P, Auewarakul P. Viral evolution and transmission effectiveness. *World J Virol*. 2012;1(5):131-134. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i5.131>
8. Cori A, Ferguson NM, Fraser C, Cauchemez S. A new framework and software to estimate time-varying reproduction numbers during epidemics. *Am J Epidemiol*. 2013;178(9):1505-1512. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt133>
9. Stolwijk AM, Straatman H, Zielhuis GA. Studying seasonality by using sine and cosine functions in regression analysis. *J Epidemiol Community Health*. 1999;53(4):235-238. <https://doi.org/10.1136/jech.53.4.235>
10. WHO. Coronavirus disease (COVID-19). Situation Report – 46. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200327-sitrep-67-covid-19.pdf?sfvrsn=b65f68eb_4. Accessed: 29.07.20.

Сведения об авторах

Блох Алексей Игоревич, ассистент кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, Омск, ул. Ленина, д. 12); младший научный сотрудник, ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (644050, Россия, Омск, ул. Мира, 7).

Вклад в статью: анализ данных, написание статьи.

ORCID: 0000-0002-0756-2271

Пеньевская Наталья Александровна, доктор медицинских наук, доцент, заместитель директора института по научной работе, ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (644050, Россия, Омск, ул. Мира, 7); профессор кафедры эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: дизайн исследования, написание статьи.

ORCID: 0000-0002-7220-4366

Рудаков Николай Викторович, доктор медицинских наук, профессор, директор института, ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (644050, Россия, Омск, ул. Мира, 7); заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: концепция, дизайн исследования, редактирование статьи.

ORCID: 0000-0001-9566-9214

Лазарев Игорь Иванович, стажер-исследователь, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: анализ данных.

ORCID: 0000-0002-6811-9986

Authors

Dr. Alexey I. Blokh, MD, Assistant Professor, Department of Epidemiology, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation); Junior Researcher, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections (7, Mira Street, Omsk, 644050, Russian Federation).

Contribution: performed the data analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-0756-2271

Dr. Natalia A. Penievskaia, MD, PhD, Chief Research Officer, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections (7, Mira Street, Omsk, 644050, Russian Federation); Professor, Department of Epidemiology, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-7220-4366

Prof. Nikolay V. Rudakov, MD, PhD, Professor, Chief Executive Officer, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections (7, Mira Street, Omsk, 644050, Russian Federation); Head of Department of Microbiology, Virology and Immunology, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-9566-9214

Dr. Igor I. Lazarev, Research Associate, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation).

Contribution: performed the data analysis.

ORCID: 0000-0002-6811-9986

Статья поступила: 31.07.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 31.07.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-18-23>

ВЛИЯНИЕ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОСФЕР НА АНГИОГЕНЕЗ С УЧАСТИЕМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ *IN VITRO*

УСПЕНСКАЯ Ю.А.^{1,2*}, МАЛИНОВСКАЯ Н.А.¹, МОРГУН А.В.¹, ОСИПОВА Е.Д.¹, САЛМИНА А.Б.¹

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск, Россия

²ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», г. Красноярск, Россия

Резюме

Цель. Оценить особенности ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер.

Материалы и методы. Источником нейросфер служили мыши C57Bl6 в возрасте 10–14 суток постнатального развития, из головного мозга которых выделяли гиппокамп для получения стволовых и прогениторных клеток нейрональной природы. Для регистрации особенностей ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер использовали набор для оценки ангиогенеза Angiogenesis Assay Kit (In Vitro) (Abcam, ab204726, США) согласно протоколу производителя, с последующей статистической обработкой данных.

Результаты. В присутствии нейросфер произошло уменьшение числа образовавшихся сосудистых петель, тогда как остальные параметры ангиогенеза (средняя площадь и периметр петель, общая длина сосудов и число контактов

на мм²) не имели статистической разницы через 18 часов культивирования.

Заключение. Пролиферативная активность нейросфер тормозит неоангиогенез *in vitro*. Полученные данные могут служить основой для разработки новой технологии управления церебральным ангиогенезом.

Ключевые слова: ангиогенез, эндотелиоциты, гиппокамп, нейрональные стволовые и прогениторные клетки.

Конфликт интересов

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

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке Государственного задания на проведение научных исследований Министерства здравоохранения РФ (2018–2020 гг.).

Для цитирования:

Успенская Ю.А., Малиновская Н.А., Моргун А.В., Осипова Е.Д., Салмина А.Б. Влияние развивающихся гиппокампальных нейросфер на ангиогенез с участием церебральных эндотелиоцитов *in vitro*. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3): 18–23. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-18-23>

*Корреспонденцию адресовать:

Успенская Юлия Александровна, 660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1, E-mail: yulia.uspenskaya@mail.ru
© Успенская Ю.А. и др.

ORIGINAL RESEARCH

MOUSE HIPPOCAMPAL NEUROSPHERES NEGATIVELY REGULATE CEREBRAL ANGIOGENESIS

Yulia A. Uspenskaya^{1, **}, Natalia A. Malinovskaya¹, Andrey V. Morgun¹, Elena D. Osipova¹, Alla B. Salmina¹

¹Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

²Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract

Aim. To evaluate the features of cerebral angiogenesis in the presence of neurospheres, free-floating clusters of neural stem and progenitor cells.

Materials and Methods. Endothelial cells were optionally co-cultured with neurospheres were isolated from the hippocampus of 10-14-days-old C57Bl6 mice. Angiogenesis was evaluated *in vitro* by means of the angiogenesis assay kit (Abcam, ab204726) according to the manufacturer's protocol.

Results. The number of vascular loops was decreased in the presence of neurospheres. Other angiogenic parameters (average loop area and perim-

eter, total vessel length and number of contacts per mm²) had no statistically significant differences after 18 hours of culture.

Conclusion. The proliferative activity of neurospheres inhibits *in vitro* cerebral angiogenesis.

Keywords: angiogenesis, endothelial cells, hippocampus, neural stem cells, neural progenitor cells.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

The study was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (State Assignment for Research, 2018-2020).

◀ English

For citation:

Yulia A. Uspenskaya, Natalia A. Malinovskaya, Andrey V. Morgun, Elena D. Osipova, Alla B. Salmina. Mouse hippocampal neurospheres negatively regulate cerebral angiogenesis. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3): 18-23. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-18-23>

**Corresponding author:

Yulia A. Uspenskaya, 1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022, e-mail: yulia.uspenskaya@mail.ru
© Yulia A. Uspenskaya et al.

Введение

Одним из актуальных направлений в нейронауках является исследование вопросов ангиогенеза. Ангиогенез – образование новых кровеносных сосудов из уже существующих сосудов является важным процессом, который присутствует как при нормальных, так и при патологических состояниях. Изучение механизмов ангиогенеза и факторов, влияющих на него, вызывает неослабевающий интерес у исследователей в различных областях в течение многих лет. Как избыточное, так и недостаточное образование новых кровеносных сосудов приводит к развитию необратимых морфологических и функциональных изменений центральной нервной системы.

Известно, что в нейрогенных нишах головного мозга (в постнатальном периоде это субгранулярная зона гиппокампа, субвентрикулярная зона), где формируется локальное микроокружение, способствующее пролиферации и дифференцировке нейральных стволовых и прогениторных клеток в ответ на действие стимулов (когниция, репарация), процессы ангиогенеза могут иметь существенные особенности. Так, важную роль в регулировании структуры и функции церебральных сосудов играют клетки нейроваскулярной единицы головного мозга, которые тесно взаимодействуют между собой и обеспечивают функциональное сопряжение механизмов нейрональной активности

и локальной микроциркуляции. Ингибирование их пролиферации приводит к резкому снижению плотности и разветвленности корковых кровеносных сосудов [1]. Кроме того, тесная связь между нервными и сосудистыми клетками имеет решающее значение для нормального развития и функционирования мозга.

Поскольку ангиогенез может сочетаться с нейрогенезом, сопряжение областей ангиогенеза и окружающих тканей может представлять новую мишень для терапии патологии головного мозга. В настоящее время исследователи не теряют оптимизма в плане использования нейрональных стволовых клеток в качестве субстрата для восстановления нейро- и ангиогенеза поврежденного головного мозга. Самые недавние экспериментальные результаты демонстрируют, что стимуляция даже небольшого пула нейрональных стволовых клеток в ткани головного мозга «омолаживает» мозг, редуцируя возраст-ассоциированные проявления когнитивного дефицита [2]. В этом контексте перспективным подходом может быть оценка особенностей ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер, представляющих собой сферообразное скопление нейрональных стволовых и прогениторных клеток [3].

Цель исследования

Оценить особенности ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер.

Материалы и методы

Объект исследования – мыши линии C57Bl6 в возрасте 10–14 суток постнатального развития, которые были использованы в эксперименте для получения стволовых и прогениторных клеток нейрональной природы (нейросфер).

Животных декапитировали после охлаждения на льду и производили забор головного мозга. Мозг помещали в ледяной раствор 2% глюкозы в PBS. Выделяли гиппокамп и иссекали до размеров 1 мм³. После окончания диссекции выделенную ткань переносили в свежий раствор 2% глюкозы в PBS (в конической пробирке 14 мл) на 1 минуту. После осаждения ткани удаляли супернатант. Оставшуюся ткань ресуспендировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, USA). Проводили тритурацию (25–30 раз) ткани стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток. К полученной суспензии добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Через 2 минуты, после осаждения неразделенных кусочков ткани, собирали супернатант и переносили его в новую стерильную 14 мл пробирку. Собранный супернатант центрифугировали при 150 g в течение 5 минут, после чего удаляли супернатант и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией [4].

Подсчет количества клеток осуществляли с помощью цитометра Scepter Cell Counter (Millipore). Полученные клетки в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток/мл сеяли в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл «конечной» среды NeuroCult NS-A Proliferation. Инкубация осуществлялась в условиях инкубатора при 5% CO₂ и 37°C. Через 24–48 часов наблюдали образование нейросфер.

Для регистрации особенностей ангиогенеза *in vitro* в присутствии нейросфер использовали набор для оценки ангиогенеза Angiogenesis Assay Kit (In Vitro) (Abcam, ab204726, США) согласно протоколу производителя.

На дно лунок культурального 96-луночного планшета (предварительно охлажденного на льду) вносили 50 мкл размороженного раствора внеклеточного матрикса. Осуществляли инкубацию в течение 1 часа при 37°C до перехода раствора в гель. В каждую лунку вносили 20 000 эндотелиальных клеток в 100 мкл среды. В опытную группу внесли нейросферы (500 нейросфер на лунку). В качестве контрольной группы использовали чистую культуру эндоте-

лиальных клеток. В качестве негативного контроля в питательную среду был добавлен ингибитор пролиферативной активности клеток (Винбластин) – 1 мкл/мл. Клетки инкубировали в течение 18 часов в условиях CO₂ инкубатора (37°C, содержащем 5% CO₂).

После окончания инкубации удаляли среду из лунок и промывали 100 мкл промывочного буфера. В каждую лунку вносили 100 мкл рабочего раствора окрашивающего красителя 1: 200 и инкубировали в течение 30 минут при 37°C, после чего оценивали особенности ангиогенеза (число петель, средний периметр петли, площадь занимаемой петли) с использованием микроскопа ZOE (Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов непараметрической статистики (критерий Манна–Уитни). Результаты представлены в виде $M \pm SD$ (σ), где M – среднее значение, σ – стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ и менее. Анализ изображений проводили с применением пакета программного обеспечения ImageJ (1.47 v, США).

Результаты и обсуждение

При оценке влияния нейросфер на процессы ангиогенеза *in vitro* установлено, что в присутствии нейросфер произошло уменьшение числа образовавшихся сосудистых петель ($p < 0,01$). Остальные параметры ангиогенеза, такие как средняя площадь и периметр петель, а также общая длина сосудов и число контактов на мм², не имели статистической разницы через 18 часов культивирования (таблица 1, рисунок 1). Таким образом, локальная нейрогенная активность тормозит неопластический ангиогенез *in vitro*.

Вероятно, терапевтический потенциал нейросфер отмечается только в моделях повреждений головного мозга и проявляется в способности нейрональных стволовых клеток продуцировать широкий спектр физиологически активных веществ, обладающих ангиогенным, антиапоптотическим, антиоксидантным и митогенным эффектами [5–7]. Считается, что усиление ангиогенеза является одной из стратегий, способствующих функциональному восстановлению после ишемического инсульта и других повреждений головного мозга [8]. Так, постишемический ангиогенез может способствовать ремоделированию нейронов, по крайней мере, двумя способами [9]. Во-первых, новые кровеносные сосуды, которые образуются

	Число петель Loop number	Средняя площадь петли, мм ² Average loop area, mm ²	Средний периметр петли, мм Average loop perimeter, mm	Общая длина "сосудов" мм/мм ² Total vessel length, mm per mm ²	Число контактов/мм ² Number of contacts per mm ²
Эндотелий Cerebral endothelial cells	9,3 ± 3	0,015 ± 0,002	0,456 ± 0,03	15,032 ± 1,5	4 ± 1
Эндотелий + Нейросферы Cerebral endothelial cells + neurospheres	6,2 ± 2*	0,014 ± 0,001	0,477 ± 0,03	13,357 ± 0,8	5 ± 1
Эндотелий + Винбластин Cerebral endothelial cells + vinblastine	0,8 ± 0,5 *#	0,007 ± 0,003 *#	0,332 ± 0,04 *#	1,33 ± 0,5 *#	2 ± 1 *#

Таблица 1.

Влияние нейросфер на особенности ангиогенеза *in vitro*

Table 1.

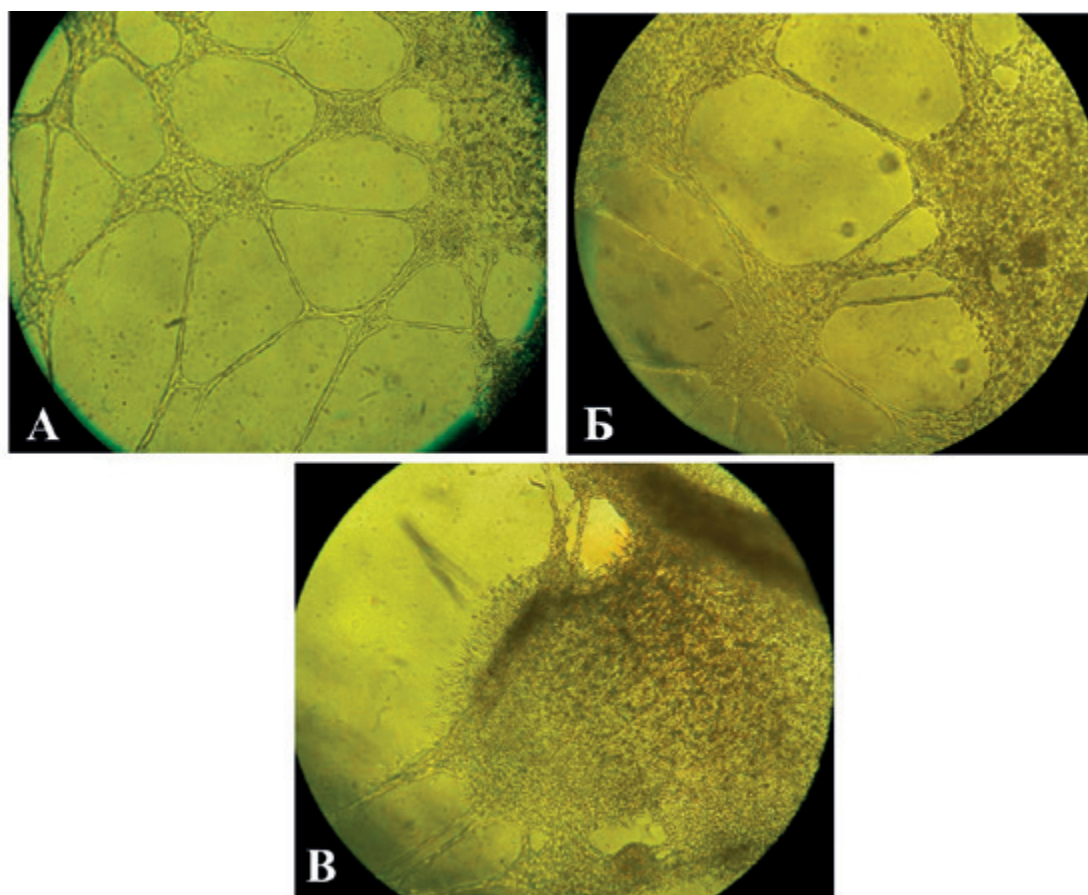
The influence of neurospheres on *in vitro* angiogenesis parameters**Примечание:*** – отличие от группы контроля, $p < 0,01$, критерий Манна-Уитни ($n = 4$).# – отличие от группы эндотелий + нейросферы, $p < 0,01$, критерий Манна-Уитни ($n = 4$).* – difference from the control group, $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни ($n = 4$).# – difference from the endothelium + neurosphere group, $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни ($n = 4$).* $p < 0,01$ as compared with the control cells, Mann-Whitney U-test ($n = 4$).# $p < 0,01$ as compared with the cells with neurospheres, критерий Mann-Whitney U-test ($n = 4$).*as compared with the control cells, $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test test ($n = 4$).#as compared with the cells with neurospheres, $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test test ($n = 4$).

Рисунок 1.

Особенности ангиогенеза в присутствии нейросфер. А – интактный эндотелий, Б – эндотелий + нейросферы, В – эндотелий + винбластин

Figure 1.

In vitro angiogenesis in the presence of neurospheres. A – intact cerebral endothelial cells, B – cerebral endothelial cells + neurospheres, C – cerebral endothelial cells + vinblastine

после ишемии, участвуют в регуляции направления роста аксонов с помощью фактора роста эндотелия сосудов и ламинин / $\beta 1$ -интегрин-сигнального пути. Во-вторых, кровеносные сосуды усиливают нейрогенез в три этапа: 1) кровеносные сосуды усиливают пролиферацию нейрональных стволовых клеток / клеток-предшественников посредством экспрессии нескольких внеклеточных сигналов; 2) микрососуды поддерживают миграцию нейрональных стволовых клеток / клеток-предшественников в направлении перинфарктной зоны, поставляя кислород, питательные вещества и растворимые факторы, а также выступая в качестве скаффолдов для миграции; и 3) оксигенация, индуцированная ангиогенезом в ишемическом ядре, способствует

дифференцировке мигрирующих нервных стволовых клеток / клеток-предшественников в зрелые нейроны. При этом васкулярная система головного мозга в физиологических условиях стабильна за счет отлаженного взаимодействия между стимуляторами и ингибиторами роста сосудов, тогда как замедленный или чрезмерный ангиогенез может существенно нарушить функцию органа и привести к развитию заболеваний.

Заключение

Таким образом, впервые установлено, что пролиферативная активность нейросфер тормозит неоангиогенез *in vitro*. Полученные данные могут служить основой для разработки новой технологии управления церебральным ангиогенезом.

Литература / References:

1. Ma S, Santhosh D, Kumar TP, Huang Z. A brain-region-specific neural pathway regulating germinal matrix angiogenesis. *Dev Cell*. 2017;4 (4):366-381. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.014>
2. Berdugo-Vega G, Arias-Gil G, López-Fernández A, Artegiani B, Wasielewska JM, Lee C-C, Lippert MT, Kempermann G, Takagaki K, Calegari F. Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nat Commun*. 2020;11(1):135. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14026-z>.
3. Khan J, Das G, Gupta V, Mohapatra S, Ghosh S, Ghosh S. Neurosphere development from hippocampal and cortical embryonic mixed primary neuron culture: a potential platform for screening neurochemical modulator. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9(11):2870-2878. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00414>
4. Хилажева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Салмина А.Б. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. *Цитология*. 2015;57(10):710-713 [Khilazheva ED, Boytsova EB, Pozhilenkova EA, Solonchuk YR, Salmina AB. The model of neurovascular unit *in vitro* consisting of three cells types. *Tsitologiya*. 2015;57(10):710-713. (In Russ.).]
5. Capone C, Frigerio S, Fumagalli S, Gelati M, Principato M-C, Storini C, Montinaro M, Kraftsik R, De Curtis M, Parati E, De Simoni M-G. Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. *PLoS One*. 2007;2 (4):e373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000373>
6. Kishida N, Maki T, Takagi Y, Yasuda K, Kinoshita H, Ayaki T, Noro T, Kinoshita Y, Ono Y, Kataoka H, Yoshida K, Lo EH, Arai K, Miyamoto S, Takahashi R. Role of perivascular oligodendrocyte precursor cells in angiogenesis after brain ischemia. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(9):e011824. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011824>.
7. Tang Y, Wang J, Lin X, Wang L, Shao B, Jin K, Wang Y, Yang G-Y. Neural stem cell protects aged rat brain from ischemia-reperfusion injury through neurogenesis and angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(7):1138-1147. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.61>
8. Zhang RL, Chopp M, Roberts C, Liu X, Wei M, Nejad-Davarani SP, Wang X, Zhang ZG. Stroke increases neural stem cells and angiogenesis in the neurogenic niche of the adult mouse. *PLoS One*. 2014;9(12):e113972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113972>
9. Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural Regen Res*. 2020;15(1):16-19. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264442>.

Сведения об авторах

Успенская Юлия Александровна, доктор биологических наук, доцент, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняк д.1); профессор кафедры внутренних незаразных болезней, акушерства и физиологии сельскохозяйственных животных ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет» (660049, Россия, г. Красноярск, пр. Мира д. 90).
Вклад в статью: написание текста статьи, анализ литературы.
ORCID: 0000-0003-4386-9753

Authors

Prof. Yulia A. Uspenskaya, DSc, Associate Professor, Research Fellow, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation); Professor, Department of Internal Noncommunicable Diseases, Obstetrics and Physiology of Livestock, Krasnoyarsk State Agrarian University (90, Prospekt Mira, Krasnoyarsk, 660049, Russian Federation).
Contribution: performed the literature review; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0003-4386-9753

Малиновская Наталья Александровна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняк, д.1).

Вклад в статью: экспериментальные работы, написание текста статьи, анализ литературы.

ORCID: 0000-0002-0033-3804

Моргун Андрей Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняк, д.1).

Вклад в статью: экспериментальные работы, статистический анализ, написание текста статьи.

ORCID: 0000-0002-9644-5500

Осипова Елена Дмитриевна, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняк, д.1).

Вклад в статью: экспериментальные работы, написание текста статьи, анализ литературы.

ORCID: 0000-0002-9718-1260

Салмина Алла Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник и руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, заведующая кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. П. Железняк, д.1).

Вклад в статью: выдвижение общей концепции, постановка задач, редакция текста статьи.

ORCID: 0000-0003-4012-6348

Prof. Natalia A. Malinovskaya, MD, DSc, Senior Researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments; performed the literature review; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-0033-3804

Dr. Andrey V. Morgun, MD, DSc, Leading Researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments; performed the statistical analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-9644-5500

Mrs. Elena D. Osipova, Research Fellow, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments; performed the literature review; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-9718-1260

Prof. Alla B. Salmina, MD, DSc, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Head of the Department of Biological, Medical, Pharmaceutical, and Toxicological Chemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-4012-6348

Статья поступила: 21.07.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 21.07.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-24-34>

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КРИТИЧЕСКИХ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ СВОДА ЧЕРЕПА КРЫС

ВЕРЕМЕЕВ А.В.^{1,2*}, БОЛГАРИН Р.Н.¹, НЕСТЕРЕНКО В.Г.², АНДРЕЕВ-АНДРИЕВСКИЙ А.А.³

¹Общество с ограниченной ответственностью «Матрифлекс», г. Москва, Россия

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия

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

Резюме

Цель. Оценить эффективность гетерологического деминерализованного костного матрикса (ДКМ) для замещения костных дефектов в эксперименте на модели критического дефекта костей свода черепа крыс.

Материалы и методы. Для эксперимента использовали самцов крыс (n = 48) линии Sprague-Dawley возрастом от 4,5 до 6 месяцев. В ходе оперативного вмешательства создавали критический дефект костей свода черепа и замещали его костным аутооттрансплантатом, гетерологическим ДКМ или препаратом-компараторм (Geistlich Bio-Oss®) либо оставляли незаполненным (отрицательный контроль). Через 4 или 12 недель выводили крыс из эксперимента и проводили исследование областей дефекта при помощи микроскопической оценки срезов тканей, окрашенных гематоксилином и эозином (доля минерализованной ткани от просвета дефекта) и микрокомпьютерной томографии (объем новообразованной костной ткани, минеральная плотность новообразованной ткани, толщина новообразованных костных элементов и распределение их диаметра).

Результаты. Замещение дефектной области костным аутооттрансплантатом, как и ожидалось, показало наилучшие результаты. При применении гетерологического ДКМ и препарата-компаратора наблюдалась выраженное заполнение критиче-

ского дефекта, при этом статистически значимых различий в показателях репарации костной ткани между разработанным оригинальным прототипом и медицинским изделием сравнения выявлено не было. Микрокомпьютерно-томографический и гистологический методы исследования продемонстрировали конкордантные результаты (эффекты имели сопоставимую степень выраженности).

Заключение. Гетерологический ДКМ эффективен для замещения критических костных дефектов свода черепа крыс.

Ключевые слова: деминерализованный костный матрикс, ксенотрансплантаты, аутооттрансплантаты, остеогенез, критический дефект свода черепа.

Выражение благодарности

Авторы благодарят коллектив ООО «НИИ митоинженерии МГУ» за содействие в разработке животной модели и получении экспериментальных данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

Финансирование работы осуществлялось за счет средств гранта ООО «Матрифлекс» от Фонда «Сколково» в рамках проекта «Создание линейки медицинских изделий для регенерации костной ткани на основе нереконструированного коллагена».

Для цитирования:

Веремеев А.В., Болгарин Р.Н., Нестеренко В.Г., Андреев-Андриевский А.А. Эффективность гетерологического деминерализованного костного матрикса для замещения критических костных дефектов свода черепа крыс. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3): 24-34. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-24-34>

*Корреспонденцию адресовать:

Веремеев Алексей Владимирович, 125252, Россия, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12, корп. А, п. 1, эт. 2, оф. 1. e-mail: al.veremeev@gmail.com
© Веремеев А.В. и др.

ORIGINAL RESEARCH

HETEROLOGOUS DEMINERALISED BONE MATRIX IS EFFICIENT FOR THE REPAIR OF CRITICAL-SIZED RAT CALVARIAL DEFECTS

ALEXEY V. VEREMEEV^{1,2**}, ROMAN N. BOLGARIN¹, VLADIMIR G. NESTERENKO², ALEXANDER A. ANDREEV-ANDRIEVSKIY³¹Matriflex LLC, Moscow, Russian Federation²Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation³Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract

Aim. To evaluate the efficacy of heterologous demineralised bone matrix (DBM) for the replacement of bone defects using a critical-sized rat calvarial defect model.

Materials and Methods. For the experiments, we used 48 Sprague-Dawley rats (4.5 to 6 months of age). Critical-sized (8 mm diameter) calvarial defect was filled by the bone autograft, heterologous DBM, or comparator product (Geistlich Bio-Oss®) or remained unfilled (negative control). Upon 4 or 12 weeks, rats were euthanised with the subsequent investigation of the defect and adjacent tissues by means of hematoxylin and eosin staining (mineralized tissue area to the defect area ratio) and microcomputed tomography (volume, thickness, and mineral density of the repaired tissue).

Results. In our experimental setting, bone autograft was the most efficient in bone repair. Heterologous DBM and comparator product were equally efficient in filling the defect and did not show

any statistically significant differences regarding any of the parameters. Microcomputed tomography and routine histological examination demonstrated concordant results.

Conclusion. Heterologous DBM is efficient for the repair of critical-sized rat calvarial defects.

Keywords: demineralised bone matrix, heterologous implants, autograft, bone repair, critical-sized rat calvarial defect,

Acknowledgements

The authors sincerely thank the staff of Mitogenengineering Research Institute LLC at Moscow State University for the support in the development of an animal model and data collection.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

The study was funded by the grant of Skolkovo Foundation allocated to Matriflex LLC for the project «Development of native collagen-based solutions for bone regeneration».

◀ English

For citation:

Alexey V. Veremeev, Roman N. Bolgarin, Vladimir G. Nesterenko, Alexander A. Andreev-Andrievskiy. Heterologous demineralised bone matrix is efficient for the repair of critical-sized rat calvarial defects. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3): 24-34. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-24-34>

**Corresponding author:

Dr. Alexey V. Veremeev, Aviakonstruktora Mikoyana Street, 12, A, 2nd Floor, Office 1, Moscow, Russian Federation, 125252. E-mail: al.veremeev@gmail.com
© Alexey V. Veremeev et al.

Введение

Одним из приоритетных направлений современной травматологии и ортопедии является сокращение сроков реабилитации и улучшение отдаленных результатов, в том числе качества жизни после операций на элементах опорно-двигательной системы [1]. Проблема инвалидизации населения трудоспособного возраста по причине патологий данного рода и травм не теряет актуальности, несмотря на со-

временные методы диагностики и лечения [2–5]. Для решения этой проблемы активно изучается возможность форсирования естественной регенерации костной ткани вместо использования металлических и керамических имплантатов [6–8].

Использование костных аутооттрансплантатов при оперативном лечении дефектов костной ткани является эталоном в связи с абсолютной биосовместимостью для реципиента [9–11].

Однако применение аутоотрансплантатов ограничено высокой травматичностью при их заборе, приводящей к снижению качества жизни пациента в послеоперационном периоде (главным образом вследствие развития хронической инфекции и перманентных болей в области изъятия аутокости) [10, 11]. Аллотрансплантаты, получаемые из донорского материала, обладают значительно меньшим остеокондуктивным и остеоиндуктивным потенциалом, а также несут высокий риск инфекционных и аутоиммунных осложнений [10, 11]. Современные научно-технические разработки в данной области ориентированы на создание аналогов костных материалов, содержащих прогениторные клеточные популяции и биоактивные факторы направленной дифференцировки, что способствует управляемой регенерации ткани [12–16].

Внеклеточный матрикс кости представляет собой нативный биоматериал, на 85–90% состоящий из коллагена I типа, а также содержащий другие типичные для внеклеточного матрикса в целом белки (коллаген III, V, IX, XII, XIV, XIX, XX и XXI типа, фибронектин, альбумин, фетuin-A, различные факторы роста) [17, 18]. Кроме того, при частичной деминерализации костный матрикс также содержит гидроксипатит ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), вместе с коллагеном I типа определяющий структурные и функциональные характеристики костной ткани [17, 18]. Процесс выделения костного матрикса из ксеногенной костной ткани обладает высокой технологичностью [19, 20]; кроме того, за счет своей волокнисто-пористой структуры выделяемый кристаллический костный минерал является проницаемым для лекарственных средств, после имплантации успешно заселяется клетками и обладает высокой биосовместимостью, что делает его подходящей системой доставки лекарственных средств для таргетной терапии [21–23]. Еще одним важным достоинством костного матрикса при замещении костной ткани является его низкая иммуногенность, обусловленная естественной природой гидроксипатита и высокой консервативностью белков экстрацеллюлярного матрикса в процессе эволюции [24]. Костный матрикс используется как в сегментарном виде для получения каркасов (матрикса, скаффолдов) [25], так и в виде микроразмерных или наноразмерных гранул для самостоятельного замещения костной ткани [26, 27] либо в составе композитных материалов как вспомогательный материал с целью увеличения остео-

кондуктивных и остеоиндуктивных свойств каркасов для замещения костных дефектов [28, 29].

Из всех источников предпочтительным является гетерологический (ксеногенный) костный матрикс, сохраняющий свою структуру и аморфную форму при различных способах обработки, в том числе включающих в себя методы глубокой очистки, децеллюляризации и деминерализации [28, 29]. Поэтому гетерологический деминерализованный костный матрикс (ДКМ) не изменяет свои первоначальную структуру и свойства, что обеспечивает сравнимую с нативной тканью прочность, остеокондуктивность и остеоиндуктивность [25–27].

Ранее нашей группой был разработан протокол для получения гетерологического ДКМ с целью замещения дефектов костной ткани и последующего клинического внедрения.

Цель исследования

Оценка эффективности гетерологического ДКМ в эксперименте на модели критического дефекта костей свода черепа крыс.

Материалы и методы

Объекты исследования

Источником гранулированного нативного не-реконструированного ДКМ (диаметр 0,25–1 мм) были бедренные кости быка. ДКМ получали при помощи последовательных стадий очистки костной ткани: механическая очистка, дезинфекция, децеллюляризация, удаление липидов, удаление нуклеиновых кислот, деминерализация, фракционирование и газовая стерилизация. В качестве препарата-компаратора использовалось медицинское изделие Geistlich Bio-Oss® (Geistlich Pharma), являющееся нативным костным минералом в виде гранул аналогичного диаметра, который получают из костной ткани крупного рогатого скота путем многоступенчатой очистки по патентованной технологии с последующей стерилизацией γ -излучением.

Лабораторные животные

Эксперименты с лабораторными животными были выполнены на базе виварно-экспериментального комплекса ООО «НИИ митохондриологии МГУ» в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, и одобрены локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института митохондриологии при МГУ (код этического утверждения 37/2019, утверждено 17 июня 2019

года). В эксперимент было включено 48 самцов крыс линии Sprague-Dawley со зрелым костным скелетом (возрастом от 4,5 до 6 месяцев) на момент начала эксперимента. Лабораторные животные были получены из подразделения филиала Института биоорганической химии Российской академии наук – питомника лабораторных животных «Пушино». Животные были клинически здоровы и не были инфицированы патогенами из списка FELASA 2014, за исключением *Helicobacter spp.* и *Gardia muris*. Адаптационный период животных после прибытия из питомника составлял 7 суток.

В пилотном эксперименте животных содержали в полипропиленовых индивидуальных проветриваемых клетках в блоке передержки животных, в основном эксперименте – в клетках открытого типа в барьерной зоне виварно-экспериментального комплекса. В предоперационный период крысы содержались в клетках ТЗ (Tecniplast, Италия) с площадью пола 780 см² по две особи или в клетках Т4 (Tecniplast, Италия) с площадью пола 1500 см² по четыре особи. На протяжении всего исследования животные имели неограниченный доступ к корму («Чара для содержания», Ассортимент-Агро, Россия) и стерильной обратнотокмической воде. В качестве подстилки использовали деревянную щепу Lignocel (JRS, Россия). Все материалы, поступающие к животным, автоклавируют. На протяжении всего времени эксперимента поддерживали стандартные условия: циклы температуры (23 ± 3 °C), относительной влажности ($50 \pm 20\%$) и 12 ч света / темноты (включение света в 09:00) и отслеживали состояние здоровья всех крыс ежедневно.

Все животные, участвующие в эксперименте, были индивидуально промаркированы путем перфорирования ушных раковин, также клетки маркировали карточками, где содержалась ин-

формация о заселяющих клетку особях и проводимых с ними манипуляциях. Особям пилотного эксперимента проводился мониторинг веса ежедневно в течение 7 дней после оперативного вмешательства, крысам основного эксперимента – ежедневно в течение 6 дней после оперативного вмешательства. Массу тела измеряли при помощи технических весов Pioneer PA2102 (Ohaus, США), с точностью ± 1 г. Распределение крыс по экспериментальным группам проводили путем рандомизации с использованием стандартного алгоритма GraphPad (GraphPad Prism).

Экспериментальная модель

В работе использовали экспериментальную модель дефекта костей свода черепа, которая состояла в хирургическом удалении теменных костей диаметром 8 мм [30]. Дефект такого размера у взрослых крыс является «критическим» и исключает самопроизвольную регенерацию костной ткани [30]. В пилотном эксперименте на 10 крысах была отработана методика выполнения хирургической операции по созданию критического дефекта костей свода черепа. Часть животных не подвергалась манипуляциям по заполнению дефекта. Другой группе крыс дефект заполняли аутооттрансплантатом костной ткани (удаленным участком свода черепа). Состояние животных отслеживали на протяжении 7 дней после операции, обращая внимание на целостность швов и видимые признаки послеоперационных осложнений, после чего подвергали эвтаназии и оценивали морфологию дефектного участка. Основной эксперимент (по 6 крыс в группе) включал в себя оценку регенеративных свойств гетерологического ДКМ в сравнении с препаратом-компараторм Geistlich Bio-Oss® и двумя контрольными группами – без заполнения костного дефекта и с дефектом, заполненным удаленным участком свода черепа по аналогии с пилотным экспериментом (таблица 1).

Экспериментальная группа (n = 12 на группу) <i>Experimental group</i> (n = 12 per group)	Исследуемый биоматериал <i>Sample biomaterial</i>	Принцип сбора образцов <i>Sample collection</i>	Методы оценки репаративного процесса <i>Methods of examination</i>
Отрицательный контроль <i>Negative control</i>	Отсутствует <i>None</i>	4 и 12 недель после создания дефекта (по 6 особей на временную точку) <i>4 and 12 weeks after the defect (6 rats per time point)</i>	<i>Microcomputed tomography, histological examination (hematoxylin and eosin staining, light microscopy)</i>
Положительный контроль <i>Positive control</i>	Удаленные кости свода черепа (аутооттрансплантат) <i>Excised calvarial bones (autograft)</i>		
Препарат-компараторм <i>Comparator product</i>	Geistlich Bio-Oss®		
Тестируемый препарат <i>Tested solution</i>	Heterologous demineralised bone matrix		

Таблица 1.

Схема основного эксперимента

Table 1.

Experimental design

Животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения 15-20 мг/кг тилетамина, 15-20 мг/кг золазепама и 3-6 мг/кг ксилазина. Для доступа к операционному полю над сводом черепа сбривали шерсть и разрезали кожу по средней линии головы, потом разрезали соединительные ткани черепа и надкостницу и отслаивали их от черепа при помощи шпателя. При помощи трепана диаметром 8 мм и стоматологического привода при скорости вращения 1000 оборотов в минуту с непрерывным смачиванием физиологическим раствором (0,9% NaCl), производили насечку на теменных костях почти на толщину кости (до прозрачности). Выпиленный костный фрагмент удаляли при помощи элеватора, тем самым формируя дефект необходимого диаметра. Получившуюся дефектную область промывали физиологическим раствором и удаляли мелкие костные остатки по краям. В группе отрицательного контроля дефектную область оставляли незаполненной, в группе положительного контроля – заполняли удаленными костями свода черепа (реимплантация), в третьей группе – препаратом-компаратором (Geistlich Bio-Oss®), в четвертой – гетерологическим ДКМ (надкостницу сшивали рассасывающейся нитью Monocryl (Ethicon)).

Кожу сшивали рассасывающейся нитью Т-сорб (Политехмед, Россия). После операционного вмешательства крысам вводили 10 мл/кг физиологического раствора подкожно каждые 1–1,5 часа и согревали при помощи электрогрелки до пробуждения. В первые двое суток после операции животным внутрибрюшинно вводили 10 мг/кг нефопама и 50 мг/кг ко-тримоксазола 2 раза в день.

Через 1 и 3 месяца после искусственного создания дефекта по 3 крысы из каждой группы производили вывод крыс из эксперимента путем их помещения в герметичную камеру с атмосферой, перенасыщенной углекислым газом (CO₂). При помощи стоматологического бора эксплантировали кости свода черепа, содержащие область дефекта и окружающую неповрежденную ткань, и фиксировали их в забуференном фосфатом 4% растворе формалина (pH 7,2-7,6) на протяжении 48 часов. Хранение полученных биоптатов производили в 1% водном растворе формалина при 2–8°C.

Микротомографический и гистологический анализ эксплантированной костной ткани

Определение трехмерной структуры и минеральной плотности кости проводили при помощи микрокомпьютерной томографии (SkyScan 1172, Bruker) при разрешении ≈ 8 мкм в вокселе. Томографирование исследуемых образцов проводили одновременно с калибровочными образцами диаметром 8 мм и минеральной плотностью гидроксиапатита 0,25 и 0,75 г/см³. В ходе томографического исследования костной ткани образцы поддерживали в увлажненном состоянии. Для анализа микрокомпьютерных томограмм использовали программное обеспечение CTAn (Bruker), рассчитывая минеральную плотность новообразованной костной ткани, а также количественные характеристики ее трехмерной структуры (объем новообразованной костной ткани, толщину новообразованных костных элементов и распределение их диаметра). По завершении исследования образцы переносили обратно в раствор формалина до морфологического исследования структур костной и прилежащих мягких тканей.

Для гистологического исследования образцы декальцинировали до полного размягчения в электролитном растворе (ЭргоПродакшн, Россия) в течение 96 часов при комнатной температуре (22–25°C). Далее биоптаты подвергали дегидратации в семи сменах 99,7% изопрепа (БиоВитрум, Россия) по 5 часов в каждой смене. Пропитывали в двух сменах парафиновой среды Histomix (БиоВитрум, Россия), по два часа в каждой смене и заключали в парафин. Готовые парафиновые блоки подготавливали для резки на микротоме, для чего блок размечали так, чтобы можно было взять параллельные ступенчатые срезы из следующих областей: два – по касательным линиям, проведенным через точки на противоположных краях дефекта, один – через центр, пересекая дефект по его диаметру, и еще два – посередине между центральным и описанными краевыми срезами. Депарафинизированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином (БиоВитрум, Россия) по стандартному протоколу. Морфологическое исследование выполняли при помощи светового микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Фото съемку срезов осуществляли при помощи камеры AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss) с программным обеспечением AxioVision 3.0 (Carl Zeiss).

Статистический анализ

Экспериментальные данные подвергались статистическому анализу в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Данные

представляли в виде среднего и стандартного отклонения от среднего. Анализ временных рядов осуществляли посредством двухфакторного дисперсионного анализа (факторы «группа» и «время»). Межгрупповые различия оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа, попарные сравнения групп проводили с использованием критерия Тьюки для исключения систематической ошибки множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p < 0,05$.

Результаты

Результаты апробации экспериментальной модели (безопасность и эффективность)

Состояние животных после операции оценивалось по объективным (масса тела) и субъективным (внешний осмотр) данным. Масса тела крыс в пилотном эксперименте уменьшалась в течение первых 2 суток после операции, на протяжении последующих 5 дней масса оставалась неизменной. Помимо травмы, вызванной оперативным вмешательством, снижение массы тела также было вызвано использованием антибиотиков. Макроскопически состояние животных нормализовалось спустя 4–5 дней после операции.

Через 7 дней после операции осмотр области с искусственно созданным дефектом показал высокую скорость регенерации кожных покровов (разрез кожи в значительной степени или полностью заживлен) и отсутствие видимых признаков воспалительных процессов. У животных из группы положительного контроля наблюдали отсутствие смещения реимпланти-

рованного аутооттрансплантата в области дефекта благодаря новообразованной соединительной ткани.

В основном эксперименте отсутствовала отрицательная динамика массы тела животных на протяжении всей 1-й недели после операции независимо от экспериментальной группы. Кроме того, масса тела животных всех экспериментальных групп увеличивалась на протяжении всего эксперимента (12 недель).

Влияние ДКМ на репарацию костного дефекта

Для оценки восстановительного процесса при искусственно созданном критическом дефекте черепа использовали анализ объема новообразованной костной ткани в просвете дефекта с помощью метода микрокомпьютерной томографии (микроКТ, **рисунок 1**). У группы с изначальным отсутствием костной ткани в просвете дефекта репарации практически не наблюдали, тогда как у группы с реимплантированным аутооттрансплантатом ожидаемо наблюдали наибольший объем костной ткани (**рисунок 2А**). В группе особей основного эксперимента, где дефект замещали препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ, объем костной ткани был статистически значимо больше по сравнению с особями отрицательного контроля. Помимо этого наблюдали отсутствие ярко выраженной динамики увеличения объема костной ткани к 12-й неделе после операции в сравнении с 4-й неделей (**рисунок 2А**). Значимых статистических различий между ДКМ и препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® не наблюдали (**рисунок 2А**).

Рисунок 1.

Репрезентативные микрокомпьютерные томограммы новообразованной костной ткани в просвете созданного дефекта при отсутствии заполнения дефекта (отрицательный контроль) либо замещении дефекта удаленными участками темных костей (костный аутооттрансплантат, положительный контроль), препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ. А) 4 недели после операции; Б) 12 недель после операции

Figure 1.

Representative microcomputed tomography images of critical-sized rat calvarial bone defect repair in unfilled defects (negative control), defects filled with calvarial bone autograft (positive control), Geistlich Bio-Oss® or heterologous DBM. A. 4 weeks post-operation. B. 12 weeks post-operation

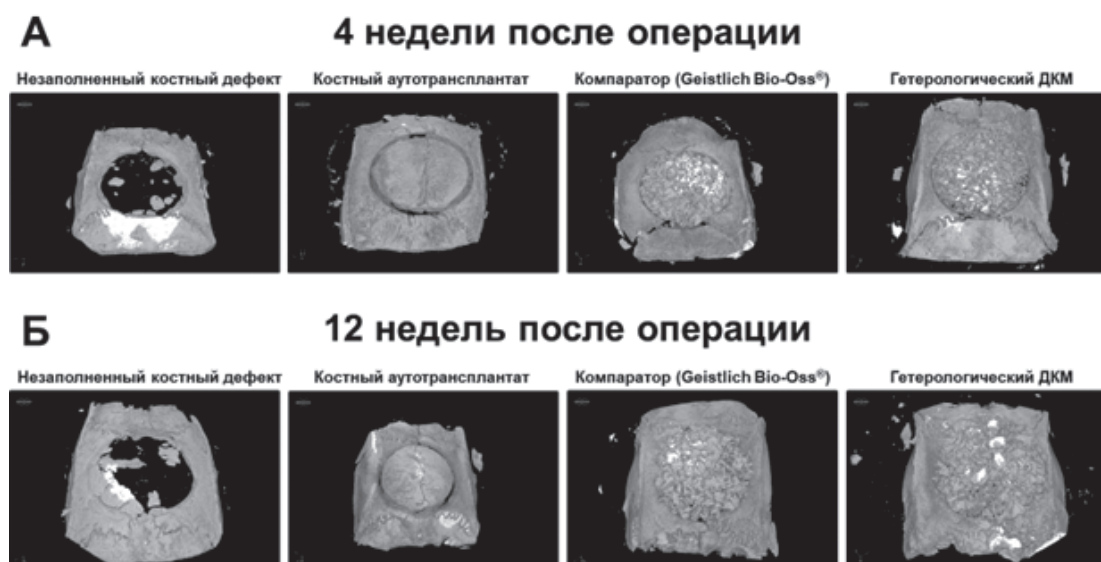
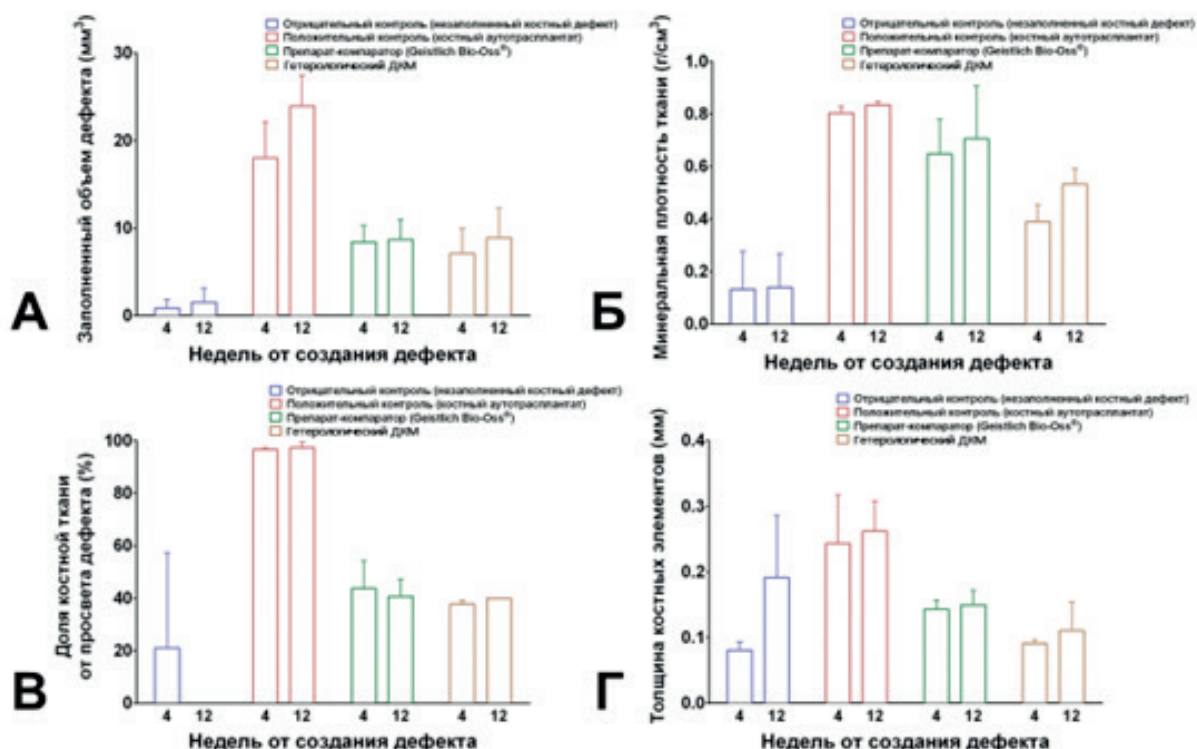


Рисунок 2.

Сравнение показателей новообразованной костной ткани при отсутствии заполнения созданного дефекта (отрицательный контроль), а также при замещении критического дефекта костей свода черепа крыс удаленными участками теменных костей (положительный контроль), препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ. А) оценка заполненного новообразованной костной тканью объема дефекта методом микрокомпьютерной томографии; Б) оценка минеральной плотности новообразованной ткани методом микрокомпьютерной томографии; В) оценка доли костной (минерализованной) ткани от просвета созданного дефекта при окрашивании гематоксилином и эозином; Г) оценка толщины новообразованных костных элементов методом микрокомпьютерной томографии.

Figure 2.

Comparison of bone repair in unfilled critical-sized rat calvarial bone defects (negative control) or defects filled with calvarial bone autograft (positive control), Geistlich Bio-Oss® (xenogeneic refined and γ -sterilised bone mineral) or heterologous DBM (bovine purified acellular bone collagen membranes sterilised by supercritical fluid extraction). A. Microcomputed tomography volumetric analysis. B. Microcomputed tomography-based densitometry. C. Hematoxylin and eosin evaluation of repair efficiency. D. Microcomputed tomography analysis of bone element thickness.



При помощи микроКТ оценивали плотность тканей, по результатам чего делали выводы об общей минерализации новообразованных тканей в месте искусственно созданных дефектов. В группе крыс отрицательного контроля не наблюдали минерализованной ткани ни через 4, ни через 12 недель после оперативного вмешательства, тогда как в группе положительного контроля минеральная плотность в области дефекта была максимальной независимо от времени наблюдения (рисунок 2Б). При заполнении дефекта гетерологическим ДКМ и препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® минеральная плотность ткани была ближе к показателям минерализации положительного, а не отрицательного контроля (рисунок 2Б).

На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином (рисунок 3), оценивали выраженность остеогенеза и рассчитывали долю минерализованной ткани от площади дефекта. Так, у группы крыс отрицательного контроля минерализованная ткань в просвете дефекта почти отсутствовала, тогда как у группы крыс положительного контроля заполняла почти весь дефект (рисунок 2В). У групп крыс из основного эксперимента процент минерализованной ткани в просвете дефекта составлял от 40 до 50% и не имел различий между группами на разных стадиях послеоперационного периода (рисунок 2В).

Для дополнительной оценки регенеративных процессов в костной ткани также выполняли микроКТ-измерение толщины новообразованных костных элементов. У группы крыс отрицательного контроля толщина костных балок через 4 недели после операции была наименьшей, тогда как к 12-й неделе достигала показателей группы крыс с реимплантированными костями свода черепа (рисунок 2Г). При замещении костного дефекта препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ значения толщины костных балок находились между группами отрицательного и положительного контроля и незначительно увеличивались со временем (рисунок 2Г).

Наконец был произведен анализ распределения костных элементов по их диаметру. У крыс из группы отрицательного контроля через 4 недели наблюдали только мелкие (до 200 мкм) костные элементы, через 12 недель после оперативного вмешательства – равномерное распределение костных элементов с диаметром до 500 мкм (рисунок 4). В группе крыс положительного контроля на обоих временных точках визуализировали равномерно распределенные костные элементы диаметром до 600 мкм (рисунок 4). У групп крыс, которым был имплантирован препарат-компаратор Geistlich Bio-Oss® или гетерологический ДКМ, дефект

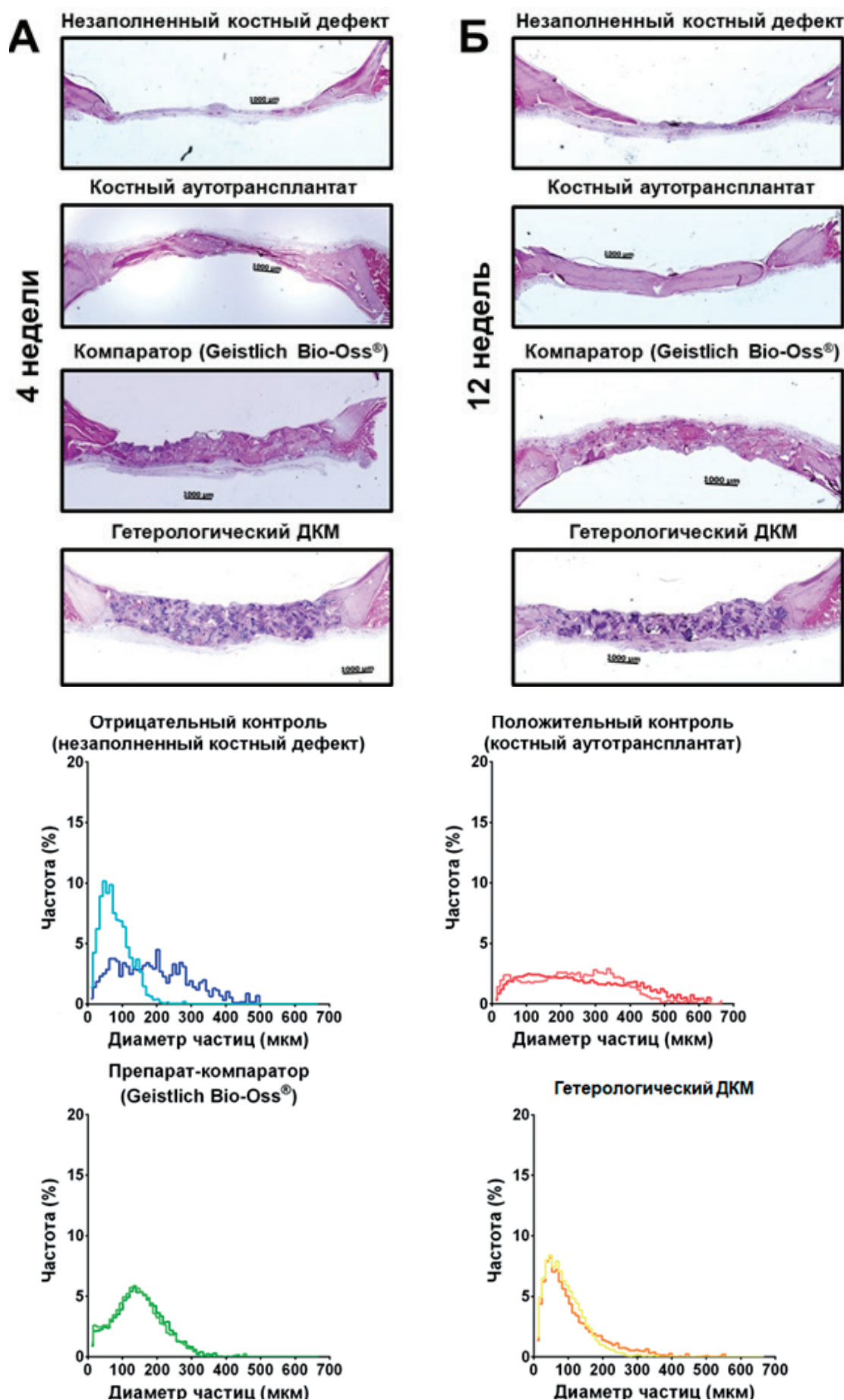


Рисунок 3.

Репрезентативные гистологические снимки (окрашивание гематоксилином и эозином) новообразованной костной ткани в просвете созданного дефекта при отсутствии заполнения дефекта (отрицательный контроль) либо замещении дефекта удаленными участками теменных костей (костный аутографт, положительный контроль), препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ. А) 4 недели после операции; Б) 12 недель после операции.

Figure 3.

Representative histological images (hematoxylin and eosin staining) of critical-sized rat calvarial bone defect repair in unfilled defects (negative control), defects filled with calvarial bone autograft (positive control), Geistlich Bio-Oss® or heterologous DBM. A. 4 weeks post-operation. B. 12 weeks post-operation.

Рисунок 4.

Распределение диаметра новообразованных костных элементов в просвете созданного дефекта, оцененное методом микрокомпьютерной томографии. А) незаполненный костный дефект (отрицательный контроль); Б) костный аутографт, (положительный контроль); В) препарат-компаратор Geistlich Bio-Oss®; Г) гетерологический ДКМ.

Figure 3.

Distribution of bone elements diameter in the repaired bone tissue as assessed by microcomputed tomography. A. Unfilled defects (negative control). B. Defects filled with calvarial bone autograft (positive control). C. Geistlich Bio-Oss®. D. Heterologous DBM.

характеризовался нормальным распределением костных элементов диаметром до 350 мкм независимо от временной точки (4 или 12 недель) (**рисунок 4**). Также было выявлено, что при заполнении дефекта препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® пик диаметра костных элементов приходился на 150 мкм, а при заполнении дефекта гетерологическим ДКМ – на 75 мкм (**рисунок 4**).

Обсуждение

Травмы продолжают оставаться причиной многочисленных случаев инвалидизации и смертности населения трудоспособного возраста во всем мире. Исследование Global Burden of Disease показало, что в течение года за медицинской помощью по поводу различных травм обращаются около 1 млрд человек, из этих случаев фиксируется около 5 млн летальных исходов [3]. Из всех случаев травм около 4 млн требует оперативных вмешательств с замещением костного дефекта [31], более трети из них проводится в США [32]. Таким образом, растет спрос на коммерчески доступные и готовые к использованию имплантаты для замещения дефектов костных тканей [31, 32].

Для адекватного ответа на данный вызов нашей группой была разработана оригинальная методика получения гетерологического ДКМ, которая заключается в последовательном очищении и дезинфекции костной ткани, удалении клеток, липидов, нуклеиновых кислот и гидроксиапатита и дальнейшем фракционировании для получения гранул с их стерилизацией этиленоксидом. На базе данной оригинальной методики был получен бесклеточный гетерологический ДКМ высокой степени очистки с сохраненной волокнисто-пористой структурой, сырьем для которого являются бычьи бедренные кости. Данное медицинское изделие может применяться в травматологии,

ортопедии и стоматологии для замещения костных дефектов.

Полученные результаты продемонстрировали высокую эффективность регенеративных процессов костной ткани при замещении критического дефекта костей свода черепа крыс (8 мм) гетерологическим ДКМ. Объем новообразованной костной ткани в просвете дефекта и доля костной ткани от просвета дефекта оказались сопоставимы с препаратом Geistlich Bio-Oss®, широко применяемым в клинической практике для замещения костной ткани. Наилучшие показатели регенерации костной ткани наблюдали при реимплантации костей свода черепа в просвет дефекта. Таким образом, можно говорить о сохранности остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств.

Результаты настоящего эксперимента соответствуют предшествующим исследованиям, свидетельствующими о более высокой эффективности ДКМ при замещении дефекта позвоночника кроликов в сравнении с нативным коралловым гидроксиапатитом и сходную эффективность с участком подвздошного гребня (аутотрансплантат) [25]. Бычий ДКМ также продемонстрировал высокую способность к регенерации костной ткани, а также отсутствие иммуногенности при замещении дефектных областей лучевой кости крыс [26] и бедренной кости собак [27]. Помимо этого, аналогичные результаты были получены и при замещении ягнячьим ДКМ дефектов большеберцовой кости у собак [27].

Заключение

Гетерологический ДКМ, получаемый из бычьих бедренных костей по оригинальной запатентованной технологии и стерилизованный этиленоксидом, имеет сопоставимую результативность с присутствующим на рынке коммерческим ксеногенным костным гранулированным минералом Geistlich Bio-Oss®.

Литература / References:

1. Recent Advances in Orthopedics-2. Courtney, P Maxwell [Ed]. Jaypee Brothers Medical Publishers. – 2018. – 220 p.
2. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211-1259. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2.
3. Haagsma JA, Graetz N, Bolliger I, Naghavi M, Higashi H, Mullany EC, Abera SF, Abraham JP, Adofo K, Alsharif U, Ameh EA, Ammar W, Antonio CA, Barrero LH, Bekele T, Bose D, Brazinova A, Catalá-López F, Dandona L, Dandona R, Dargan PI, De Leo D, Degenhardt L, Derrett S, Dharmaratne SD, Driscoll TR, Duan L, Petrovich Ermakov S, Farzadfar F, Feigin VL, Franklin RC, Gabbe B, Gosselin RA, Hafezi-Nejad N, Hamadeh RR, Hajar M, Hu G, Jayaraman SP, Jiang G, Khader YS, Khan EA, Krishnaswami S, Kulkarni C, Lecky FE, Leung R, Lunevicius R, Lyons RA, Majdan M, Mason-Jones AJ, Matzopoulos R, Meaney PA, Mekonnen W, Miller TR, Mock CN, Norman RE, Orozco R, Polinder S, Pourmalek F, Rahimi-Movaghar V, Refaat A, Rojas-Rueda D, Roy N, Schwebel DC, Shaheen A, Shahrz S, Skirbekk V, Sørreide K, Soshnikov S, Stein DJ, Sykes BL,

- Tabb KM, Temesgen AM, Tenkorang EY, Theadom AM, Tran BX, Vasankari TJ, Vavilala MS, Vlassov VV, Woldeyohannes SM, Yip P, Yonemoto N, Younis MZ, Yu C, Murray CJ, Vos T. The global burden of injury: incidence, mortality, disability-adjusted life years and time trends from the Global Burden of Disease study 2013. *Inj Prev*. 2016;22(1):3-18. doi: 10.1136/injprev-2015-041616.
4. Global Burden of Disease Child and Adolescent Health Collaboration, Kassebaum N, Kyu HH, Zoeckler L, Olsen HE, Thomas K, Pinho C, Bhutta ZA, Dandona L, Ferrari A, Ghiwot TT, Hay SI, Kinfu Y, Liang X, Lopez A, Malta DC, Mokdad AH, Naghavi M, Patton GC, Salomon J, Sartorius B, Topor-Madry R, Vollset SE, Werdecker A, Whiteford HA, Abate KH, Abbas K, Damtew SA, Ahmed MB, Akseer N, Al-Raddadi R, Alemayohu MA, Altirkawi K, Abajobir AA, Amare AT, Antonio CAT, Arnlov J, Artaman A, Asayesh H, Avokpaho EFGA, Awasthi A, Ayala Quintanilla BP, Bacha U, Betsu BD, Barac A, Bärnighausen TW, Baye E, Bedi N, Bensenor IM, Berhane A, Bernabe E, Bernal OA, Beyene AS, Biadgilign S, Bikbov B, Boyce CA, Brazinova A, Hailu GB, Carter A, Castañeda-Orjuela CA, Catalá-López F, Charlson FJ, Chittheer AA, Choi JJ, Ciobanu LG, Crump J, Dandona R, Dellavalle RP, Deribew A, deVeber G, Dicker D, Ding EL, Dubey M, Endries AY, Erskine HE, Faraon EJA, Faro A, Farzadfar F, Fernandes JC, Fijabi DO, Fitzmaurice C, Fleming TD, Flor LS, Foreman KJ, Franklin RC, Fraser MS, Frostad JJ, Fullman N, Gebregergs GB, Gebru AA, Geleijnse JM, Gibney KB, Gidey Yihdego M, Ginawi IAM, Gishu MD, Gizachew TA, Glaser E, Gold AL, Goldberg E, Gona P, Goto A, Gughani HC, Jiang G, Gupta R, Tesfay FH, Hankey GJ, Havmoeller R, Hijar M, Horino M, Hosgood HD, Hu G, Jacobsen KH, Jakovljevic MB, Jayaraman SP, Jha V, Jibat T, Johnson CO, Jonas J, Kasaeian A, Kawakami N, Keiyoro PN, Khalil I, Khang YH, Khubchandani J, Ahmad Kiadaliri AA, Kieling C, Kim D, Kissoon N, Knibbs LD, Koyanagi A, Krohn KJ, Kuate Defo B, Kucuk Bicer B, Kulikoff R, Kumar GA, Lal DK, Lam HY, Larson HJ, Larsson A, Laryea DO, Leung J, Lim SS, Lo LT, Lo WD, Looker KJ, Lotufo PA, Magdy Abd El Razek H, Malekzadeh R, Markos Shifti D, Mazidi M, Meaney PA, Meles KG, Memiah P, Mendoza W, Abera Mengistie M, Mengistu GW, Mensah GA, Miller TR, Mock C, Mohammadi A, Mohammed S, Monasta L, Mueller U, Nagata C, Naheed A, Nguyen G, Nguyen QTL, Nsoesie E, Oh IH, Okoro A, Olusanya JO, Olusanya BO, Ortiz A, Paudel D, Pereira DM, Perico N, Petzold M, Phillips MR, Polanczyk GV, Pourmalek F, Qorbani M, Rafay A, Rahimi-Movaghar V, Rahman M, Rai RK, Ram U, Rankin Z, Remuzzi G, Renzaho AMN, Roba HS, Rojas-Rueda D, Ronfani L, Sagar R, Sanabria JR, Kedir Mohammed MS, Santos JS, Satpathy M, Sawhney M, Schöttker B, Schwebel DC, Scott JG, Sepanlou SG, Shaheen A, Shaikh MA, She J, Shiri R, Shieue I, Sigfusdottir ID, Singh J, Silpakit N, Smith A, Sreeramreddy C, Stanaway JD, Stein DJ, Steiner C, Sufiyan MB, Swaminathan S, Tabarés-Seisdedos R, Tabb KM, Tadese F, Tavakkoli M, Taye B, Teeple S, Tegegne TK, Temam Shifa G, Terkawi AS, Thomas B, Thomson AJ, Tobe-Gai R, Tonelli M, Tran BX, Troeger C, Ukwaja KN, Uthman O, Vasankari T, Venketasubramanian N, Vlassov VV, Weiderpass E, Weintraub R, Gebrehiwot SW, Westernman R, Williams HC, Wolfe CDA, Woodbrook R, Yano Y, Yonemoto N, Yoon SJ, Younis MZ, Yu C, Zaki MES, Zegeye EA, Zuhlke LJ, Murray CJL, Vos T. Child and Adolescent Health From 1990 to 2015: Findings From the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors 2015 Study. *JAMA Pediatr*. 2017;171(6):573-592. doi: 10.1001/jamapediatrics.2017.0250.
 5. Mokdad AH, Forouzanfar MH, Daoud F, Mokdad AA, El Bcheraoui C, Moradi-Lakeh M, Kyu HH, Barber RM, Wagner J, Cercy K, Kravitz H, Coggeshall M, Chew A, O'Rourke KF, Steiner C, Tuffaha M, Charara R, Al-Ghamdi EA, Adi Y, Afifi RA, Alahmadi H, AlBuhairan F, Allen N, AlMazroa M, Al-Nehmi AA, AlRayess Z, Arora M, Azzopardi P, Barroso C, Basulaiman M, Bhutta ZA, Bonell C, Breinbauer C, Degenhardt L, Denno D, Fang J, Fatusi A, Feigl AB, Kakuma R, Karam N, Kennedy E, Khoja TA, Maalouf F, Obermeyer CM, Mattoo A, McGovern T, Memish ZA, Mensah GA, Patel V, Petroni S, Reavley N, Zertuche DR, Saeedi M, Santelli J, Sawyer SM, Ssewamala F, Taiwo K, Tantawy M, Viner RM, Waldfogel J, Zúñiga MP, Naghavi M, Wang H, Vos T, Lopez AD, Al Rabeeah AA, Patton GC, Murray CJ. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016;387(10036):2383-401. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00648-6.
 6. Hasan A, Byambaa B, Morshed M, Cheikh MI, Shakoore RA, Mustafy T, Marei H. Advances in osteobiologic materials for bone substitutes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Apr 27. doi: 10.1002/term.2677. [Epub ahead of print]
 7. Pearlin, Nayak S, Manivasagam G, Sen D. Progress of Regenerative Therapy in Orthopedics. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(2):169-181. doi: 10.1007/s11914-018-0428-x.
 8. Smith WR, Hudson PW, Ponce BA, Rajaram Manoharan SR. Nanotechnology in orthopedics: a clinically oriented review. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018;19(1):67. doi: 10.1186/s12891-018-1990-1.
 9. Azi ML, Aprato A, Santi I, Kfuri M Jr, Masse A, Joeris A. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17(1):465. doi: 10.1186/s12891-016-1312-4.
 10. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J*. 2016;98-B(1 Suppl A):6-9. doi: 10.1302/0301-620X.98B.36350.
 11. Bhatt RA, Rozental TD. Bone graft substitutes. *Hand Clin*. 2012;28(4):457-68. doi: 10.1016/j.hcl.2012.08.001.
 12. Mansour A, Mezour MA, Badran Z, Tamimi F. Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(23-24):1436-1451. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0026.
 13. Wang F, Li Q, Wang Z. A comparative study of the effect of Bio-Oss® in combination with concentrated growth factors or bone marrow-derived mesenchymal stem cells in canine sinus grafting. *J Oral Pathol Med*. 2017;46(7):528-536. doi: 10.1111/jop.12507.
 14. Khojasteh A, Fahimipour F, Jafarian M, Sharifi D, Jahangir S, Khayyat F, Baghaban Eslaminejad M. Bone engineering in dog mandible: Coculturing mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in a composite scaffold containing vascular endothelial growth factor. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(7):1767-1777. doi: 10.1002/jbm.b.33707.
 15. Nakano K, Murata K, Omokawa S, Akahane M, Shimizu T, Kawamura K, Kawate K, Tanaka Y. Promotion of Osteogenesis and Angiogenesis in Vascularized Tissue-Engineered Bone Using Osteogenic Matrix Cell Sheets. *Plast Reconstr Surg*. 2016;137(5):1476-84. doi: 10.1097/PRS.0000000000002079.
 16. Oliveira HL, Da Rosa WLO, Cuevas-Suárez CE, Carreño NLV, da Silva AF, Guim TN, Dellagostin OA, Piva E. Histological Evaluation of Bone Repair with Hydroxyapatite: A Systematic Review. *Calcif Tissue Int*. 2017;101(4):341-354. doi: 10.1007/s00223-017-0294-z.
 17. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep*. 2013;2:447. doi: 10.1038/bonekey.2013.181.
 18. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9. doi: 10.2215/CJN.04151206.
 19. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1063-77. doi: 10.1016/j.addr.2012.06.008.
 20. Holt DJ, Grainger DW. Demineralized bone matrix as a vehicle for

- delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1123-8. doi: 10.1016/j.addr.2012.04.002.
21. Lewis CS, Supronowicz PR, Zhukauskas RM, Gill E, Cobb RR. Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank.* 2012;13(1):119-27. doi: 10.1007/s10561-010-9236-y.
 22. Chen L, He Z, Chen B, Yang M, Zhao Y, Sun W, Xiao Z, Zhang J, Dai J. Loading of VEGF to the heparin cross-linked demineralized bone matrix improves vascularization of the scaffold. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(1):309-17. doi: 10.1007/s10856-009-3827-9.
 23. Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W, Dai J. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007;28(6):1027-35.
 24. Reza Sanaei M, Abu J, Nazari M, AB MZ, Allaudin ZN. Qualitative and quantitative evaluation of avian demineralized bone matrix in heterotopic beds. *Vet Surg.* 2013;42(8):963-70. doi: 10.1111/j.1532-950X.2013.12057.x.
 25. Dodds RA, York-Ely AM, Zhukauskas R, Arola T, Howell J, Hartill C, Cobb RR, Fox C. Biomechanical and radiographic comparison of demineralized bone matrix, and a coralline hydroxyapatite in a rabbit spinal fusion model. *J Biomater Appl.* 2010;25(3):195-215. doi: 10.1177/0885328209345552.
 26. Alidadi S, Oryan A, Bigham-Sadeh A, Moshiri A. Comparative study on the healing potential of chitosan, polymethylmethacrylate, and demineralized bone matrix in radial bone defects of rat. *Carbohydr Polym.* 2017;166:236-248. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.02.087.
 27. Bigham-Sadeh A, Karimi I, Alebouye M, Shafie-Sarvestani Z, Oryan A. Evaluation of bone healing in canine tibial defects filled with cortical autograft, commercial-DBM, calf fetal DBM, omentum and omentum-calf fetal DBM. *J Vet Sci.* 2013;14(3):337-43. doi: 10.4142/jvs.2013.14.3.337.
 28. Zhang Y, Wang J, Ma Y, Niu X, Liu J, Gao L, Zhai X, Chu K, Han B, Yang L, Wang J. Preparation and biocompatibility of demineralized bone matrix/sodium alginate putty. *Cell Tissue Bank.* 2017;18(2):205-216. doi: 10.1007/s10561-017-9627-4.
 29. Tian M, Yang Z, Kuwahara K, Nimni ME, Wan C, Han B. Delivery of demineralized bone matrix powder using a thermogelling chitosan carrier. *Acta Biomater.* 2012;8(2):753-62. doi: 10.1016/j.actbio.2011.10.030.
 30. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012;7(10):1918-29. doi: 10.1038/nprot.2012.113.
 31. Brydone AS, Meek D, MacLaine S. Bone grafting, orthopaedic bio materials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010;224(12):1329-43. doi: 10.1243/09544119JEIM770.
 32. O'Keefe RJ, Mao J. Bone tissue engineering and regeneration : from discovery to the clinic--an overview. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011;17(6):389-92. doi: 10.1089/ten.TEB.2011.0475.

Сведения об авторах

Веремеев Алексей Владимирович, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Матрифлекс» (125252, Россия, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12, корп. А, п. 1, эт. 2, оф. 1).

Вклад в статью: планирование и проведение экспериментов, анализ полученных данных, написание статьи.

ORCID: 0000-0001-9946-1015

Болгарин Роман Николаевич, директор по развитию ООО «Матрифлекс» (125252, Россия, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12, корп. А, п. 1, эт. 2, оф. 1).

Вклад в статью: планирование и проведение экспериментов, анализ полученных данных.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Нестеренко Владимир Георгиевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия (123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18).

Вклад в статью: планирование экспериментов, редактирование статьи, подготовка иллюстративного материала.

ORCID: 0000-0001-5623-2466

Андреев-Андреевский Александр Александрович, кандидат биологических наук, руководитель центра доклинических исследований ООО «НИИ митоинженерии МГУ» ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (119330, Россия, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 73А).

Вклад в статью: проведение экспериментов.

ORCID: 0000-0002-1173-8153

Authors

Dr. Alexey V. Veremeev, MD, PhD, Chief Executive Officer, Matriflex LLC (125252, Aviakonstruktora Mikoyana Street, 12, A, 2nd Floor, Office 1, Moscow, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; performed the data analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-9946-1015

Mr. Roman N. Bolgarin, Development Director, Matriflex LLC (125252, Aviakonstruktora Mikoyana Street, 12, A, 2nd Floor, Office 1, Moscow, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; performed the data analysis.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Prof. Vladimir G. Nesterenko, MD, DSc, Professor, Head of the Immunology Department, Gamaleya National Research Epidemiology and Microbiology Centre (123098, Gamaleya Street, 18, Moscow, Russian Federation).

Contribution: designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-5623-2466

Dr. Alexander A. Andreev-Andrievskiy, PhD, Head of the Center for Preclinical Trials, Mitoengineering Research Institute LLC, Moscow State University (119330, Leninskie Gory Street, 73A, Moscow, Russian Federation).

Contribution: performed the experiments.

ORCID: 0000-0002-1173-8153

Статья поступила: 10.08.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 10.08.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-35-41>

ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОГО И МИОГЕННОГО МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ СЕРОТОНИНА В ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДАХ БРЫЖЕЙКИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ

ЕГОРОВА А.А.^{1*}, АВРАМЕНКО Е.А.²

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», г. Санкт-Петербург, Россия

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Цель. Сравнение реакций на серотонин (5-НТ) в интактных лимфангионах, сосудах в условиях острого перитонита и сосудах с удаленным эндотелием для выяснения причин изменения эффекта серотонина при каловом перитоните. Кишечный лимфатический ствол (truncus lymphaticus) в качестве объекта исследования был выбран как магистральный лимфатический сосуд абдоминального региона, который выполняет транспортную и коллекторную функции.

Материал и методы. Эксперименты выполняли на лимфангионах кишечного ствола лабораторных крыс в изометрических условиях в рабочей камере Pressure Myograph System 110P. Исследовали изменения частоты и амплитуды фазной активности в лимфатическом сосуде, а также тонические реакции под действием серотонина в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-4} М. Перитонит вызывали пункционным введением каловой смеси в брюшную полость. Сравнивали эффекты серотонина в интактных сосудах, в лимфангионах с удаленным эндотелием и при перитоните.

Результаты. При перитоните получено снижение частоты и амплитуды фазной активности по отношению к интактным лимфангионам. Серотонин увеличивал амплитуду фазных сокращений только в низких концентрациях

(10^{-8} М). Статистически значимых изменений тонических реакций под действием серотонина не наблюдалось. В лимфангионах без эндотелия серотонин угнетал фазную активность. Учитывая, что стимуляция моторики серотонином в интактных сосудах осуществляется через 5-НТ₂ рецепторы и α_2 -адренорецепторы на эндотелиоцитах и связана с изменением синтеза NO и простагландинов этими клетками, при перитоните происходит снижение чувствительности указанных типов рецепторов, а также изменение процессов синтеза NO и простагландинов.

Заключение. Исследования в условиях экспериментального перитонита позволили установить, что патологические изменения в лимфатических сосудах при перитоните схожи с таковыми в кровеносных сосудах: в эндотелиоцитах лимфангионов происходит угнетение синтеза и выделения NO и простагландинов. Дисфункция эндотелия при перитоните является причиной изменения эффекта серотонина.

Ключевые слова: лимфатические сосуды, серотонин, перитонит, эндотелий, оксид азота, простагландины.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

Собственные средства.

Для цитирования:

Егорова А.А., Авраменко Е.А. Изменения эндотелийзависимого и миогенного механизмов действия серотонина в лимфатических сосудах брыжейки крыс при экспериментальном перитоните. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3): 35-41. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-35-41>

*Корреспонденцию адресовать:

Егорова Александра Алексеевна, 195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, д. 47, корп. 9, E-mail: itilia@mail.ru.
© Егорова А.А. и др.

ORIGINAL RESEARCH

EXPERIMENTAL FAECAL PERITONITIS ALTERS RESPONSE TO 5-HYDROXYTRYPTAMINE IN MESENTERIC LYMPHATIC VESSELS

ALEXANDRA A. EGOROVA¹ **, EKATERINA A. AVRAMENKO²¹*Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*²*St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation*

English ►

Abstract

Aim. To compare the reactions to 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) in the mesenteric lymphangions upon endothelial denudation and during experimental faecal peritonitis as compared with the control lymphangions.

Materials and Methods. Experiments were performed on the intestinal lymph trunk lymphangions of rats using a pressure myograph system. We examined the changes in contraction frequency and amplitude as well as tonic reactions upon the addition of 5-HT (10^{-8} - 10^{-4} M). Experimental peritonitis was caused by an intraperitoneal injection of feces.

Results. Faecal peritonitis reduced contraction frequency and amplitude in mesenteric lymphangions. 5-HT increased contraction amplitude only at low concentration (10^{-8} M) and did not alter the

tonic reactions. Upon endothelial denudation, serotonin inhibited contraction frequency and amplitude in the lymphangions. As 5-HT stimulates motility through 5-HT₂ receptors and α_2 -adrenoceptors on endothelial cells, faecal peritonitis abates the sensitivity of such receptors to 5-HT.

Conclusion. In experimental faecal peritonitis, alterations in lymphatic vessels are reminiscent of those in blood vessels: Endothelial dysfunction disturbs the response of lymphatic vessels to 5-HT.

Keywords: lymphatic vessels, 5-hydroxytryptamine, serotonin, peritonitis, endothelium, nitric oxide, prostaglandins.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

There was no funding for this project.

For citation:

Alexandra A. Egorova, Ekaterina A. Avramenko. Experimental faecal peritonitis alters response to 5-hydroxytryptamine in mesenteric lymphatic vessels. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020;5(3): 35-41. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-35-41>

****Corresponding author:**

Alexandra A. Egorova, 47/9, Piskarevskiy Prospekt, St. Petersburg, Russian Federation, 195067, e-mail: itilia@mail.ru.
© Alexandra A. Egorova et al.

Введение

При перитоните в результате воспалительного процесса в брюшной полости, сопровождающегося транслокацией бактерий и токсинов из кишечника, формируется комплекс гемодинамических, метаболических и иммунных нарушений [1]. Наиболее быстро в патологический процесс при перитоните вовлекается сосудистая сеть: в ответ на действие флоггенных факторов происходит рефлекторное сокращение мелких артерий и артериол, сменяющееся их расширением. Развивается воспалительная гиперемия и увеличивается экссудация, что приводит к расширению лимфатических сосудов [2]. Сосудистые реакции при перитоните инициируются, прежде всего, биогенными аминами – гиста-

мином и серотонином. Содержание последнего в экссудате возрастает в результате агрегации и дегрануляции тромбоцитов. Дальнейшее прогрессирование процесса приводит к снижению концентрации 5-HT (серотонина) в биологических средах. Таким образом, при перитоните одним из первых механизмов нарушения лимфооттока может быть снижение содержания одного из стимуляторов моторики в лимфангионах – серотонина, в дальнейшем первоначальные функциональные реакции дополняются морфологическими изменениями стенки сосуда, которые приводят к снижению транспорта лимфы и усилению интоксикации.

Наиболее часто рассматриваемой причиной сосудистых нарушений при патологических

процессах является дисфункция эндотелия [3]. В кровеносных сосудах она приводит к увеличению максимального времени вазодилатации в результате снижения чувствительности микрососудистых рецепторов и уменьшения выделения эндогенных вазодилататоров эндотелиоцитами.

Эндотелий в лимфатических сосудах обладает отличительной морфофункциональной особенностью – он является одним из источников кальция для пейсмекерных клеток, таким образом, дисфункции эндотелия может отражаться на автоматической активности в лимфангионах [4]. Также в экспериментах установлено, что серотонин через 5-HT₂ и 5-HT₃ рецепторы влияет на колебания концентрации Ca²⁺ в пейсмекерных клетках [5].

Учитывая положительный результат применения серотонина адипината в клинической практике для восстановления моторной функции сосудов после перитонита и принимая во внимание значимую роль серотонина в регуляции транспорта лимфы в физиологических условиях, представляется целесообразным выяснить причины изменения реактивности лимфатических сосудов к действию серотонина в условиях перитонита, что позволит более эффективно осуществлять комплекс мероприятий, направленных на снижение интоксикации, восстановление моторики и компенсацию дисфункции эндотелия [2].

Цель исследования

Сравнение реакций на серотонин (5-HT) в интактных лимфангионах, сосудах в условиях острого перитонита и сосудах с удаленным эндотелием для выяснения причин изменения эффекта серотонина при каловом перитоните. Кишечный лимфатический ствол (truncus lymphaticus) в качестве объекта исследования был выбран как магистральный лимфатический сосуд абдоминального региона, который выполняет транспортную и коллекторную функции.

Материалы и методы

Все манипуляции с лабораторными животными выполняли в соответствии с правилами биоэтики (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей, 1998). После эвтаназии животных посредством ингаляции газовой смесью, состоящей из 70% CO₂ и 30%

O₂, фрагменты truncus lymphaticus длиной 5–7 мм извлекали из брюшной полости. Объект помещали между двумя стеклянными канюлями в рабочей камере Pressure Myograph System 110P (Danish Myo Technology), где перфузировали по ходу лимфотока раствором Кребса следующего состава (в mM): NaCl – 118,99; KCl – 4,69; NaHCO₃ – 25,0; MgSO₄·7H₂O – 1,17; KH₂PO₄ – 1,18; CaCl₂·2 H₂O – 2,50; глюкоза – 5,5; EDTA – 0,03, сатурированном газовой смесью из 95% кислорода и 5% углекислого газа. Перфузионное давление на входе и выходе сосуда составляло 6,5 см водного столба. Регистрировали продольное напряжение лимфангионов в изометрических условиях.

Для моделирования перитонита беспородным крысам-самцам массой 200–250 г в брюшную полость пункционным методом вводили 20% каловую взвесь в дозе 1 мл на 100 г массы тела животного (методика моделирования перитонита по В.А. Лазаренко, 2008). Через сутки проводилась эвтаназия и извлечение кишечного лимфатического ствола.

После стабилизации параметров фазной активности и уровня тонического напряжения лимфангионов (30–40 мин) в перфузат добавляли серотонин (Sigma Aldrich, США) в диапазоне концентраций 10⁻⁸–10⁻⁵ М для определения дозозависимости эффекта. Механизм действия 5-HT изучали с точки зрения эндотелийзависимых реакций и миогенных механизмов. Для оценки роли эндотелия в механизме действия 5-HT выполняли его удаление путем пропускания воздушной струи с последующей проверкой эффективности манипуляции по отсутствию реакции на действие ацетилхолина согласно методике, описанной Fox J.L. (2002).

Серотонин применяли в концентрациях 10⁻⁸–10⁻⁵ М (Sigma-Aldrich).

Анализировали динамику параметров работы лимфатических сосудов крыс с суточным перитонитом и сравнивали с фоновыми значениями, с динамикой изменения параметров работы интактных и деэндотелизированных сосудов.

Статистическую обработку материалов проводили с использованием методов описательной и аналитической статистики в программе GraphPad Prism 5.04. За критический уровень значимости принимали p=0,05. Для описания центральной тенденции использовали значение среднего арифметического, в качестве меры рассеяния данных применяли стандартное от-

Таблица 1.

Параметры сократительной активности изолированных лимфангионов под действием серотонина при экспериментальном каловом перитоните по отношению к фоновым данным.

Table 1.

The influence of 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) on contraction frequency and amplitude in mesenteric lymphatic vessels at the intact and peritonitis-affected lymphangions.

Концентрация серотонина, М 5-HT concentration, mol/L	Частота спонтанных сокращений Contraction frequency		Амплитуда спонтанных сокращений Contraction amplitude	
	Интактные ЛС Intact lymphangions (n = 20)	ЛС при перитоните Peritonitis-affected lymphangions (n = 10)	Интактные ЛС Intact lymphangions (n = 20)	ЛС при перитоните Peritonitis-affected lymphangions (n = 10)
10 ⁻⁸	98,4 ± 2,2	96,2 ± 1,4	17,5 ± 2,2*	131 ± 3,9*
10 ⁻⁷	94,6 ± 1,7	84,9 ± 0,93	23,9 ± 1,7*	95,8 ± 3,5
10 ⁻⁶	107,6 ± 1,6	98,1 ± 1,07	44,5 ± 4,1*	97,9 ± 5,2
10 ⁻⁵	98,4 ± 1,9	84,9 ± 1,4	81,1 ± 9,7*	95,4 ± 5,7
10 ⁻⁴	95,4 ± 1,9	100 ± 1,3	63,0 ± 9,9*	100 ± 4,2

Примечание. ЛС — лимфатические сосуды. Данные представлены в относительных единицах (среднее ± стандартная ошибка). *статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями (p < 0,05)

The data are presented as mean and standard error. *p < 0.05

клонение. Данные внутри группы сравнивали с помощью Т-критерия Вилкоксона. Для сравнения независимых выборок применяли U-критерий Манна-Уитни.

Результаты

Макроскопическая картина на вскрытии крыс через 1 сутки от момента моделирования соответствовала распространенному перитониту [6]. Фоновая фазная активность в лимфангионах при перитоните отличалась от таковой в интактных лимфангионах — средняя частота спонтанных фазных сокращений в лимфатических сосудах крысы составила 10,6±1,5 мин⁻¹, амплитуда — 90,8±9,6 мкН. В интактных сосудах частота спонтанного ритма одиночных фазных сокращений в среднем составила — 13,1±0,7 мин⁻¹, амплитуда — 103,1±4,5 мкН. По причине статистически значимых отличий параметров фоновой сократительной активности в интактных лимфангионах и сосудах при перитоните эффекты тестируемого вещества оценивали с применением относительных величин динамики параметров фазной активности. В таблице 1 приведены расчетные показатели частоты и амплитуды сокращений изолированных лимангионов (фоновые значения приняты за 100).

Из представленных данных следует, что серотонин и в интактных сосудах и при перитоните действует только на амплитуду фазных сокращений. Статистически значимых хронотропных реакций ни в интактных объектах, ни в лимфангионах при перитоните получено не было.

В интактных лимфангионах влияние 5-НТ способствовало увеличению амплитуды фазных сокращений и повышению тонуса стенки сосуда, который в ответ на действие серотонина во всем диапазоне исследуемых концентраций дозозависимо повышался на 0,2-0,55 мН по отношению к исходному уровню.

Лимфангионы через 1 сутки перитонита реагировали на 5-НТ, но характер ответных реакций отличался от сократительных реакций кишечного лимфатического ствола в физиологических условиях. Только на серотонин в концентрации 10⁻⁸ М был получен статистически значимый прирост амплитуды сокращений, который составил 25,7% по отношению к фоновой величине.

Учитывая, что в интактном кишечном стволе серотонин стимулировал моторику через 5-НТ₂ рецепторы и α₂-адренорецепторы на эндотелиоцитах, можно сделать вывод, что эффект тестируемого вещества при перитоните снижается в результате десенсибилизации или снижения количества указанных рецепторов в ответ на действие биогенного амина в высоких концентрациях [6, 7].

В сосудах без эндотелия частота фазных сокращений составила 15,0±0,7 мин⁻¹, что на 7,6% выше, чем в интактных лимфангионах и на 40,3% в выше, чем в условиях перитонита (p≤0,05). Амплитуда фазных сокращений лимфангионов без эндотелия значимо не отличалась от таковой в интактных сосудах (105,8±7,3 мкН) и была выше, чем при перитоните на 16,5% (p≤0,05). Сравнение характера ответных реакций в лимфангионах при перитоните и сосудов без эндотелия также проводилось с применением относительных единиц по причине статистически значимой разницы параметров фоновой фазной активности. В таблице 2 приведены относительные величины динамики сократимости лимфатических сосудов при использовании серотонина по отношению к фону (фоновые значения приняты за 100).

При этом характер реакций на 5-НТ в деэндоцелизованных лимфатических сосудах был

Концентрация серотонина, М 5-HT concentration, mol/L	Частота спонтанных сокращений <i>Contraction frequency</i>		Амплитуда спонтанных сокращений <i>Contraction amplitude</i>	
	ЛС при перитоните <i>Peritonitis-affected lymphangions (n = 10)</i>	ЛС без эндотелия <i>Endothelial- denuded lymphangions (n = 10)</i>	ЛС при перитоните <i>Peritonitis- affected lymphangions (n = 10)</i>	ЛС без эндотелия <i>Endothelial- denuded lymphangions (n = 10)</i>
10 ⁻⁸	96,2 ± 1,4	91,1 ± 0,7*	131 ± 3,9*	101,7 ± 3,4
10 ⁻⁷	84,9 ± 0,93	77,8 ± 0,6*	95,8 ± 3,5	96,8 ± 3,2
10 ⁻⁶	98,1 ± 1,07	67,9 ± 0,4*	97,9 ± 5,2	102,2 ± 3,1
10 ⁻⁵	84,9 ± 1,4	85,6 ± 1,1*	95,4 ± 5,7	98,2 ± 2,9
10 ⁻⁴	100 ± 1,3	85,9 ± 0,5	100 ± 4,2	96,6 ± 4,9

Примечание. ЛС — лимфатические сосуды. Данные представлены в относительных единицах (среднее ± стандартная ошибка). *статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p < 0,05$)

The data are presented as mean and standard error. * $p < 0.05$

Таблица 2.

Параметры сократительной активности изолированных лимфангионов под действием серотонина при экспериментальном каловом перитоните по отношению к лишенным эндотелия лимфангионам.

Table 2.

The influence of 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) on the contraction frequency and amplitude in mesenteric lymphatic vessels at peritonitis-affected lymphangions and endothelial-denuded lymphangions.

схожим с реакциями лимфангионов при перитоните, но уменьшение частоты фазных сокращений под действием серотонина в диапазоне концентраций 10⁻⁸ — 10⁻⁵ М было более существенным, что, по-видимому, свидетельствует об активации 5-HT₁, 5-HT₄ или 5-HT₇ типов рецепторов. При этом серотонин во всем диапазоне концентраций не приводил к статистически значимому изменению амплитуды фазных сокращений лимфангионов без эндотелия по отношению к ее фоновому уровню.

Обсуждение

Эволюционно сложилось, что лимфатическая система первой реагирует на попадание чужеродных агентов во внутреннюю среду организма. Исходно в иммунный ответ вовлекаются иммунокомпетентные клетки и лимфатические сосуды. В процессе иммунного ответа формируется стаз в лимфатической системе, что, с одной стороны, локализует воспаление, а с другой, в случае развития перитонита, наблюдается усиление интоксикации организма. К настоящему моменту известны способы, с применением которых можно стимулировать лимфоток в интактных лимфатических сосудах. Вопрос коррекции моторики в патологических условиях (в частности, при воспалении) до сих пор остается открытым.

Результаты исследования показали, что через 1 сутки острого перитонита существенно угнетается фазная активность лимфангионов. Аналогичным образом, путем моделирования на мышах был получен экспериментальный лимфостаз, сопровождающийся утратой сократительной функции лимфатических сосудов и

подтверждающий роль воспалительных механизмов в его патогенезе [8].

В качестве возможных причин замедления моторики в лимфангионах во время перитонита можно рассмотреть угнетающий эффект эндотоксинов на пейсмекерные клетки, который уменьшает частоту фоновой фазной активности, а также снижение содержания таких модуляторов работы водителя ритма, как биогенные амины [2, 9]. В нашей работе выявлено, что через 1 сутки от начала воспаления серотонин продолжает стимулировать моторику в лимфангионах, причем, как и в интактных сосудах, так и при перитоните проявляется только положительный инотропный эффект тестируемого вещества. Схожие результаты проявлялись при массивной дегрануляции тромбоцитов — влияние серотонина и других хемокинов приводило к гипертензии в артериях легких, а угнетение моторики в этих сосудах было вызвано дефицитом тромбоцитарных производных цитокинов [10].

Ранее в наших исследованиях было показано, что в интактном кишечном стволе серотонин стимулирует моторику через 5-HT₂ рецепторы и α_2 -адренорецепторы на эндотелиоцитах [6]. Учитывая, что эффект серотонина проявляется только в низких концентрациях, можно сделать вывод, что чувствительность эндотелиальных рецепторов этих двух типов при перитоните снижается.

В кровеносных сосудах выделяют три типа реагирования эндотелия на различные факторы: нормореактивно-декрементный — при данном типе реагирования чувствительность эндотелиальных рецепторов сохраняется, но наблюдается более быстрое освобождение из депо

эндотелиальных вазодилататоров, а возможно, и истощение эндотелиальных ферментных систем; гиперреактивно-декрементный – при данном типе реагирования повышенная чувствительность рецепторов микрососудистого эндотелия сочетается с более быстрым освобождением эндотелиальных депо и истощением эндотелиальных ферментных систем; гипореактивно-декрементный – при данном типе реагирования наблюдается разбалансировка микрососудистого ответа, которая проявляется в снижении чувствительности микрососудистых эндотелиальных рецепторов и ускоренном истощении ферментных систем и депо вазодилататоров в эндотелии микрососудов [3].

В лимфатических сосудах через 1 сутки развития перитонита происходит разбалансировка микрососудистого ответа, проявляющаяся снижением чувствительности эндотелиальных рецепторов и ускоренным истощением ферментных систем и депо вазодилататоров в эндотелии микрососудов, то есть по аналогии с кровеносными сосудами лимфангионы реагируют на 5-НТ при воспалительном процессе по гипореактивно-декрементному типу [3].

В наших работах показано, что эндотелийзависимый механизм действия серотонина в интактных лимфатических сосудах частично связан с угнетением синтеза NO [6]. Исследователями показано, что причиной индуцированной эндотоксином сосудистой гипореактивности являются высокие уровни циркулирующего оксида азота NO, которые приводят к тяжелой гипотензии, плохой перфузии тканей и полиорганной недостаточности [11]. Таким образом, снижение чувствительности эндотелиоцитов к серотонину связано с избыточным выделением оксида азота в сыворотку крови под влиянием эндотоксинов [12].

Второй аспект механизма действия серотонина, выявленный в наших исследованиях, связан с изменением синтеза простагландинов в лимфангионах [6]. Простагландин-опосредованная модуляция механизма действия серотонина обнаружена в нейронах [13].

Ответные реакции на 5-НТ у деэндоотелизированных лимфангионов проявлялись в форме отрицательного хронотропного ответа, что подтверждает наличие на миоцитах лимфангионов 5-НТ₁, 5-НТ₄ или 5-НТ₇ типов рецепторов, через которые серотонин угнетает фазную активность сосудов [14, 15]. Подобные результаты получены ранее – в лимфатических сосудах морской свинки обнаружены 5-НТ₇ рецепторы [14]. Активация этих типов рецепторов серотином при выраженной дисфункции эндотелия приведет к угнетению моторики в лимфангионах и снижению лимфотока. В изолированных лимфатических сосудах овцы снижение частоты фазных сокращений происходило в результате активации 5-НТ₄ рецепторов [15].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют, что патологические изменения в лимфатических сосудах при перитоните схожи с таковыми в кровеносных сосудах. Через 1 сутки перитонита в эндотелиоцитах лимфангионов происходит угнетение синтеза и выделения NO и простагландинов, а также изменение характера реакций на серотонин. Сохранение стимулирующего действия 5-НТ в низких концентрациях на моторику лимфангионов при перитоните позволяет рассматривать его как стимулятор лимфотока для восстановления гомеостаза в интерстициальном пространстве.

Таким образом, на основании результатов исследования можно утверждать, что развитие перитонита сопровождается формированием дисфункции эндотелия в лимфатических сосудах. Медикаментозное воздействие, направленное на коррекцию этого состояния, будет способствовать стимуляции кровотока и лимфотока на микроциркуляторном уровне, более активной санации патологического очага, снижению эндотоксиновой агрессии и улучшению прогноза динамики перитонита. Модуляторы лимфотока следует использовать с учетом состояния синтетических процессов в эндотелиоцитах (синтеза NO и простагландинов) и измененной реактивности лимфангионов.

Литература / References:

1. Чернядьев С.А., Булаева Э.Б., Кубасов К.А. Патогенетические аспекты развития пареза кишечника при перитоните. *Проблемы стоматологии*. 2016;12(4):84-89 [Chernyadev SA, Bulaeva EI, Kubasov KA Pathogenetic aspects of the development of intestinal paresis in peritonitis. *Actual Problems in Dentistry*. 2016;12(4):84-89. (In Russ.)] <https://doi.org/10.18481/2077-7566-2016-12-4-84-89>
2. Белик Б.М. Оценка клинической эффективности препарата серотонина адипинат в лечении и профилактике синдрома энтеральной недостаточности при распространенном перитоните. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2016;9:76-82 [Belik BM. Evaluation of clinical efficacy of serotonin adipate in treatment and prevention of enteral insufficiency syndrome at generalized peritonitis. *Pirogov Russian Journal of*

- Surgery = Khirurgiya. Zhurnal imeni N.I. Pirogova.* 2016;9:6-82. (In Russ.).] <https://doi.org/10.17116/hirurgia2016976-82>
3. Полунина О.С., Воронина Л.П., Полунина Е.А. Севостьянова И.В. Анализ реактивности эндотелия микрососудов кожи при хронической сердечной недостаточности. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2017;16(4(64)):50-55 [Polunina OS, Voronina LP, Polunina EA, Sevostyanova IV. Analysis of the reactivity of the endothelium of microvessels of the skin in chronic heart failure. *Local Microcirculation = Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya.* 2017;16(4(64)):50-55. (In Russ.).] <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-4-50-55>
 4. Behringer EJ, Scallan JP, Jafarnejad M, Castorena-Gonzalez JA, Zawieja SD, Moore JE Jr, Davis MJ, Segal SS. Calcium and electrical dynamics in lymphatic endothelium. *J Physiol.* 2017;595(24):7347-7368. <https://doi.org/10.1113/JP274842>
 5. Liu HN, Hirata H, Okuno Y, Okabe M, Furukawa K. Dopamine and Serotonin Receptors Cooperatively Modulate Pacemaker Activity of Intestinal Cells of Cajal. *Chin J Physiol.* 2018;61(5):302-312. <https://doi.org/10.4077/CJP.2018.BAH607>
 6. Егорова А.А., Петунов С.Г., Авраменко Е.А. Влияние серотонина на лимфатические сосуды белой крысы. Роль эндотелия. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2010;1(37):79-82 [Egorova AA, Petunov SG, Avramenko EA. Influence of endothelium on the 5-HT effect on lymphatic vessel. *Local Microcirculation = Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya.* 2010;1(37):79-82. (In Russ.).] <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2011-10-1-79-82>
 7. Felsing DE, Canal CE, Booth RG. Ligand-directed serotonin 5-HT_{2C} receptor. *Eur J Pharmacol.* 2019;848:131-139. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.01.037>
 8. Jiang X, Nicolls MR, Tian W, Rockson SG. Lymphatic Dysfunction, Leukotrienes, and Lymphedema. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:49-70. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034008>
 9. Кубышкина Н.А., Гайворонская В.В. Эндотоксин-индуцированные изменения функциональной активности лимфатических сосудов. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина.* 2014;(4):205-211 [Kubyshkina NA, Gaivoronskaya VV. Endotoxin induced alterations of functional activity of lymphatic vessels. *Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine.* 2014;(4):205-211. (In Russ.).]
 10. Kazimierz R, Kamiński K. The role of platelets in the development and progression of pulmonary arterial hypertension. *Adv Med Sci.* 2018;63(2):312-316. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2018.04.013>
 11. Punzi S, Belloli C, Gogny M, Desfontis JC, Mallem MY. Change in vascular smooth muscle response to 5-HT due to short- or long-term endothelial denudation of the bovine digital vein. *Vet J.* 2016;207:154-159. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.007>
 12. Shih CC, Hsu LP, Liao MH, Yang SS, Ho ST, Wu CC. Effects of SPAK on vascular reactivity and nitric oxide production in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol.* 2017;814:248-254. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.08.038>
 13. Singh AK, Zajdel J, Mirrasekhian E, Almoosawi N, Frisch I, Klawonn AM, Jaarola M, Fritz M, Engblom D. Prostaglandin-mediated inhibition of serotonin signaling controls the affective component of inflammatory pain. *J Clin Invest.* 2017;127(4):1370-1374. <https://doi.org/10.1172/JCI90678>
 14. Chan AK, von der Weid PY. 5-HT decreases contractile and electrical activities in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery: role of 5-HT₇-receptors. *Br J Pharmacol.* 2003;139(2):243-254. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705264>
 15. McHale NG, Thornbury KD, Hollywood MA. 5-HT inhibits spontaneous contractility of isolated sheep mesenteric lymphatics via activation of 5-HT₄ receptors. *Microvasc Res.* 2000;60(3):261-268. <https://doi.org/10.1006/mvre.2000.2275>

Сведения об авторах

Егорова Александра Алексеевна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (195067, Россия г. Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, д. 47, корп. 9).

Вклад в статью: написаны разделы: введение – 30%, материал и методы – 70%, результаты – 100%, обсуждение – 20%, выводы – 50%.

ORCID: 0000-0002-7931-6184

Авраменко Екатерина Александровна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7, корп. 9).

Вклад в статью: написаны разделы: введение – 70%, материал и методы – 30%, обсуждение – 80%, выводы – 50%.

ORCID: 0000-0001-5887-7102

Статья поступила: 15.07.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Dr. Alexandra A. Egorova, MD, PhD, Senior Lecturer, Department of Physiology, Mechnikov North-Western State Medical University (47/9, Piskarevskiy Prospekt, St. Petersburg, 195067, St. Petersburg, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; performed the experiments; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-7931-6184

Dr. Ekaterina A. Avramenko, MD, PhD, Assistant Professor, Department of General Surgery, St. Petersburg State University (7-9, Universitetskaya Naberezhnaya, St. Petersburg, 199034, St. Petersburg, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; performed the experiments; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-5887-7102

Received: 15.07.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-42-49>

СОДЕРЖАНИЕ АЛЬДОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖИТЕЛЕЙ СИБИРСКОГО ПРОМЫШЛЕННОГО РЕГИОНА (НА ПРИМЕРЕ КУЗБАССА): ОЦЕНКА МОДУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ЭНДОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

ТХОРЕНКО Б.А.^{1,2}, ЦЕПОКИНА А.В.^{1*}, ЛАВРЯШИНА М.Б.³, ПОНАСЕНКО А.В.¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

³ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

Резюме

Цель. Определение вариабельности сыровоточных концентраций альдостерона у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) жителей Кузбасса с учетом модулирующего эффекта артериальной гипертензии, пола и возраста.

Материалы и методы. Оценку концентрации альдостерона в сыворотке крови 176 больных стабильной ИБС проводили конкурентным твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА). Каждый биологический образец сопровождался информацией о половой принадлежности, возрасте и заболеваниях в анамнезе. Формирование базы экспериментальных данных и вычисление традиционных статистик осуществлено в программе STATISTICA.

Результаты. Установлено, что средние значения концентрации альдостерона у больных ИБС, проживающих на территории Кузбасса, соответствует данным, описанным в научной и

медицинской литературе. Выявлен модулирующий эффект пола, возраста и артериальной гипертензии (АГ) в анамнезе на уровни содержания сыровоточного альдостерона.

Заключение. Установлено, что эндогенными факторами риска уровней альдостерона, превышающего региональные референсные значения, являются женский пол, возраст старше 60 лет и АГ в анамнезе.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, альдостерон, эндогенные факторы, население Кузбасса.

Конфликт интересов

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

Финансирование

Исследование проведено при финансовой поддержке Фонда молодых ученых в области биомедицинских наук, проект № 2017_2 и РФФИ, проект № 20-04-00823 А.

Для цитирования:

Тхоренко Б.А., Цепоккина А.В., Лавряшина М.Б., Понасенко А.В. Содержание альдостерона в сыворотке крови жителей сибирского промышленного региона (на примере Кузбасса): оценка модулирующего эффекта эндогенных факторов. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3): 42-49. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-42-49>

*Корреспонденцию адресовать:

Цепоккина Анна Викторовна, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6, e-mail: annasepokina@mail.ru

© Тхоренко Б.А. и др.

ORIGINAL RESEARCH

DETERMINANTS OF SERUM ALDOSTERONE IN KEMEROVO REGION

BORIS A. TKHORENKO^{1,2}, ANNA V. TSEPOKINA^{1 **}, MARIA B. LAVRYASHINA³, ANASTASIA V. PONASENKO¹

¹Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

²Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

³Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract

Aim. To determine the variability of serum aldosterone in patients with stable coronary artery disease in relation to arterial hypertension status, age, and gender.

Materials and Methods. We recruited 176 consecutive patients with stable coronary artery disease and evaluated serum aldosterone by enzyme-linked immunosorbent assay, further comparing its levels with regards to age, gender, and presence of arterial hypertension.

Results. Average serum aldosterone in patients with stable coronary artery disease was similar in Kemerovo Region and those reported in the literature. Age ≥ 60 years, female gender, and the pres-

ence of arterial hypertension were among the serum aldosterone determinants

Conclusions. Females ≥ 60 years of age with a medical history of arterial hypertension have increased serum aldosterone.

Keywords: coronary artery disease, aldosterone, determinants, Kemerovo Region, Kuzbass.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

This study was funded by the Foundation for Young Biomedical Researchers (project number 2017_2) and by Russian Foundation on Basic Research (project number 20-04-00823 A).

◀ English

For citation:

Boris A. Tkorenko, Anna. V. Tsepokina, Maria B. Lavryashina, Anastasia V. Ponasenko. Determinants of serum aldosterone in Kemerovo Region. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020;5(3): 42-49. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-42-49>

**Corresponding author:

Ms. Anna V. Tsepokina, 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation, e-mail: annacepokina@mail.ru

© Boris A. Tkorenko et al.

Введение

Кровообращение – один из важнейших физиологических механизмов, поддерживающих гомеостаз [1], а ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) и альдостерон играют важную роль в адаптации организма к различным стрессовым воздействиям. Известны ситуации, при которых в ответ на действие стрессорного фактора кора надпочечников усиленно высвобождает не глюкокортикоиды (кортизол, кортизон, кортикостерон), а минералокортикоиды (дезоксикортикостерон, альдостерон). Вероятно, это связано с нарушением биосинтеза кортикостероидов в коре надпочечников или же действием других, так называемых обуславливающих факторов, например, изменением ионного баланса организма. В данном случае, при повторяющихся стрессорных воздействиях, возникает высокая склонность к развитию воспалительных и аллергических заболеваний, гипертензивных состояний, склеротических процессов в почках, вплоть до почечной недостаточности [2].

Альдостерон – ключевой компонент (РААС) – производится корой надпочечников. Метаболизм альдостерона обеспечивается транспортны-

ми белками и ферментами. Биологическая роль альдостерона, прежде всего, призвана сохранять единый пул межклеточной среды организма и предотвращать потери ионов Na^+ и воды [3]. Изучению динамики уровня альдостерона в когортных исследованиях посвящено огромное количество работ [4–8]. В них продемонстрирован ряд особенностей уровня сывороточного альдостерона в зависимости от пола, возраста, наличия различных заболеваний в анамнезе, а также других экзогенных и эндогенных (в том числе генетически детерминированных) причин.

Одним из факторов, влияющих на генетическое разнообразие и генофонд популяции, является формирование популяционной прослойки, наиболее приспособленной к условиям окружающей среды места проживания. Формирование когорты наиболее приспособленных к стрессовым факторам региона проживания индивидуумов тесно связано с состоянием здоровья популяции в целом и обуславливает возможность формирования целевых первичных профилактических мероприятий.

Население Кузбасса – крупного региона Западной Сибири с развитой углеперерабатывающей,

теплоэнергетической, металлургической и химической промышленностью – сформировано, в основном, на основе миграционных потоков (1940 – 1970-е гг.) из центральной части России и некоторых бывших советских республик. Очевидно, что генетическая адаптация к природно-климатическим условиям региона за столь короткий промежуток времени невозможна, поэтому высокая вероятность того, что значительной части населения региона свойственна физиологическая дезадаптация и сопровождающий данное состояние процесс дисбаланса биохимических процессов, обеспечивающих гомеостаз на молекулярном и организменном уровне.

В то же время заболеваемость ишемической болезнью сердца (ИБС) определяется совокупностью генетических, биологических и средовых факторов, включающих множество компонентов, как хорошо изученных, так и предполагаемых. В рамках многоцентрового эпидемиологического исследования «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в Российской Федерации (ЭССЕ-РФ) в Кемеровской области» опубликованы данные [9], демонстрирующие второе из лидирующих мест, после ожирения, артериальной гипертензии в рисках развития ИБС у населения Кузбасса. Особенно такие риски велики среди мужского населения трудоспособного возраста. Однако опубликованных данных об особенностях содержания альдостерона в сыворотке крови больных ИБС в климатических и экологических условиях Западной Сибири нами обнаружено не было.

Цель исследования

Определение вариабельности сывороточных концентраций альдостерона у больных ишемической болезнью сердца жителей Кузбасса с учетом модулирующего эффекта артериальной гипертензии, пола и возраста.

Материалы и методы

Сбор материала и комплекс лабораторных исследований осуществляли с использованием коллекций лаборатории геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово). Для исследования отобраны биологические образцы 176 больных стабильной ИБС (таблица 1), проходивших лечение в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». Каждый биологический об-

разец, кроме данных о половой принадлежности и возрасте, сопровождался информацией о заболеваниях в анамнезе и подписанным добровольным информированным согласием на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен Объединенным локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Определение концентрации альдостерона в сыворотке крови проводили конкурентным твердофазным ИФА (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) на анализаторе иммуноферментных реакций АИФР-01 «УНИПЛАН» (Россия) наборами ALDOSTERONE ELISA DBC (Diagnostics Biochem Canada Inc.) в соответствии с протоколом производителя.

Формирование базы данных и вычисление традиционных статистик – среднее ($\bar{X}$), стандартная ошибка средней ($S.E.$), проверка нормальности распределения (критерий Колмогорова-Смирнова), сравнение средних (непараметрический U-критерий Манна-Уитни) – осуществлено в пакете программы STATISTICA 8.0 (StatSoft).

Результаты и обсуждение

По результатам лабораторных исследований установлено, что средние значения концентрации альдостерона у больных ИБС, проживающих на территории Кузбасса, в контексте модулирующего воздействия АГ соответствует данным, описанным в научной и медицинской литературе. Так, при сравнении групп «случай» (лица с анамнезом АГ более 10 лет) и «контроль» (пациенты без анамнеза АГ), без учета половозрастной структуры обследованных, выявлено статистически значимое ($p < 0,001$) превышение среднего уровня сывороточного альдостерона при установленном диагнозе АГ (таблица 2).

Так как пределы варьирования показателя сывороточного альдостерона в обеих группах выходили за пределы интервала нормальных значений (от 8 до 172 пг/мл), для детализации представлений была проведена градация содержания альдостерона на значения «выше нормы», где показатели концентраций альдостерона превышали 172 пг/мл, и «норма» – для случаев определения альдостерона ≤ 172 пг/мл. Концентрация альдостерона ниже нормы (3,9 пг/мл) была зафиксирована только в одном образце, полученном от мужчины в возрасте 56 лет с анамнезом АГ и фибрилляции предсердий. Отметим, что

Характеристики / Features		n	%
Пол / Gender	Женщины / Females	27	18,2
	Мужчины / Males	121	81,8
Возраст / Age	до 60 лет / < 60 years	90	60,8
	≥ 60 лет / ≥ 60 years	58	39,2
Артериальная гипертензия (АГ) Arterial hypertension		149	84,7
Инфаркт миокарда Myocardial infarction		100	67,5
Мультифокальный атеросклероз Peripheral atherosclerosis		99	66,8
Стеноз брахиоцефальных артерий >50% > 50% brachiocephalic artery stenosis		28	18,9
Сахарный диабет 2 типа Type 2 diabetes mellitus		20	13,5
Варикозная болезнь Varicose veins		18	12,1
Желудочковая экстрасистолия Ventricular arrhythmia		15	10,1
Острое нарушение мозгового кровообращения Past medical history of stroke		13	8,8
Фибрилляция предсердий Past medical history of atrial fibrillation		12	8,1
Хроническая обструктивная болезнь легких Chronic obstructive pulmonary disease		3	2,0

Таблица 1.

Половозрастные и клиничко-анамнестические характеристики обследованной группы (n = 176).

Table 1.

Age, gender, and clinicopathological features of the examined group (n = 176).

Группа по наличию АГ Arterial hypertension status	Градация по концентрации Serum aldosterone	n	Среднее, пг/мл Mean ± SE, pg/mL	Пределы варьирования, пг/мл Minimum and maximum values, pg/mL
Случай Case	Всего Total	149	157,01 ± 10,09*	3,9 – 939,8
	≤ 172 пг/мл ≤ 172 pg/mL	103	97,31 ± 4,24	11,2 – 171,6
	> 172 пг/мл > 172 pg/mL	46	294,01 ± 20,07	173,8 – 933,8
Контроль Control	Всего Total	27	90,31 ± 13,95	12,7 – 295
	≤ 172 пг/мл ≤ 172 pg/mL	23	73,40 ± 10,98	12,7 – 171
	> 172 пг/мл > 172 pg/mL	4	213,9 ± 37,79	175 – 295

Таблица 2.

Концентрации альдостерона в сыворотке крови лиц с ИБС и АГ в анамнезе.

Table 2.

Serum aldosterone in the patients with stable coronary artery disease and arterial hypertension.

Примечание. * – статистически значимые различия описаны в тексте

SE – standard error of the mean, *p < 0.05

в одной из отечественных работ [4], опубликованных незадолго до подготовки к печати нашей статьи, обсуждается роль альдостерона в развитии фибрилляции предсердий. Однако авторы сообщают о вкладе гипер-, а не гипопродукции. Возвращаясь к описанию результатов, отметим, что при такой градации, величины средних зна-

чений были ожидаемо выше у больных с анамнезом АГ (таблица 2). Следует отметить, что и при превышении нормальных значений, верхняя граница концентрации альдостерона у пациентов без анамнеза АГ ниже, однако статистического подтверждения при сравнении не получено.

Таблица 3.

Концентрации альдостерона у больных ИБС в зависимости от принадлежности к полу.

Table 3.

Serum aldosterone in male and female patients with stable coronary artery disease.

Группа по полу <i>Gender</i>	Градации по концентрации <i>Serum aldosterone</i>	n	Среднее, пг/мл <i>Mean ± SE, pg/mL</i>	Пределы варьирования, пг/мл <i>Minimum and maximum values, pg/mL</i>
Мужчины <i>Males</i>	Всего <i>Total</i>	149	138,33 ± 8,67*	3,94 – 509,1
	Выше нормы <i>Above the reference values</i>	110	89,49 ± 4,30*	11,2 – 171,6
	Норма <i>Within the reference values</i>	38	283,23 ± 15,89	174,1 – 509,1
Женщины <i>Females</i>	Всего <i>Total</i>	27	195,87 ± 33,15	33,8 – 933,8
	Выше нормы <i>Above the reference values</i>	16	116,70 ± 10,91	33,8 – 167,7
	Норма <i>Within the reference values</i>	11	311,03 ± 67,19	173,8 – 933,8

Примечание. * – статистически значимые различия описаны в тексте

SE – standard error of the mean, *p < 0.05

При формировании выборки в группу были включены лица как мужского, так и женского пола (таблица 3). Данные литературы свидетельствуют об особенностях биосинтеза альдостерона у лиц противоположного пола, особенно с учетом возрастных параметров. В исследованиях продемонстрировано, что у женщин в период пре- и постменопаузы концентрация альдостерона выше, чем у мужчин тех же возрастных групп. В качестве объяснения этого феномена приводятся сведения о гормональной перестройке, происходящей в организме женщины в этот период, и проявляющейся дефицитом женских половых гормонов (Маслова, Баранова, 2000), дигидроэпиандростерона сульфата (Sulcová et al., 1997), избытком кортизола и андрогенов (Langenickel et al., 2003) [цит. по 5].

Сравнение групп мужчин и женщин, без градации содержания альдостерона на основе нормальных значений, выявляет статистически значимые ($p < 0,023$) различия средних значений данного белка (рисунок 1). Отметим, что у женщин в целом оказался значительно шире диапазон варьирования показателя. В одном образце (женщина в возрасте 57 лет, в анамнезе АГ и нефропатия) концентрация альдостерона превысила верхнюю границу нормальных значений почти в 5,5 раз и составила 933,8 пг/мл.

Сравнение групп мужчин и женщин с учетом «норма», «выше нормы», также продемонстрировало превышение показателя средних значений содержания альдостерона в женской выборке

($p < 0,024$). Рисунок 1 хорошо иллюстрирует данное заключение.

Далее аналогичным образом была проанализирована связь содержания альдостерона с возрастом. Группу обследованных разделили на подгруппы – «до 60 лет» и «от 60 лет и старше» (таблица 4).

При таком варианте сравнительного анализа статистически значимых различий между группами не выявлено. Однако при всех вариантах сопоставления средних значений в двух возрастных группах – в суммарной выборке, при значениях альдостерона в пределах нормы, при повышенных концентрациях альдостерона – фиксируются более высокие величины средних значений в старшей возрастной группе. Это вступает в определенное противоречие с утверждением, что «... значение РААС как симпатoadреналовой системы с возрастом уменьшается. Концентрация ренина, ангиотензина II и альдостерона с возрастом уменьшаются, а связь изменения этих гормонов с возрастом и изменения артериального давления представляется не столь очевидной» [6]. О том, что содержание альдостерона с возрастом уменьшается, сообщается и в исследовании F. Beuschlein [7] и других работах [10].

Известно, что практически весь альдостерон находится в крови в свободной форме и в обычных условиях его концентрация в плазме зависит в основном от количества поступающего с пищей натрия, времени суток и положения тела. Исследователи отмечают, что уровень гормо-

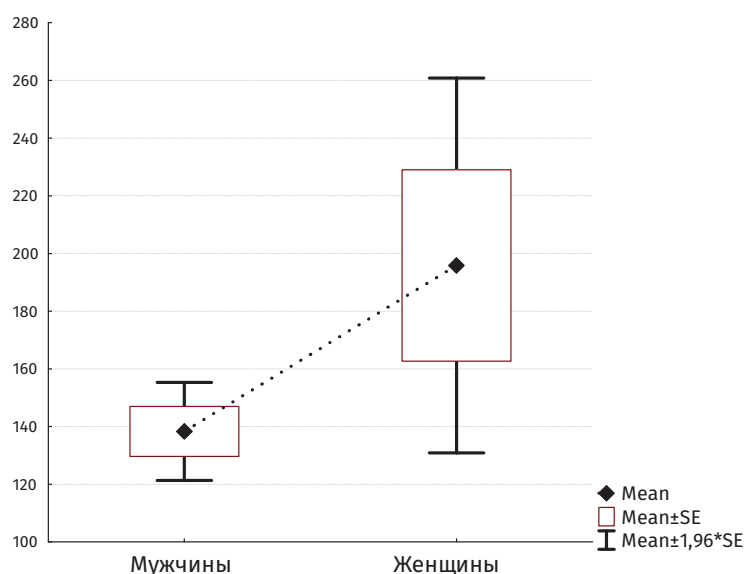


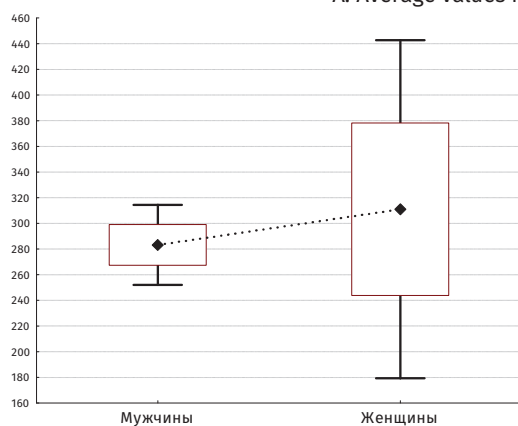
Рисунок 1.

Концентрация сывороточного альдостерона в обследованных группах мужчин и женщин.

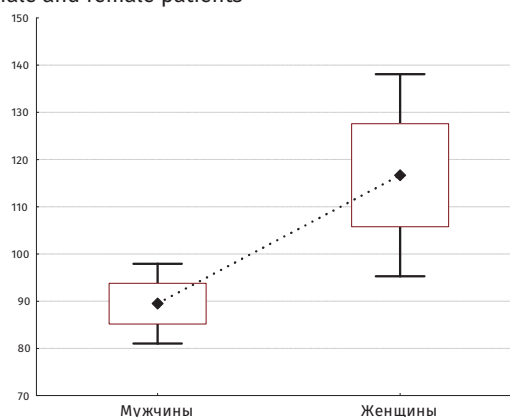
Figure 1.

Serum aldosterone in male and female patients with stable coronary artery disease.

А. Среднее значение в группах
A. Average values in male and female patients



Б. Среднее значение при содержании выше нормы
B. Average value above the reference



В. Среднее значение при содержании в пределах нормы
C. Average value within the reference

Группа по возрасту Age group	Градация по концентрации Serum aldosterone	n	Среднее, пг/мл Mean $\pm$ SE, pg/mL	Пределы варьирования, пг/мл Minimum and maximum values, pg/mL
до 60 лет < 60 years	Всего Total	109	138,22 $\pm$ 11,83	3,94 – 933,8
	Выше нормы Above the reference values	80	87,75 $\pm$ 5,18	11,2 – 171,6
	Норма Within the reference values	28	287,19 $\pm$ 28,99	175,0 – 933,8
от 60 лет и старше $\geq$ 60 years	Всего Total	67	161,70 $\pm$ 13,72	18,2 – 509,1
	Выше нормы Above the reference values	46	101,98 $\pm$ 6,44	18,2 – 161,7
	Норма Within the reference values	21	292,50 $\pm$ 23,03	173,8 – 509,1

Таблица 4.

Показатели концентрации альдостерона в исследованной группе в зависимости от возраста.

Table 4.

Serum aldosterone in different age groups.

на минимален утром и в положении лёжа, а максимален во второй половине дня и в вертикальном положении (сидя, стоя). Модифицирующий

эффект в нашем исследовании могло вносить и широкое распространение в изученной выборке лиц с АГ. Поэтому на следующем этапе иссле-

дования мы проанализировали уровень сывороточного альдостерона в группе «выше нормы» у больных ИБС одновременно с учетом возраста и АГ (таблица 5). Такой тип сравнения различий между группами не выявил, хотя и продемонстрировал более высокие показатели содержания альдостерона у лиц с АГ в возрастной группе до 60 лет.

Таким образом, в завершение этой части описания результатов исследования отметим, что для получения объективных данных о динамике содержания альдостерона в сыворотке крови в зависимости от пола, возраста и других параметров необходимо тщательное планирование исследования с учетом максимально возможного числа моделирующих факторов.

Таблица 5.

Показатели концентрации альдостерона в исследованной группе больных ИБС с АГ в анамнезе в зависимости от возраста.

Table 5.

Serum aldosterone in different age groups depending on arterial hypertension status.

Группа по возрасту <i>Age group</i>	Градация по концентрации <i>Serum aldosterone</i>	n	Среднее, пг/мл <i>Mean ± SE, pg/mL</i>	Пределы варьирования, пг/мл <i>Minimum and maximum values, pg/mL</i>
до 60 лет < 60 years	Всего <i>Total</i>	85	150,80 ± 14,32	3,94 – 933,8
	Выше нормы <i>Above the reference values</i>	25	295,27 ± 31,92	176,1 – 933,8
	Норма <i>Within the reference values</i>	60	92,08 ± 15,55	11,2 – 171,6
от 60 лет и старше ≥ 60 years	Всего <i>Total</i>	65	162,12 ± 13,92	18,2 – 509,1
	Выше нормы <i>Above the reference values</i>	21	292,50 ± 23,0	173,8 – 509,1
	Норма <i>Within the reference values</i>	44	104,32 ± 6,49	18,2 – 167,7

Заключение

В проведенном исследовании продемонстрировано:

- у больных ИБС с анамнезом артериальной гипертензии средние значения концентрации альдостерона в сыворотке крови выше по сравнению с лицами с ИБС, но без анамнеза гипертензии;
- у женщин в период пре- и постменопаузы концентрация альдостерона выше, чем у мужчин тех же возрастных групп;
- средние значения содержания альдостерона в сыворотке крови в женской выборке выше,

чем в мужской даже при разделении на группы «норма» и «выше нормы»;

- уровень альдостерона в крови у лиц от 60 лет и старше выше, чем у лиц более молодых возрастных групп, что противоречит некоторым литературным данным.

Таким образом, суммируя все вышеперечисленные выводы, мы своим исследованием подтверждаем ранее полученные данные о модулирующем эффекте пола, возраста и артериальной гипертензии в анамнезе на содержание сывороточного альдостерона у больных ИБС.

Литература / References:

- Соловьев В.С., Погонишева И.А., Соловьева С.В., Погонишев Д.А. Адаптация человека в условиях Ханты-Мансийского автономного округа – Югры. Ханты-Мансийск: Печатное дело; 2010. 299 с. [Solov'ev VS, Pogonysheva IA, Solov'eva SV, Pogonyshchev DA. Adaptatsiya cheloveka vusloviyakh Khandy-Mansiyskogo avtonomnogo okruga – Yugry. Khanty-Mansiysk: Printing; 2010. 299 p. (In Russ.).]
- Хитров Н.К. Стрессорное воздействие экологически опасных и вредных факторов производственной среды и особенностей трудового процесса на центральную и вегетативную нервную систему работников. В кн.: Воздействие на организм человека опасных и вредных экологических факторов. Метрологические аспекты: в 2-х т. Под ред. Исаева Л.К. Т. 1. М.: ПАИМС; 1997. Ссылка активна на 18.08.2020
- [Khitrov NK. Stressornye vozdeystvie ekologicheski opasnykh i vrednykh faktorov proizvodstvennoy sredy i osobennostey trudovogo protsessa na tsentral'nyuyu i vegetativnyuyu nervnyuyu sistemu rabotnikov. In: Vozdeystvie na organizm cheloveka opasnykh i vrednykh ekologicheskikh faktorov. Metrologicheskie aspekty. Isaev LK, editors. Vol. 1. Moscow: PAIMS; 1997. (In Russ.).] Available at: <https://www.kiout.ru/info/publish/25902>. Accessed: 17.08.2020.
- Титов В.Н. Артериальная гипертензия и альдостерон. Российский кардиологический журнал. 2007;6(68):76-87 [Titov VN. Arterial hypertension and aldosterone. Russian Journal of Cardiology. 2007;6(68):76-87. (In Russ.).]
- Ватутин Н.Т., Шевелёк А.Н., Кравченко И.Н. Роль альдостерона в развитии фибрилляции предсердий: современ-

- ный взгляд на проблему. *Архивъ внутренней медицины*. 2019;9(2):107-116 [Vatutin NT, Shevelok AN, Kravchenko IN. The role of aldosterone in the development of atrial fibrillation: modern understanding of problem. *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2019;9(2):107-116. (In Russ.).] <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2019-9-2-107-116>
5. Подзолков В.И., Брагина А.Е., Родионова Ю.Н., Парфенова Е.К. Гендерные особенности Ренин-Ангиотензин-Альдостероновой системы у пациентов с артериальной гипертензией. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2010;6(3):306-310 [Podzolkov VI, Bragina AE, Rodionova JuN, Panferova EK. The gender features of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive patients. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2010;6(3):306-310. (In Russ.).] <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2010-6-3-306-310>
 6. Пристром М.С., Пристром С.Л., Сушинский В.Э. Артериальная гипертензия у пожилых: особенности терапии и реабилитации. Минск: Белорусская наука; 2012. Ссылка активна на 18.08.2020 [Pristrom MS, Pristrom SL, Sushinsky VE. *Arterial'naya gipertenziya u pozhilykh: osobennosti terapii i reabilitatsii*. Minsk: Belorusskaya nauka; 2012. (In Russ.).] Available at: <http://www.iprbookshop.ru/11509.html>. Accessed:18.08.2020.
 7. Beuschlein F. Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(6):85-93. DOI:10.1530/EJE-13-0263
 8. Edelmann F, Tomaschitz A, Wachter R, Gelbrich G, Knoke M, Dürigen HD, Pilz S, Binder L, Stahrenberg R, Schmidt A, März W, Pieske B. Serum aldosterone and its relationship to left ventricular structure and geometry in patients with preserved left ventricular ejection fraction. *Eur Heart J*. 2012;33(2):203-212. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr292>
 9. Максимов С.А., Индукаева Е.В., Артамонова Г.В. Интегральная оценка риска ишемической болезни сердца в эпидемиологических исследованиях (ЭССЕ-РФ в Кемеровской области). Сообщение I: возрастно-половые детерминанты. *Профилактическая медицина*. 2015;18(6):34-39 [Maksimov S., Indukaeva EV, Artamonova GV. Integral assessment of coronary heart disease risk in the epidemiological studies (ESSE-RF in the Kemerovo Region). Communication 1: Age and sex determinants. *Russian Journal of Preventive Medicine and Public Health = Profilakticheskaya meditsina*. 2015;18(6):34-39. (In Russ.).] <https://doi.org/10.17116/profmed201518634-39>
 10. Glinicki P, Jeske W, Bednarek-Papierska L, Kruszyńska A, Gietka-Czemel M, Rosłowska E, Słowińska-Srzednicka J, Kasperlik-Zaluska A, Zgliczyński W. The ratios of aldosterone / plasma renin activity (ARR) versus aldosterone / direct renin concentration (ADRR). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015;16(4):1298-1305. <https://doi.org/10.1177/1470320313519487>

Сведения об авторах

Тхоренко Борис Александрович, лаборант-исследователь лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6); аспирант кафедры физиологии и генетики ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» (650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6).

Вклад в статью: планирование эксперимента, статистическая обработка данных, написание статьи.

ORCID: 0000-0002-5243-2599

Цепочкина Анна Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: проведение иммуноферментного анализа, участие в написании текста статьи.

ORCID: 0000-0002-4467-8732

Лавряшина Мария Борисовна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22 а).

Вклад в статью: участие в написании статьи, организация и контроль за проведением эксперимента.

ORCID: 0000-0003-1593-0676

Понасенко Анастасия Валериевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: участие в написании статьи, организация и контроль за проведением эксперимента.

ORCID: 0000-0002-3002-2863

Authors

Mr. Boris A. Tkhorenko, Research Technician, Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation); PhD Student, Department of Physiology and Genetics, Institute of Biology, Ecology, and Natural Resources, Kemerovo State University (6, Krasnaya Street, Kemerovo, 650000, Russian Federation)

Вклад в статью: conceived and designed the study; performed the statistical analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-5243-2599

Ms. Anna V. Tsepokina, Junior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

Вклад в статью: performed the experiments; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-4467-8732

Prof. Maria B. Lavryashina, DSc, Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation)

Вклад в статью: organised the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-1593-0676

Dr. Anastasia V. Ponasenko, MD, PhD, Head of the Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

Вклад в статью: organised the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-3002-2863

Статья поступила: 21.05.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 21.05.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-50-58>

АНАЛИЗ ВНУТРЕННЕГО ПУТИ АПОПТОЗА В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ

МАРКОВА В.Е.* , ШИШКОВА Д.К., КУТИХИН А.Г.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Резюме

Цель. Изучить внутренний путь апоптоза в первичных артериальных эндотелиальных клетках в результате их экспозиции кальций-фосфатным бионам (КФБ).

Материалы и методы. Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека были экспонированы сферическим и игольчатым КФБ в течение 4 часов с последующим выделением общего белка и фракционированием органелл с разделением митохондриального и цитозольного белка. При помощи иммуноблоттинга определяли уровень митохондриального маркера потенциал-зависимого анионоселективного канала 1, цитозольного маркера глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и белков внутреннего пути апоптоза цитохрома с, HtrA2/Omi в митохондриях и цитозоле, а также уровень общей и активной каспазы-9 и каспазы-3 в общем белке, собранном с вышеуказанных культур эндотелиальных клеток в трех независимых экспериментах.

Результаты. Воздействие КФБ не всегда сопровождалось транслокацией данных белков из митохондрий в цитозоль. В зависимости от формы КФБ образцы выделенного из первичных артериальных эндотелиальных клеток белка различались как по спектру, так и по содержанию специфических белков. Лишь один эксперимент из трех показал стойкое повышение уровня активной каспазы-9 и каспазы-3 в экспонированных КФБ клетках в сравнении с контрольной группой (ФСБ), в то

время как в остальных каспазы либо детектировались нестабильно, либо уровень активных каспаз не различался между контрольной и опытными группами. Уровни общей и активной каспазы-9 и каспазы-3 характеризовались конкордантностью, что свидетельствует о прямой корреляции между данными апоптотическими ферментами.

Заключение. Представленные результаты показали неоднозначность механизмов эндотелиотоксического действия КФБ и необходимость дальнейшей расшифровки путей клеточной гибели под воздействием сферических КФБ и игольчатых КФБ, а также необходимость совершенствования методики оценки молекулярных путей клеточной гибели под воздействием КФБ.

Ключевые слова: кальций-фосфатные бионы, фосфат кальция, гидроксипатит, эндотелиальные клетки, апоптоз, каспазы.

Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Для цитирования:

Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г. Анализ внутреннего пути апоптоза в эндотелиальных клетках под воздействием кальций-фосфатных бионов. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3):50-58. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-50-58>

*Корреспонденцию адресовать:

Маркова Виктория Евгеньевна, 650002, Россия, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6, e-mail: markve@kemcardio.ru

© Маркова В.Е. и др.

ORIGINAL RESEARCH

ANALYSIS OF INTRINSIC APOPTOSIS IN ENDOTHELIAL CELLS EXPOSED TO CALCIUM PHOSPHATE BIONS

VICTORIA E. MARKOVA**, DARIA K. SHISHKOVA, ANTON G. KUTIKHIN

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract

Aim. To study intrinsic apoptosis in primary arterial endothelial cells treated with calcium phosphate bions (CPB).

Materials and Methods. Primary human coronary artery endothelial cells were exposed to spherical or needle-shaped CPB during 4 hours with the subsequent extraction of total protein and subcellular fractionation to separate mitochondrial and cytosolic protein. We then performed Western blotting to measure the relative levels of a mitochondrial marker porin, cytosolic marker glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and intrinsic apoptosis proteins cytochrome c and HtrA2/Omi in mitochondria and cytosol in addition to the levels of total and cleaved caspases-9 and caspases-3 in the total protein collected from three independent experiments.

Results. Translocation of cytochrome c and HtrA2/Omi was not a mandatory consequence of CPB exposure. Relative levels of the measured proteins differed according to the particle shape. Out of three experiments, only one showed a significant increase in cleaved caspase-9 and caspase-3 in CPB-treated as compared with the mock-treated

cells. In other experiments, cleaved caspases did not show a consistent elevation. The levels of total and cleaved caspase-9 and caspases-3 were concordant testifying to the direct correlation between them.

Conclusion. As mechanisms of CPB-induced endothelial toxicity are poorly defined, they require further investigation employing optimised methods.

Keywords: calcium phosphate bions, calcium phosphate, hydroxyapatite, endothelial cells, apoptosis, caspases.

Conflict of Interest

None declared

Funding

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

◀ English

For citation:

Victoria E. Markova, Daria K. Shishkova, Anton G. Kutikhin. Analysis of intrinsic apoptosis in endothelial cells exposed to calcium phosphate bions. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3):50-58. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-50-58>

****Corresponding author:**

Victoria E. Markova, 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, Russian Federation, 650002, e-mail: markve@kemcardio.ru
©Victoria E. Markova et al.

Введение

Кальций-фосфатные бионы (КФБ) являются минерало-органическими наночастицами, состоящими из гидроксиапатита, карбонат-гидроксиапатита и кислых белков сыворотки крови, в том числе альбумина и фетуина-А [1]. Снижение уровня альбумина в крови приводит к увеличению концентрации ионизированного кальция (Ca^{2+}), что, в свою очередь, стимулирует формирование КФБ в организме человека.

Биологический смысл образования КФБ в крови заключается в поддержании фосфорно-кальциевого гомеостаза, поскольку данные частицы наряду с кальций-протеиновыми мономерами являются одним из основных депо избыточного кальция и фосфора в системном кровотоке [2]. КФБ собственно абсорбируют ионы кальция (Ca^{2+}) и фосфат-анионы (PO_4^{3-}), предотвращая пассивную внескелетную кальцификацию, и далее выводят из кровотока после интернали-

зации эндотелиальными клетками крупных артерий и микроциркуляторного русла внутренних органов, в особенности печени и селезенки [3, 4]. В то же время, препятствуя развитию эктопической минерализации, КФБ вызывают дисфункцию эндотелия, стимулируя выделение провоспалительных цитокинов и экспрессию молекул клеточной адгезии на поверхности эндотелиальных клеток [5, 6]. В конечном счете дисфункция эндотелия приводит к миграции моноцитов в интиму и их последующей дифференцировке в макрофаги, а также к нарушению паракринных взаимодействий между эндотелиальными и сосудистыми гладкомышечными клетками [7].

При формировании КФБ претерпевают некоторые физико-химические изменения. Из изначально аморфной структуры происходит переход в кристаллическую, таким образом, из сферических КФБ (СКФБ) образуются игольчатые КФБ (ИКФБ). Есть предположение, что умеренное перенасыщение крови кальцием и фосфатами приводит к образованию СКФБ, в то время как тяжелое перенасыщение сопоставимо с появлением ИКФБ [8]. Форма КФБ, как и наночастиц гидроксиапатита, во многом определяет их токсичность – ИКФБ вызывают гибель большей доли клеток в культуре в сравнении с СКФБ [9–11]. На молекулярном уровне сферические и игольчатые КФБ имеют различное патогенное воздействие на эндотелиальные клетки. В частности, СКФБ усиливают выделение клетками эндотелия интерлейкина-1 β , а ИКФБ – фактора некроза опухоли- α , что может указывать на активацию СКФБ инфламматорного пути вследствие первичного повреждения лизосом [4].

Известно множество путей клеточной гибели. Лизосомально-опосредованный путь связан с повышением проницаемости мембран лизосом и высвобождением нарушающих гомеостаз в цитозоле и на внешней мембране митохондрий катепсинов (лизосомальных цистеиновых, аспартатных или сериновых протеаз); кроме того, при растворении фосфата кальция это ведет к высвобождению Ca^{2+} , что также приводит к повышению проницаемости внешней мембраны митохондрий вследствие массивного перехода Ca^{2+} из цитозоля в митохондрии [12–15]. Внутренний путь апоптоза, в свою очередь, опосредован повышением проницаемости внешней мембраны митохондрий и запуском каскада реакций, в конечном итоге связанным с

активацией каспаз (цистеин-зависимые аспартат-специфичные протеазы) [12]. Данный путь клеточной гибели связан с выделением в цитозоль из межмембранного пространства митохондрий про-апоптотических белков цитохрома C, HtrA2/Omi и SMAC/DIABLO [12]. Связываясь с активирующим фактором апоптотических протеаз (APAF-1), цитохром с запускает его гептамеризацию в результате гидролиза и замещения дАТФ [16–18]. Это приводит к формированию апоптосомного комплекса, который связывает и рассекает прокаспазу-9, таким образом активируя ключевую каспазу внутреннего пути апоптоза [18–20]. Связываясь с прокаспазой-3, инициирующая каспаза-9 в конечном итоге, активирует эффекторную каспазу-3 [21–23], что ведет к формированию молекулярной петли положительной обратной связи между каспазой-3 и каспазой-9, усиливающей активацию обеих данных молекул [24]. Одновременно с этим HtrA2/Omi и SMAC/DIABLO связываются с X-связанным ингибитором апоптоза (XIAP), инактивируя его и высвобождая каспазу-9 и каспазу-3 [25–30]. Каспаза-3 далее способствует фрагментации ДНК, инактивируя альфа-субъединицу фактора фрагментации ДНК (DFFA) и таким образом высвобождая бета-субъединицу данного белка (каспаза-активируемую ДНКазу) [31–33]. Фрагментация ДНК, в свою очередь, ведет к p53-опосредованной клеточной гибели [33].

В то время как лизосомально-опосредованный путь клеточной гибели эндотелиальных клеток при воздействии КФБ был изучен нами ранее, реализация внутреннего пути апоптоза в этом патогенетическом сценарии остается неясной. В связи с этим целью данного исследования стало детальное изучение внутреннего пути апоптоза в первичных артериальных эндотелиальных клетках в результате их экспозиции КФБ.

Цель исследования

Изучить внутренний путь апоптоза в первичных артериальных эндотелиальных клетках в результате их экспозиции кальций-фосфатным бионам (КФБ).

Материалы и методы

Искусственный синтез бионов

СКФБ были синтезированы путем последовательного добавления 9,9 мкл 0,5M CaCl_2 (Sigma-Aldrich, 21115) и 21,5 мкл 0,2M

Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, 94046) в 1320 мкл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM, Gibco, 41966029), содержащей 150 мкл (10% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, 10500056). Игольчатые КФБ (ИКФБ) были синтезированы при помощи последовательного добавления 16,5 мкл CaCl_2 (0,5 моль/л, Sigma-Aldrich, 21115) и 37,5 мкл Na_2HPO_4 (0,2 моль/л, Sigma-Aldrich, 94046) в 936 мкл среды DMEM, содержащей 10 мкл (1% от общего объема) фетальной телячьей сыворотки (Gibco, 10500056). Для синтеза СКФБ содержание солей в среде после их добавления составляло 3 ммоль/л, для синтеза ИКФБ – 7,5 ммоль/л. Контроль pH осуществлялся путем предварительного добавления 5 мл N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфонокислоты (Gibco, 15630056) к 495 мл культуральной среды DMEM (финальная концентрация в среде – 1%). В целом искусственный синтез бионов соответствовал ранее разработанному оригинальным протоколам [34, 35].

После кратковременного перемешивания на вортексе пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf) с реагентами для синтеза бионов были инкубированы при +37°C, 5% CO_2 и высокой влажности (МСО-18AIC, Sanyo) в течение 24 часов с дальнейшим центрифугированием при 200,000 x g и +4°C в течение 1 часа (Optima MAX-XP, Beckman Coulter) для осаждения бионов всего спектра размерности. С целью получения рабочего раствора осадок СКФБ растворялся в 1000 мкл, а осадок ИКФБ – в 1500 мкл однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7,4, Gibco, 10010023), что позволяло достичь мутности суспензии в 0,5 стандарта МакФарланда (МкФ), являющейся минимально измеримой величиной концентрации бионов в растворе.

Все вышеуказанные процедуры проводили в стерильных условиях. Измерение оптической плотности проводили на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» (АИФР-01, Пикон) на длине волны 650 нм (ОП650, мутность суспензии 0,5 МкФ соответствовала значениям ОП650 = 0,08 – 0,10).

Культивирование эндотелиальных клеток

Для экспериментов были использованы коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (HCAEC, Cell Applications, 300K-05a). Согласно информации поставщика, первичные эндотелиальные клетки человека были получены из здоровых артерий доноров с криоконсервацией на

2-м пассаже (500,000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications, 212K-500), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида. Для проведения эксперимента клетки размораживали и культивировали в культуральных флаконах T-75 (Techno Plastic Products, 90076) согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, 212-500). Пересев производили по достижении 80% конфлюэнтности. На 6-м пассаже клетки рассевали в 96-луночные культуральные планшеты (Techno Plastic Products, 92696) для проведения дальнейших экспериментов. Все эксперименты с клетками проводили в стерильных условиях при 37°C, 5% CO_2 и высокой влажности.

Фракционирование органелл и выделение белка

Белки, регулирующие клеточную гибель, находятся в различных клеточных органеллах. В связи с этим было решено провести фракционирование органелл с целью выделения обогащенных фракций белков. После культивирования первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии до 85–90% они были собраны с культурального флакона путем обработки трипсином в течение 5 минут и центрифугирования в смеси трипсина с нейтрализующим раствором (Cell Applications, 090K, соотношение 1:4) при 220 x g в течение 5 минут. Следующим этапом было проведение собственно фракционирования клеточных органелл (митохондрии, ядро, цитозоль) и выделение из них белка с помощью специального набора компании Abcam (ab109719) в соответствии с инструкцией производителя.

Параллельно проводился эксперимент по выделению общей белковой фракции. После экспозиции культивированных до 85–90% конфлюэнтности первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерии в течение 4 часов, было произведено выделение белка RIPA-буфером (Thermo Scientific, 89901) с ингибиторами протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific, 78444) в соответствии с инструкцией производителя (500 мкл RIPA-буфера на флакон, лизис клеток в течение 5 минут на льду, сбор лизата, центрифугирование при 14 000 x g в течение 15 минут при 4°C). Для первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии эксперимент ставился дважды в целях повышения его воспроизводимости.

Измерение белка во всех полученных образцах проводилось при помощи набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225) в соответствии с инструкцией производителя на спектрофотометре (Multiskan Sky, Thermo Scientific) и длине волны 562 нм. Принцип действия указанного набора основан на восстановлении Cu^{2+} до Cu^+ белками в щелочной среде с последующей колориметрической детекцией Cu^+ биксинхоинозой кислотой (BCA). Белок замораживали и хранили при -60°C . Далее белок замораживали и хранили при -60°C .

Иммуноблоттинг

Одинаковые количества белка (10 мкг для митохондриальной и цитозольной фракций и 21 мкг для общей белковой фракции) смешивали с буфером для денатурации белка NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen, NP0007) в отношении 4:1 и восстановителем NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen, NP0009) в отношении 10:1 и загружали на 10-луночный гель NuPAGE 4-12% Bis-Tris толщиной 1,5 мм (Invitrogen, NP0335). В качестве маркеров молекулярных масс загружали смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen, LC5800) и MagicMark XP Western Protein Standard (Invitrogen, LC5602) в соотношении 1:1 (5:5 мкл). Разделение белков проводили электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в буфере NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen, NP000202) при 150 В в течение 1 часа. Перенос белка осуществляли при помощи наборов для сухого переноса, содержащих мембрану из поливинилиденфторида (Invitrogen, IB24001), и прибора для сухого переноса iBlot 2 (Invitrogen) в соответствии со стандартным протоколом производителя (P0, 7 минут). Блокировку неспецифического связывания осуществляли при помощи набора iBind Flex Solution Kit (Invitrogen, SLF2020) в течение 1 часа.

Иммуноблоттинг проводили с первичными антителами к цитохрому с (Abcam, ab133504, разведение 1:500), потенциал-зависимому анионоселективному каналу 1 (VDAC1, Abcam, ab235143, разведение 1:500), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH, Abcam, ab139416, разведение 1:250), HtrA2/Omi (Abcam, ab75982, разведение 1:200), каспазе-9 (Abcam, ab202068, разведение 1:500), каспазе-3 (Abcam, ab208161, разведение 1:500) и вторичными конъюгированными с пероксидазой хрена антителами (Cell Signaling Technology, 7074,

разведение 1:200; Sigma-Aldrich, AP130P, разведение 1:1000).

Инкубацию с антителами проводили с использованием набора iBind Flex Solution Kit, карточек для инкубации мембран с антителами iBind Flex Cards (Invitrogen, SLF2010) и прибора для инкубации мембран с антителами iBind Flex Western Device (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Хемилюминесцентную детекцию осуществляли посредством инкубации мембраны в течение 30 секунд в хемилюминесцентном субстрате SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific, 34580) с последующим 12-минутным сканированием на цифровом сканере хемилюминесцентных блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences). Денситометрию результатов иммуноблоттинга проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного фракционирования органелл были успешно выделены митохондриальная (образцы ФСБ-МХ, СКФБ-МХ, ИКФБ-МХ) и цитозольная (образцы ФСБ-ЦТ, СКФБ-ЦТ, ИКФБ-ЦТ) фракции белка, что было подтверждено положительными результатами иммуноблоттинга разделенных фракций на специфичный белок внешней мембраны митохондрий потенциал-зависимый анионоселективный канал 1 (VDAC1, также называемый порин) и специфичный фермент гликолиза (анаэробного окисления в цитозоли) глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH, **рисунок 1**). В общей белковой фракции логично наблюдали наличие обоих этих белков (**рисунок 1**).

Результаты, полученные в эксперименте (**рисунок 1**), продемонстрировали различное содержание изученных маркеров внутреннего пути апоптоза в исследованных образцах. В зависимости от формы КФБ образцы выделенного из первичных артериальных эндотелиальных клеток белка различались как по спектру, так и по содержанию специфических белков. Независимо от экспериментальной группы во всех образцах наблюдали присутствие цитохрома с и HtrA2/Omi в митохондриях, что соответствует физиологической норме (**рисунок 1**). При этом воздействие СКФБ и ИКФБ не всегда сопровождалось транслокацией данных белков из митохондрий в цитозоль (**рисунок 1**), что требует дальнейшего изучения данного вопроса.

С этой целью было проведено три независимых эксперимента для анализа уровня ини-

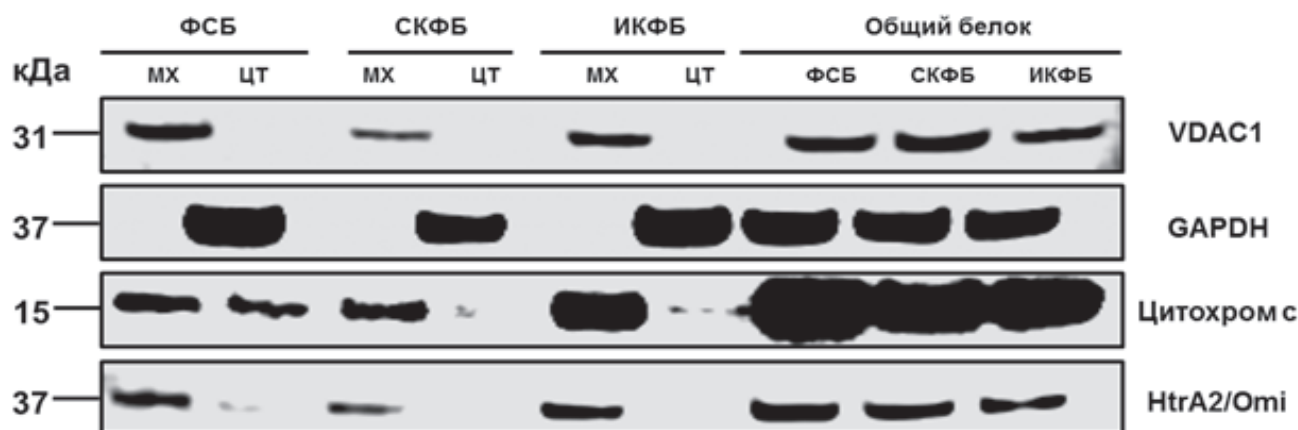


Рисунок 1.

Определение уровня специфических белков в митохондриальной, цитозольной и общей фракциях белка, выделенного из первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии после воздействия СКФБ и ИКФБ, при помощи иммуноблоттинга. ФСБ – фосфатно-солевой буфер (контрольная группа); СКФБ – сферические кальций-фосфатные бионы; ИКФБ – игольчатые кальций-фосфатные бионы, МХ – митохондрии, ЦТ – цитозоль, VDAC1 – потенциал-зависимый анионоселективный канал 1, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Слева указана молекулярная масса исследованных белков (в кДа).

Figure 1.

Western blotting measurements of the mitochondrial and cytosolic markers and intrinsic apoptosis proteins after the subcellular fractionation of mock- and CPB-treated cells. PBS – phosphate-buffered saline (control group), CPB-S – spherical calcium phosphate bions, CPB-N – needle-shaped calcium phosphate bions, МХ – mitochondria, ЦТ – cytosol, VDAC1 – voltage-dependent anion-selective channel 1, GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Molecular weight of the mentioned proteins is indicated to the left.

цирующей каспазы внутреннего пути апоптоза (каспаза-9) и эффекторной апоптотической каспазы (каспаза-3) в общей и активной формах. Лишь один эксперимент из трех (с первичными эндотелиальными клетками коронарной артерии) показал стойкое повышение уровня активной каспазы-9 и каспазы-3 в экспонированных СКФБ клетках в сравнении с контрольной группой (ФСБ), в то вре-

мя как в остальных каспазы либо детектировались нестабильно, либо уровень активных каспаз не различался между контрольной и опытными группами (рисунок 2). Стоит отметить, что уровни общей и активной каспазы-9 и каспазы-3 характеризовались конкордантностью, что свидетельствует о прямой корреляции между данными апоптотическими ферментами.

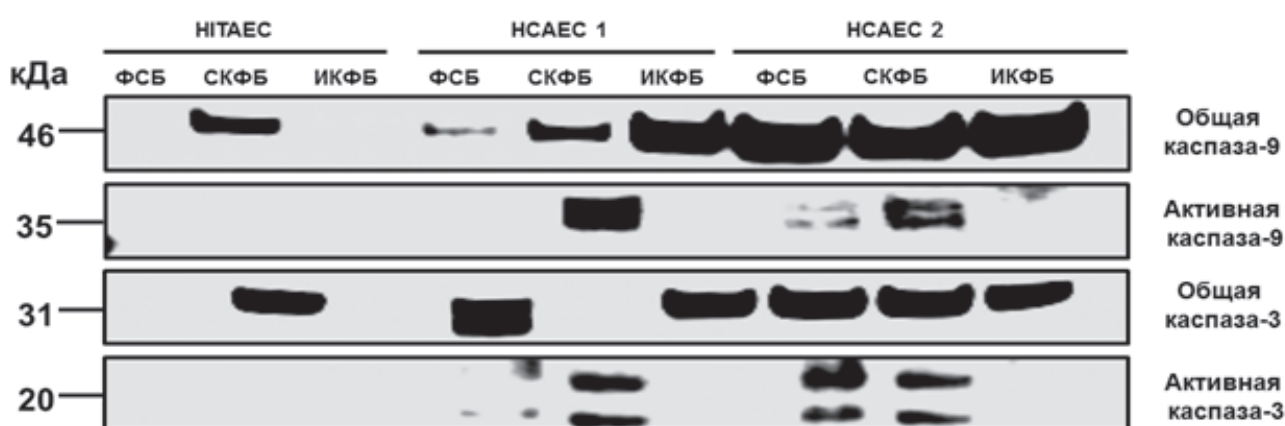


Рисунок 2.

Определение уровня иницирующей каспазы внутреннего пути апоптоза (каспаза-9) и регулируемой ей эффекторной каспазы (каспаза-3) в общей фракции белка, выделенного из первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной или коронарной артерии после воздействия СКФБ и ИКФБ, при помощи иммуноблоттинга. ФСБ – фосфатно-солевой буфер (контрольная группа); СКФБ – сферические кальций-фосфатные бионы; ИКФБ – игольчатые кальций-фосфатные бионы. Слева указана молекулярная масса исследованных белков (в кДа).

Figure 2.

Western blotting measurements of the initiator caspase of intrinsic apoptosis (caspase-9) and its downstream effector caspase (caspase-3) in the total protein extracted from primary human coronary artery and internal thoracic artery endothelial cells optionally treated with CPB. PBS – phosphate-buffered saline (control group), CPB-S – spherical calcium phosphate bions, CPB-N – needle-shaped calcium phosphate bions. Molecular weight of the mentioned proteins is indicated to the left.

Представленные результаты показали неоднозначность механизмов эндотелиотоксического действия КФБ и необходимость дальнейшей расшифровки путей клеточной гибели под воздействием СКФБ и ИКФБ. В частности, экспозиция первичных артериальных эндотелиальных клеток КФБ, хотя и стабильно сопровождается гибелью значительной их части [1, 9, 15] и выделением провоспалительных цитокинов [6], не всегда сопровождается транслокацией цитохрома с и HtrA2/Omi из митохондрий в цитозоль, при этом также не происходит повышения уровня активной каспазы-9 и каспазы-3.

В то же время повышение количества активной каспазы-9 в обязательном порядке сопровождалось увеличением уровня активной каспазы-3, что согласуется с данными литературы [21-23]. В целом эксперименты в этом отношении демонстрируют довольно разнонаправленные результаты, что может свидетельствовать о необходимости совершенствования методики оценки молекулярных путей клеточной гибели под воздействием КФБ, к примеру, введения в протокол обязательного центрифугирования культуральной жидкости для сбора открепившихся от пластика в результате гибели клеток.

Литература / References:

1. Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, Glushkova TV, Borisov VV, Matveeva VG, Antonova LV, Filip'ev DE, Golovkin AS, Shishkova DK, Burago AY, Frolov AV, Dolgov VY, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VY, Vladimirov AA, Sozinov SA, Ismagilov ZR, Russakov DM, Lomzov AA, Pyshnyi DV, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YA, Demidov EA, Peltek SE, Dolganyuk VF, Babich OO, Grigoriev EV, Brusina EB, Barbarash OL, Yuzhalin AE. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep*. 2016;6:27255. <https://doi.org/10.1038/srep27255>
2. Smith ER, Hewitson TD, Jahnen-Dechent W. Calciprotein particles: mineral behaving badly? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2020;29(4):378-386. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000609>
3. Herrmann M, Schäfer C, Heiss A, Gräber S, Kinkeldey A, Büscher A, Schmitt MM, Bornemann J, Nimmerjahn F, Herrmann M, Helming L, Gordon S, Jahnen-Dechent W. Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ Res*. 2012;111(5):575-584. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261479>
4. Köppert S, Büscher A, Babler A, Ghallab A, Buhl EM, Latz E, Hengstler JG, Smith ER, Jahnen-Dechent W. Cellular Clearance and Biological Activity of Calciprotein Particles Depend on Their Maturation State and Crystallinity. *Front Immunol*. 2018;9:1991. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01991>
5. Peng HH, Wu CY, Young D, Martel J, Young A, Ojcius DM, Lee YH, Young JD. Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids. *Small*. 2013;9(13):2297-2307. <https://doi.org/10.1002/sml.201202270>
6. Шишкова Д.К., Синицкий М.Ю., Великанова Е.А., Кутихин А.Г. Кальций-фосфатные бионы индуцируют секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 артериальными эндотелиальными клетками in vitro. *Цитокины и воспаление*. 2018;17(1-4):80 [Shishkova DK, Sinitsky MYu, Velikanova EA, Kutikhin AG. Calcium phosphate bions induce secretion of pro-inflammatory cytokines interleukin-6 and interleukin-8 by arterial endothelial cells in vitro. *Cytokines and Inflammation*. 2018;17(1-4):80. (In Russ.)]
7. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium- Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>
8. Young JD, Martel J, Young D, Young A, Hung CM, Young L, Chao YJ, Young J, Wu CY. Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria. *PLoS One*. 2009;4(5):e5421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005421>
9. Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Шишкова Д.К., Матвеева В.Г., Григорьев Е.В., Барбараш О.Л. Форма кальций-фосфатных бионов определяет их токсичность для культур эндотелиальных клеток человека. *Кардиологический вестник*. 2019;XIV(4):34-41 [Kutikhin AG, Velikanova EA, Shishkova DK, Matveeva VG, Grigoriev EV, Barbarash OL. Shape of calcium phosphate bions dictates their toxicity for human venous and arterial endothelial cells. *Cardiology Bulletin*. 2019;XIV(4):34-41. (In Russ.)] <https://doi.org/10.36396/MS.2019.15.4.004>
10. Lebre F, Sridharan R, Sawkins MJ, Kelly DJ, O'Brien F, Lavelle EC. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. *Sci Rep*. 2017;7(1):2922. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03086-0>
11. Sukhanova A, Bozrova SV, Sokolov PY, Berestovoy MA, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(1):44. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>
12. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Mar-

- tin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vossen KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25:486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
13. Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, Stoka V, Turk V, Turk B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem.* 2008;283(27):19140-19150. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802513200>
 14. Bidère N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31401-31411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301911200>
 15. Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Мухамадияров Р.А., Южалин А.Е., Кудрявцева Ю.А., Попова А.Н., Руссаков Д.М., Кутихин А.Г. Изучение механизма специфичной эндотелиотоксичности кальций-фосфатных бионов. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019;39(4):12-21 [Shishkova DK, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, Yuzhalin AE, Kudryavtseva YuA, Popova AN, Russakov DM, Kutikhin AG. Lysosome-dependent cell death defines specific endothelial toxicity of calcium phosphate bions. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal.* 2019;39(4):12-21. (In Russ.).] <https://doi.org/10.15372/SSMJ20190402>
 16. Kim HE, Du F, Fang M, Wang X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(49):17545-17550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507900102>
 17. Reubold TF, Eschenburg S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cell Signal.* 2012;24(7):1420-1425. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.03.007>
 18. Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure.* 2013;21(4):501-515. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
 19. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11549-11556. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11549>
 20. Li Y, Zhou M, Hu Q, Bai XC, Huang W, Scheres SH, Shi Y. Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(7):1542-1547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620626114>
 21. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* 2004;13(8):1979-1987. <https://doi.org/10.1110/ps.04789804>
 22. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2665-2672. <https://doi.org/10.1172/JCI26252>
 23. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-489. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80434-1)
 24. Fujita E, Egashira J, Urase K, Kuida K, Momoi T. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell Death Differ.* 2001;8(4):335-344. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400824>
 25. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.* 2001;20(5):998-1009. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.998>
 26. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell.* 2003;11(2):519-527. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00054-6)
 27. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;408(6815):1008-1012. <https://doi.org/10.1038/35050012>
 28. Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM, Jiang X. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem.* 2007;282(42):30718-30727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705258200>
 29. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem.* 2002;277(1):439-444. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109784200>
 30. Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):453-460. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402291>
 31. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391(6662):43-50. <https://doi.org/10.1038/34112>
 32. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998;391(6662):96-99. <https://doi.org/10.1038/34214>
 33. Larsen BD, Sørensen CS. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS J.* 2017;284(8):1160-1170. <https://doi.org/10.1111/febs.13970>
 34. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гутаковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Севостьянов О.Г., Долганюк В.Ф., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Морфологическая и химическая характеристика магний-фосфатных и кальций-фосфатных бионов. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2019;4(2):6-16 [Shishkova DK, Glushkova TV, Efimova OS, Popova AN, Malysheva VYu, Kolmykov RP, Ismagilov ZR, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YuA, Kozhukhov AS, Sevostyanov OG, Dolganyuk VF, Kudryavtseva YuA, Kutikhin AG. Morphological and chemical characterization of magnesium phosphate and calcium phosphate bions. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2019;4(2):6-16. (In Russ.).] <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-2-6-16>
 35. Шишкова Д.К., Глушкова Т.В., Ефимова О.С., Попова А.Н., Малышева В.Ю., Колмыков Р.П., Исмагилов З.Р., Гу-

таковский А.К., Живодков Ю.А., Кожухов А.С., Долганюк В.Ф., Барбараш О.Л., Кутихин А.Г. Сравнение морфологических и химических свойств сферических и игольчатых кальций-фосфатных бионов. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2019;8(1):59-69 [Shishkova DK, Glushkova TV, Efimova OS, Popova AN, Malysheva

VYu, Kolmykov RP, Ismagilov ZR, Gutakovskiy AK, Zhivodkov YuA, Kozhukhov AS, Dolganyuk VF, Barbarash OL, Kutikhin AG. Morphological and chemical properties of spherical and needle calcium phosphate bions. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy*. 2019;8(1):59-69 2019. (In Russ.).] <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2019-8-1-59-69>

Сведения об авторах

Маркова Виктория Евгеньевна, лаборант-исследователь лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).
Вклад в статью: проведение экспериментов, написание статьи.
ORCID: 0000-0002-6652-5745

Шишкова Дарья Кирилловна, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).
Вклад в статью: проведение экспериментов.
ORCID: 0000-0002-1518-3888

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).
Вклад в статью: разработка идеи и дизайна исследования, проведение экспериментов, написание статьи.
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Статья поступила: 06.08.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Ms. Victoria E. Markova, Research Technician, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).
Contribution: performed the experiments; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0002-6652-5745

Ms. Daria K. Shishkova, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).
Contribution: performed the experiments.
ORCID: 0000-0002-1518-3888

Dr. Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).
Contribution: conceived and designed the study; performed the experiments; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Received: 06.08.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-59-65>

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА *UGT1A1*, АССОЦИИРОВАННОЙ СО СНИЖЕННОЙ ФУНКЦИЕЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ УДФ- ГЛЮКУРОНИЛТРАНСФЕРАЗЫ A1

ВОЛКОВ А.Н. *

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

Резюме

Цель. Определение частоты аллельных и генотипических вариантов полиморфного маркера *rs8175347* гена *UGT1A1* в выборке жителей Кемеровской области.

Материалы и методы. Проведено популяционно-генетическое исследование мутации гена *UGT1A1*, снижающей активность УДФ-глюкуронилтрансферазы A1. Группа обследованных включала жителей Кемеровской области русской национальности (64 мужчины и 68 женщин). Для генотипирования маркера *rs8175347* использовались образцы ДНК, полученной из цельной периферической крови обследованных. Проводилась аллель-специфическая амплификация изучаемого участка с последующим электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов. Определялись частоты аллельных и генотипических вариантов *rs8175347*.

Результаты. Частота минорного аллеля *28 маркера *rs8175347*, ассоциированного со сниженной функцией печеночного фермента UGT1A1, в изучаемой выборке составила 33,3%,

а гомозиготного генотипа *28/*28 – 13,6%. Частота генотипа *28/*28 достоверно не отличалась у обследованных мужчин и женщин.

Заключение. Установленная частота генотипа *28/*28 гена *UGT1A1* в изученной выборке позволяет предположить высокую распространенность среди населения физиологических отклонений, ассоциированных с мутацией данного гена. По-видимому, более 10% представителей рассматриваемой популяции имеют сниженную активность UGT1A1 и в различных условиях могут демонстрировать симптомокомплекс синдрома Жильбера, нежелательные лекарственные реакции в ходе фармакотерапии.

Ключевые слова: *UGT1A1*, *rs8175347*, УДФ-глюкуронилтрансфераза A1, молекулярно-генетическая диагностика.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования

Исследование не имело финансовой поддержки.

Для цитирования:

Волков А.Н. Популяционно-генетическое исследование мутации гена *UGT1A1*, ассоциированной со сниженной функцией печеночной УДФ-глюкуронилтрансферазы A1. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3):59-65. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-59-65>

*Корреспонденцию адресовать:

Волков Алексей Николаевич, 650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а, E-mail: volkov_alex@rambler.ru
© Волков А.Н.

ORIGINAL RESEARCH

POPULATION GENETIC RESEARCH OF THE MUTATION IN UGT1A1 GENE ASSOCIATED WITH REDUCED ACTIVITY OF LIVER UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE A1

ALEXEY N. VOLKOV **

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

English ►

Abstract

Aim. To explore allele and genotype frequencies of the *rs8175347* polymorphism within the *UGT1A1* gene in Kemerovo Region.

Materials and Methods. The study sample included 64 male and 68 female inhabitants of the Kemerovo Region. Upon DNA isolation from the peripheral blood leukocytes, we conducted allele-specific polymerase chain reaction followed by electrophoretic detection of the genotype.

Results. The frequency of minor allele *28 of *rs8175347* polymorphism, which is associated with the downregulation of UDP-glucuronosyltransferase A1 in the liver, was 33.3%, while the

frequency of *28/*28 genotype was 13.6% and did not significantly differ in the examined men and women.

Conclusion. High frequency of the *28/*28 genotype in the studied sample suggests a high prevalence of reduced UDP-glucuronosyltransferase A1 activity and associated conditions including Gilbert's syndrome and adverse drug reactions.

Keywords: UGT1A1, *rs8175347*, UDP-glucuronosyltransferase A1, molecular genetic testing.

Conflict of interest

None declared.

Funding

There was no funding for this research.

For citation:

Alexey N. Volkov. Population genetic research of the mutation in *ugt1a1* gene associated with reduced activity of liver UDP-glucuronosyltransferase A1. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020;5(3):59-65. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-59-65>

****Corresponding author:**

Dr. Alexey N. Volkov, 22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation, e-mail: volkov_alex@rambler.ru

© Alexey N. Volkov

Введение

Генетическая конституция человека является своеобразным ландшафтом, на котором выстраиваются отношения между индивидуумом и окружающей средой. Во многих случаях неблагоприятные экологические воздействия могут быть компенсированы организмом при условии адекватной работы генов, кодирующих соответствующие биохимические элементы. Напротив, мутации в генах, изменяющие их активность, могут снизить резистентность и послужить предрасполагающим фактором для развития болезней. Так называемые мультифакториальные патологии для реализации, как правило, нуждаются в сочетанном влиянии неблагоприятных факторов среды и мутаций в отдельных генах. По современным представлениям большинство наиболее распространенных патологий человека развивается по данному механизму [1, 2].

Поиск информативных генетических маркеров предрасположенности к различным заболеваниям является приоритетной задачей медицинской генетики. Ценность этих исследований заключается в возможности раннего выявления рисков здоровью для отдельных индивидуумов и более эффективной профилактики патологии. С другой стороны, частота генетического маркера предрасположенности характеризует потенциальную распространенность заболевания в популяции, что позволяет составить более полную эпидемиологическую картину [3–5].

Печеночные ферменты образуют эффективную систему обезвреживания ксенобиотиков и потенциально опасных эндогенных метаболитов. Мутации в генах этих ферментов являются перспективными маркерами предрасположенности к ряду заболеваний, прежде всего, пищеварительной системы. Так, мутации в

гене *UGT1A1*, кодирующем УДФ-глюкуронил-трансферазу A1 (*UGT1A1*), могут снижать скорость связывания различных субстратов с глюкуроновой кислотой и замедлять их экскрецию из организма. Основным эндогенным субстратом *UGT1A1* является продукт естественного распада гемоглобина – билирубин. Накопление последнего в тканях приводит формированию симптомокомплекса синдрома Жильбера. Для него характерны диспептические расстройства, желтуха, общее недомогание на фоне гипербилирубинемии [6, 7].

Другим аспектом снижения активности *UGT1A1* является нарушение выведения из организма ряда лекарств, что сопровождается нежелательными побочными реакциями вплоть до токсичности и непереносимости препарата. К таким лекарствам относятся иринотекан, широко применяемый при лечении колоректального рака, белинолат, используемый для химиотерапии различных онкологических заболеваний, и другие. Согласно современным рекомендациям, дозирование данных препаратов должно осуществляться с учетом данных о наличии мутаций в *UGT1A1* [8, 9].

Учитывая сказанное, становится очевидным, что данные о распространенности мутаций в гене *UGT1A1* позволяют косвенно оценить долю населения, подверженного гипербилирубинемиям и склонным к нежелательным лекарственным реакциям при приеме препаратов, подвергающихся в организме глюкуронированию. По нашим данным, популяционно-генетические исследования *UGT1A1* среди жителей России единичны, при этом они обычно охватывают специфические контингенты обследованных, что затрудняет экстраполяцию данных на обычное население [10].

Цель исследования

Определение частоты аллельных и генотипических вариантов полиморфного маркера *rs8175347* гена *UGT1A1* у представителей русской этнической группы Кемеровской области.

Материалы и методы

На начальном этапе исследования проведен популяционно-генетический анализ полиморфизма маркера *rs8175347* в общей выборке (рисунк 1).

Группа обследованных была сформирована из жителей Кемеровской области обоих полов, относящих себя к русской национальности.

Возраст обследованных варьировал в пределах 23 – 51 год при среднем значении показателя – $36,4 \pm 0,61$. Средний возраст обследованных мужчин (64 человека) и женщин (68 человек) составил $36,5 \pm 0,96$ года и $36,3 \pm 0,77$ года соответственно. Индивидуальные значения возраста в двух гендерных группах: 23 – 51 год и 25 – 50 лет соответственно. Все участники являлись сотрудниками и пациентами различных медицинских организаций г. Кемерово. Состояние здоровья обследованных не учитывалось, что позволяет исключить селективное влияние отдельных патологий на популяционно-генетические показатели. У всех обследованных в амбулаторных условиях забирались образцы венозной крови, которые доставлялись для дальнейших манипуляций в центральную научно-исследовательскую лабораторию ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Экспресс-выделение ДНК из ранее полученных образцов проводили с использованием комплекта реагентов «ДНК-экспресс-кровь» (ООО НПФ «Литех») по методике производителя. Для генотипирования вариантов полиморфного маркера *rs8175347* осуществляли аллель-специфическую ПЦР. Визуализацию результата ПЦР выполняли в ходе электрофоретического разделения продуктов амплификации в 3% агарозном геле с бромидом этидия в качестве красителя. Выявлялись наиболее распространенные и клинически значимые аллели *UGT1A1*, связанные с полиморфизмом промоторной области гена: *1 (6 TA-повторов, нормальная активность *UGT1A1*) и *28 (7 TA-повторов, сниженная активность *UGT1A1*). Все процедуры выполнялись в строгом соответствии с методикой производителя использованных тест-систем «SNP-экспресс» (ООО НПФ «Литех») [11].

В ходе статистической обработки данных рассчитывались выборочные характеристики изучаемых групп. Определялись эмпирические частоты аллелей и генотипов маркера *rs8175347*. Ожидаемые частоты генотипов вычислялись исходя из предположения о генетическом равновесии в популяции согласно формуле $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, где p и q – эмпирические частоты мажорного и минорного аллелей. Для сопоставления распределений частот использовали метод χ

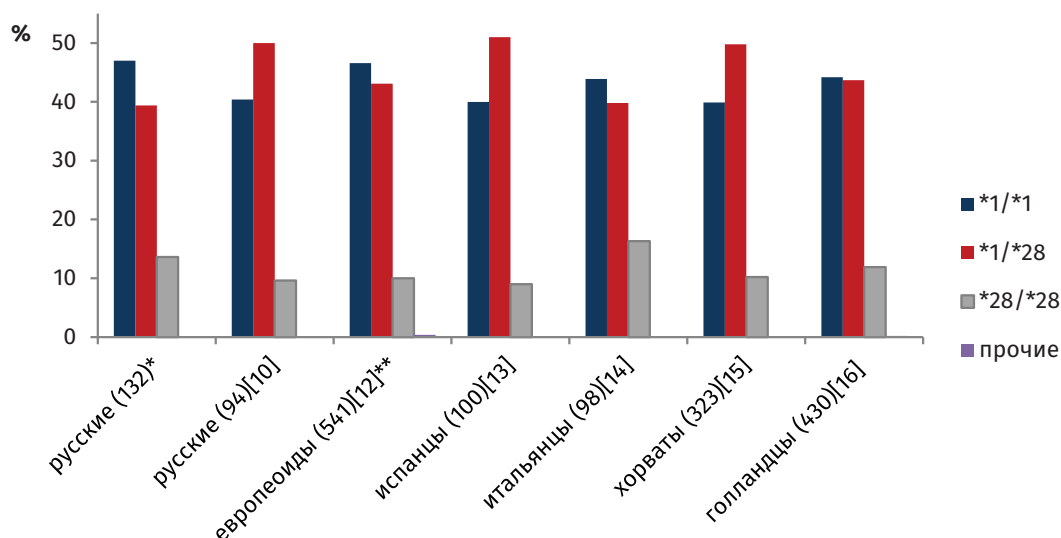
Большинство обследованных были носите-

Рисунок 1.

Генотипы *UGT1A1* в различных этнических группах.
Примечания: * - материалы данного исследования; ** - жители США, потомки европеоидов Старого Света; в круглых скобках представлены объемы выборок.

Figure 1.

UGT1A1 genotypes among various ethnicities.
*data from this study;
**USA Caucasian inhabitants. Sample sizes are represented in parentheses.



лями нормального аллеля (*1) в составе генотипов *1/*1 (47%) и *1/*28 (39,4%). Экстраполируя эти данные на популяцию жителей региона в целом, можно заключить, что, вероятно, более 85% населения имеют нормальную активность печеночной УДФ-глюкуронозилтрансферазы А1. Минорный аллель *28 встречался с частотой 33,3%. Доля гомозиготного генотипа *28/*28, ассоциированного со сниженной активностью данного фермента, достигла 13,6%. Эти лица в определенных ситуациях демонстрируют клинические признаки недостаточности *UGT1A1*. В условиях напряжения функции печени может развиваться гипербилирубинемия, а прием некоторых лекарств, подвергающихся в организме глюкуронированию, приведет к нежелательным побочным реакциям [6-9].

В изучаемой нами области гена *UGT1A1* ранее было установлено наличие редких аллелей, связанных как с увеличением активности гена (5 *TA*-повторов, аллель *36), так и снижением его активности (8 *TA*-повторов, аллель *37). В рамках выбранной нами методики генотипирования выявление этих и других минорных аллелей невозможно. В такой ситуации для проверки степени завершенности нашего исследования мы прибегли к сравнению полученных нами данных с результатами ранее проведенных популяционно-генетических исследований *UGT1A1*.

Во всех европеоидных популяциях преобладающим является аллель *1, частота аллеля *28 не достигает 37%. В такой ситуации доли генотипов *1/*1 и *1/*28 оказываются сопоставимыми. Максимальная установленная частота гомозигот *1/*1 составила 46,6% [12], а гетерозигот – 51% [13]. Частота более редкого гено-

типа *28/*28 находится в пределах 9% – 16,3% [10, 12-16]. На долю прочих генотипов приходится менее 0,5%. Для их обнаружения требуется изучение значительных по объему выборок [12, 16]. Вероятно, по этой причине многие исследователи в популяционно-генетическом анализе *rs8175347* ограничиваются поиском наиболее частых аллелей: *1 и *28.

Для популяций не европеоидного происхождения могут быть характерны специфические особенности распространения аллелей и генотипов изучаемого маркера. Так, среди населения Дальнего Востока (китайцы, японцы) частота аллеля *28 может существенно снижаться и не превышать 15%. Доля генотипа *28/*28 составляет менее 3%. При этом даже в больших по объему выборках могут не регистрироваться дополнительные аллели и генотипы *rs8175347* [17, 18]. С другой стороны, коренные этносы Африки и их потомки в других частях света характеризуются наибольшим генетическим разнообразием вариантов *UGT1A1*. Доля генотипов с участием дополнительных аллелей *rs8175347* может превышать 20%, при этом частота аллеля *28 остается высокой [12, 19].

Таким образом, сравнительный анализ разных популяционно-генетических исследований показывает, что в большинстве случаев преобладающими аллелями полиморфного маркера *rs8175347* являются *1 и *28. Выявление прочих вариантов целесообразно при изучении отдельных этнических групп не европеоидного происхождения, а также при проведении исследований обширных групп населения, что представляет скорее научный интерес. В практическом плане в рамках медико-генетических

исследований вполне достаточным является поиск аллелей *1 и *28 и ассоциированных с ними генотипов.

С биологической точки зрения важно установить, влияет ли мутантный аллель *28 гена *UGT1A1* на жизнеспособность носителя в различные периоды онтогенеза и на его репродуктивный потенциал. В случае наличия в популяции отбора, направленного против аллеля и соответствующих генотипов, следует ожидать снижения доли этих генотипов относительно равновесного соотношения. Для проверки этой гипотезы проведено сопоставление наблюдаемого и расчетного распределений генотипов *rs8175347* (рисунок 2). Сравнение двух распределений не выявило достоверных отличий ($\chi^2 = 1,69$; $p > 0,05$). Это позволяет сделать заключение о том, что, несмотря на установленный патогенный эффект аллеля *28, в целом он не обладает выраженным дезадаптивным эффектом.

На завершающем этапе был проведен анализ распределения аллелей и генотипов *rs8175347* у обследованных мужчин и женщин отдельно. Это было связано с необходимостью уточнения вопроса о наличии или отсутствии генетических предпосылок снижения функции УДФ-глюкуронилтрансферазы A1 у предста-

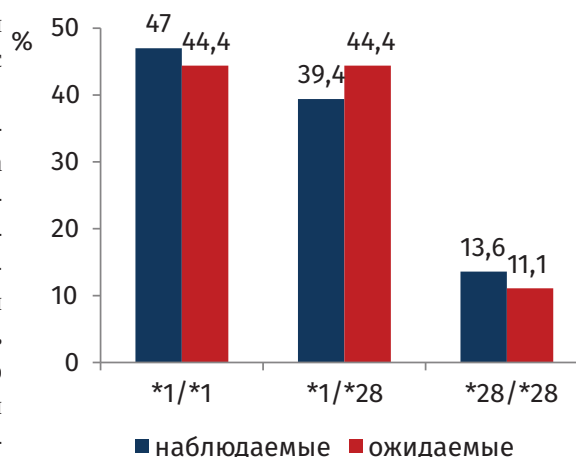


Рисунок 2.

Наблюдаемые и ожидаемые соотношения генотипов UGT1A1 в изученной выборке.

Figure 2.

Observed and expected UGT1A1 genotype frequencies in the studied sample.

вителей двух полов. По мнению некоторых исследователей, для мужского пола характерна повышенная доля лиц, страдающих синдромом Жильбера. На этом основании в отношении заболевания стал применяться термин «андротропия» [20]. При этом научный анализ возможных причин такого гендерного неравенства, по нашим данным, не проводился.

В исследованных нами гендерных группах соотношение генотипов достоверно не отличалось ($\chi^2 = 0,79$; $p > 0,05$). Доля аллеля *28 у мужчин и женщин составила 33,6% и 33,1% соответственно ($\chi^2 = 0,01$; $p > 0,05$) (таблица 1).

Этнос (объем выборки) <i>Ethnicity (sample size)</i>	Генотипы UGT1A1, % UGT1A1 genotypes, %				Доля аллеля *28, % *28 allele frequency	Источник <i>Reference</i>
	*1/*1	*1/*28	*28/*28	Прочие <i>Others</i>		
Русские <i>Russian population</i>						
Мужчины (64) <i>Males (64)</i>	48,5	35,9	15,6	н/о N/D	33,6	Собственные данные Own data
Женщины (68) <i>Females (68)</i>	45,6	42,6	11,8	н/о N/D	33,1	
Итальянцы <i>Italian population</i>						
Мужчины (53) <i>Males (53)</i>	45,2	39,6	15,1	-	34,9	[14]
Женщины (45) <i>Females (45)</i>	42,2	40,0	17,8	-	37,8	
Голландцы <i>Dutch population</i>						
Мужчины(174) <i>Males (174)</i>	43,7	43,1	13,2	-	34,8	[16]
Женщины(256) <i>Females (256)</i>	44,5	44,1	10,9	0,4	33,0	
Европеиды США <i>USA Caucasian population</i>						
Мужчины(388) <i>Males (388)</i>	49,7	39,2	11,1	-	30,7	[21]
Женщины(217) <i>Females (217)</i>	40,6	47,4	12,0	-	31,9	

Таблица 1.

Сравнительная характеристика полиморфизма UGT1A1 у европеоидных этносов с учетом половой принадлежности

Table 1.

Allele and genotype frequencies of the rs8175347 polymorphism within the UGT1A1 gene.

Примечание. н/о – не определялись

N/D – not defined

Генотип *28/*28, определяющий снижение активности UGT1A1 и выявляемый у больных синдромом Жильбера, встречался в двух группах с сопоставимой частотой, 15,6% и 11,8% соответственно. Немногочисленные ранее проведенные исследования полиморфизма *UGT1A1* у представителей двух полов подтверждают данную закономерность. Ни в одной из изученных групп европейцев встречаемость аллельных и генотипических вариантов *rs8175347* у мужчин и женщин достоверно не отличалась.

Таким образом, отсутствие уникальных популяционно-генетических особенностей изучаемого маркера у мужчин не дает генетического объяснения андротропии синдрома Жильбера. Для подтверждения этого явления и его объяснения требуются дополнительные эпидемиологические исследования с детальным изучением внешних факторов, действующих на представителей двух полов, которые могли бы спровоцировать дисфункцию печени на фоне носительства неблагоприятных генетических вариантов *UGT1A1*.

Заключение

В изученной выборке русских Кемеровской области частота минорного аллеля *28 марке-

ра *rs8175347*, ассоциированного со сниженной функцией фермента UGT1A1, составила 33,3%. Гомозиготный генотип *28/*28 встречался с частотой 13,6%. Соотношение генотипов маркера достоверно не отличалось у мужчин и женщин, что исключает генетические предпосылки к повышению частоты дисфункции печени, связанной с аномальной активностью печеночной УДФ-глюкуронилтрансферазы A1, у какого-либо из полов.

Высокая частота генотипа *28/*28 гена *UGT1A1* предполагает высокую распространенность среди населения физиологических отклонений, ассоциированных с мутацией данного гена. По-видимому, более 10% представителей рассматриваемой популяции имеют сниженную активность UGT1A1 и в различных условиях могут демонстрировать симптомокомплекс синдрома Жильбера, нежелательные лекарственные реакции в ходе фармакотерапии и пр. Масштабная генодиагностика мутаций *UGT1A1* с выявлением лиц из группы риска могла бы стать эффективным средством профилактики возможных клинических последствий неблагоприятной генетической предрасположенности.

Литература / References:

1. Plomin R, Haworth CM, Davis OS. Common disorders are quantitative traits. *Nat Rev Genet.* 2009;10(12):872-878. <https://doi.org/10.1038/nrg2670>
2. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med.* 2011;365(17):1612-1623. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1100030>
3. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, Yang J. 10 Years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *The Am J Hum Genet.* 2017;101(1):5-22. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.005>
4. Chang M, He L, Cai L. An overview of genome-wide association studies. *Methods Mol Biol.* 2018;1754:97-108. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7717-8_6
5. Волков А.Н., Цуркан Е.В. Мутация гена *UGT1A1* как маркер высокого риска возникновения синдрома Жильбера: научно-прикладные аспекты. *Анализ риска здоровью.* 2019;2:123-129 [Volkov AN, Tsurkan EV. *UGT1A1* gene mutation as a marker indicating there is a high risk of Gilbert's syndrome: theoretical and applied aspects. *Health Risk Analysis.* 2019;2:123-129. (In Russ.).] <https://doi.org/10.21668/health.risk/2019.2.14>
6. Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24(5):555-571. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.07.007>
7. Memon N, Weinberger BI, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited disorders of bilirubin clearance. *Pediatr Res.* 2016;79(3):378-386. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.247>
8. Innocenti F, Schilsky RL, Ramírez J, Janisch L, Undevia S, House LK, Das S, Wu K, Turcich M, Marsh R, Karrison T, Maitland ML, Salgia R, Ratain MJ. Dose-finding and pharmacokinetic study to optimize the dosing of irinotecan according to the UGT1A1 genotype of patients with cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(22):2328-2334. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.2307>
9. Wang LZ, Ramirez J, Yeo W, Chan MY, Thuya WL, Lau JY, Wan SC, Wong AL, Zee YK, Lim R, Lee SC, Ho PC, Lee HS, Chan A, Ansher S, Ratain MJ, Goh BC. Glucuronidation by UGT1A1 is the dominant pathway of the metabolic disposition of belinostat in liver cancer patients. *PLoS One.* 2013;8(1):e54522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054522>
10. Тимошкина Н.Н., Богомолова О.А., Жужеленко И.А., Кабанов С.Н., Калабанова Е.А., Миташок И.С., Светицкая Я.В., Водлажский Д.И. Исследование полиморфизмов генов *UGT1A1* и *DPYD* у пациентов с колоректальным раком. *Сибирский онкологический журнал.* 2018;17(6):49-56 [Timoshkina NN, Bogomolova OA, Zhuzhelenko IA, Kabanov SN, Kalabanova EA, Mitashok IS, Svetitskaya YV, Vodolazhskii DI. Study of polymorphisms of UGT1A1 and DPYD genes in chemotherapy for colorectal cancer. *Siberian Journal of Oncology.* 2018;17(6):49-56. (In Russ.).] <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2018-17-6-49-56>
11. Волков А.Н., Хабиева С.М., Смирнова Е.Ю. Генодиагностика мутаций *UGT1A1* в практике современной медицины. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018;63(3):186-192 [Volkov AN, Khabieva SM, Smirnova EYu. The gene diagnos-

- tic of mutations UGT1A1 in practice of modern medicine. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2018;63(3):186-192. (In Russ.).] <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-186-192>
12. Girard H, Butler LM, Villeneuve L, Millikan RC, Sinha R, Sandler RS, Guillemette C. UGT1A1 and UGT1A9 functional variants, meat intake, and colon cancer, among Caucasians and African Americans. *Mutat Res*. 2008;644(1-2):56-63. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.07.002>
 13. Fernández Salazara JM, Remacha Sevilla Á, del Río Conde E, Baiget Bastús M. Distribución del genotipo A(TA)7TAA asociado al síndrome de Gilbert en la población española. *Med Clin (Barc)*. 2000;115(14): 540-541.
 14. Biondi ML, Turri O, Dilillo D, Stival G, Guagnellini E. Contribution of the TATA-box genotype (Gilbert syndrome) to serum bilirubin concentrations in the Italian population. *Clin Chem*. 1999;45(6 Pt 1):897-898.
 15. Marinkovic N, Pasalic D, Grskovic B, Ferencak G, Honović L, Rukavina AS. Genotype frequencies of UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 promoter gene polymorphism in the population of healthy Croatian pre-schoolers. *Col Antropol*. 2008;32(3):725-729.
 16. Te Morsche RH, Zusterzeel PL, Raijmakers MT, Roes EM, Steegers EA, Peters WH. Polymorphism in the promoter region of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (Gilbert's syndrome) in healthy Dutch subjects. *Hepatology*. 2001;33(3):765. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.0103303le03>
 17. Zhang A, Xing Q, Qin S, Du J, Wang L, Yu L, Li X, Xu L, Xu M, Feng G, He L. Intra-ethnic differences in genetic variants of the UGT-glucuronosyltransferase 1A1 gene in Chinese populations. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(5):333-338. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500424>
 18. Sato H, Uchida T, Toyota K, Kanno M, Hashimoto T, Watanabe M, Nakamura T, Tamiya G, Aoki K, Hayasaka K. Association of breast-fed neonatal hyperbilirubinemia with UGT1A1 polymorphisms: 211G4A (G71R) mutation becomes a risk factor under inadequate feeding. *J Hum Genet*. 2013;58(1):7-10. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.116>
 19. Huo D, Kim HJ, Adebamowo CA, Ogundiran TO, Akang EE, Campbell O, Adenipekun A, Niu Q, Sveen L, Fackenthal JD, Fackenthal DL, Das S, Cox N, Di Rienzo A, Olopade OI. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and breast cancer risk in Africans. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;110(2):367-376. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9720-7>
 20. Делягин В.М., Уразбагамбетов А.У. Медицинское сопровождение пациентов с семейными доброкачественными гипербилирубинемиями. *РМЖ*. 2008;16(18):1194-1198 [Delyagin VM, Urazbagambetov AU. Meditsinskoe soprovozhdenie patsientov s semeynymi dobrokachestvennymi giperbilirubinemiymi. *Russian Medical Journal*. 2008;16(18):1194-1198. (In Russ.).]
 21. Lingenhel A, Kollerits B, Schwaiger JP, Hunt SC., Gress R, Hopkins PN, Schoenborn V, Heid IM, Kronenberg F. Serum bilirubin levels, UGT1A1 polymorphisms and risk for coronary artery disease. *Exp Gerontol*. 2008;43(12):1102-1107. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.08.047>

Сведения об авторе

Волков Алексей Николаевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии с основами генетики и паразитологии; старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а).

ORCID: 0000-0003-1169-715X

Статья поступила: 21.05.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Author

Dr. Alexey N. Volkov, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Genetics and Parasitology; Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation)

ORCID: 0000-0003-1169-715X

Received: 21.05.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-66-76>

МИКРОФЛОРА ПОЛОВЫХ ПУТЕЙ МУЖЧИН-ПАРТНЕРОВ ЖЕНЩИН С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ И ЕЕ РОЛЬ В РАЗВИТИИ РЕЦИДИВОВ ДАННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

БАРИНОВ С.В.¹, ОХЛОПКОВ В.А.², ТИРСКАЯ Ю.И.¹, БАБАЕВА Т.Ш.^{1,3*}, СИНЕЛЬНИКОВА Л.Б.⁴, ТЕРЛЕЦКАЯ Т.В.⁴

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Омск, Россия

²Институт высшего и дополнительного профессионального образования Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Москва, Россия

³Перинатальный центр бюджетного учреждения здравоохранения Омской области «Областная клиническая больница», г. Омск, Россия

⁴БУЗ Омской области «Клинический кожно-венерологический диспансер», г. Омск, Россия

Резюме

Цель. Оценить микрофлору половых путей мужчин – партнеров женщин с бактериальным вагинозом и ее роль в развитии рецидивов данного заболевания.

Материалы и методы. Обследовано 59 пациенток с бактериальным вагинозом. В основной группе А женщины обследовались и лечились совместно с половыми партнерами-мужчинами. Лечение мужчин проводилось клиндамицином местно. В группу сравнения В вошли женщины, лечившиеся без партнера. Все участники исследования подписывали информированное согласие. Все женщины, включенные в исследование, получали одинаковую терапию: на 1 этапе проводилась антибактериальная терапия метронидазолом в таблетках и клиндамицином местно, на втором этапе применялся препарат молочной кислоты местно. Методы обследования мужчин и женщин: микроскопия, ПЦР-тест с детекцией в режиме реального времени и посев отделяемого половых органов. Наблюдение за женщинами с бактериальным вагинозом продолжалось в течение 6 месяцев.

Результаты. У мужчин микрофлора наружных половых органов была схожей с их партнерами. С помощью ПЦР-теста чаще всего и у женщин, и у мужчин были обнаружены: *Gardnerella vaginalis* – у 96% женщин и у

62% мужчин; *Prevotella spp.* – у 93% женщин и 41% мужчин и *Atopobium vaginae* – у 79% пациенток и у 48% их половых партнеров. Количество высеваемых бактерий у супружеских пар в основной группе А было аналогично. Чаще всего высевались следующие микроорганизмы: *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* и *Enterococcus faecalis*. В основной группе, где лечились оба партнера, у женщин регистрировалась в два раза меньше рецидивов, чем у женщин группы сравнения, лечившихся без партнеров.

Заключение. Микрофлора мужских половых органов может быть ответственна за развитие рецидивов бактериального вагиноза у женщин. Лечение мужчин – сексуальных партнеров женщин с бактериальным вагинозом позволяет снизить количество рецидивов данного заболевания и тем самым улучшить результаты лечения.

Ключевые слова: бактериальный вагиноз, рецидив, микрофлора, половые партнеры, *Gardnerella vaginalis*.

Конфликт интересов.

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

Источник финансирования.

Собственные средства.

Для цитирования:

Баринов С.В., Охлопков В.А., Тирская Ю.И., Бабаева Т.Ш., Синельникова Л.Б., Терлецкая Т.В. Микрофлора половых путей мужчин-партнеров женщин с бактериальным вагинозом и ее роль в развитии рецидивов данного заболевания. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3):66-76. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-66-76>

*Корреспонденцию адресовать:

Бабаева Туран Шахин кызы, 644099. Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12, e-mail: babaeva.turan@mail.ru
© Баринов С.В. и др.

ORIGINAL RESEARCH

GENITAL MICROBIOTA OF SEXUAL PARTNERS OF FEMALE PATIENTS WITH BACTERIAL VAGINOSIS IS RESPONSIBLE FOR ITS RECURRENCES

SERGEY V. BARINOV¹, VITALIY A. OKHLOPKOV², YULIYA I. TIRSKAYA¹, TURAN S.-K. BABAEVA^{1,2,3*},
LYUDMILA B. SINEL'NIKOVA⁴, TATIANA V. TERLETSKAYA⁴

¹Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

²Institute of the Higher and Postgraduate Professional Education, Federal Research and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation, Moscow, Russian Federation

³Perinatal Center, Regional Clinical Hospital, Omsk, Russian Federation

⁴Clinical Dermatology and Venereology Dispensary, Omsk, Russian Federation

Abstract

Aim. To evaluate the genital microbiota of sexual partners of women with bacterial vaginosis and its role in the development of its recurrences.

Materials and Methods. We examined 59 consecutive patients with bacterial vaginosis. In the treatment group, sexual partners of the female patients were treated by local delivery of clindamycin; in the comparison group, sexual partners did not receive the drug. All women included in the study received the same therapy: metronidazole *per os* and local delivery of clindamycin at the stage 1 and local delivery of lactic acid at the stage 2. All patients were examined by microscopy, PCR test, and inoculation of the genital discharge. Monitoring of the female patients with bacterial vaginosis was continued for 6 months.

Results. In male patients, genital microbiota was similar to their female partners. *Gardnerella vaginalis* was detected in 96% of females and 62% of males. *Prevotella* was identified in 93%

of females and 41% of males while *Atopobium vaginae* was found in 79% of women and 48% of their sexual partners. The amount of bacterial species was similar in males and females of the treatment group. The most frequent microorganisms were *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* and *Enterococcus faecalis*. Female patients of the treatment group had two-fold lower risk of recurrent bacterial vaginosis than those of the comparison group.

Conclusion. Genital microbiota of sexual partners may be responsible for the recurrent bacterial vaginosis in females, and parallel treatment of sexual partners is required to minimise its risk.

Keywords: bacterial vaginosis, recurrence, microbiota, sexual partners, *Gardnerella vaginalis*.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

There was no funding for this project.

◀ English

For citation:

Sergey V. Barinov, Vitaliy A. Okhlopkov, Yuliya I. Tirskaia, Turan S.-K. Babaeva, Lyudmila B. Sinel'nikova, Tatiana V. Terletskaya. Genital microbiota of sexual partners of female patients with bacterial vaginosis is responsible for its recurrences. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3):66-76. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-66-76>

**Corresponding author:

Turan S.-K. Babaeva, 12, Lenina Street, Omsk, Russian Federation, 644099, e-mail: babaeva.turan@mail.ru

© Sergey V. Barinov et al.

Введение

Бактериальный вагиноз (БВ) является одним из наиболее распространенных заболеваний половых органов среди женщин репродуктивного возраста [1–2]. Примерно от 10 до 30% женщин хоть раз в жизни испытывали симптомы бактериального вагиноза, причем доказано,

что женщины негроидной расы чаще болеют этим заболеванием по сравнению с европеоидной расой [3–6].

БВ — это полимикробное состояние, характеризующееся снижением количества лактобактерий и чрезмерным ростом анаэробных микроорганизмов. Ключевую роль в развитии

этого заболевания играют «био пленки», в формировании которых участвуют условно-патогенные бактерии, нарушающие целостность эпителиального барьера и обладающие способностью к адгезии [7–9].

В настоящее время нерешенным вопросом является роль половой передачи БВ - ассоциированных бактерий. Многие проведенные исследования доказывают роль сексуальной активности в развитии БВ [10–12]. По результатам проведенных исследований развитие БВ ассоциировано с наличием у женщин большого количества половых партнеров и частой их сменой [12–14]. Тем не менее, до сих пор продолжаются споры о том, передается ли БВ половым путем или сексуальная активность просто нарушает нормальную вагинальную среду, приводя к дисбиозу влагалища [10]. Подтверждение возможности передачи БВ половым путем ограничено из-за отсутствия четкого этиологического агента. В пользу полового пути передачи БВ свидетельствует результаты исследования, проведенного в 2017г., в котором *Gardnerella vaginalis* одновременно выделялась во влагалище у пациенток с бактериальным вагинозом и в моче у их половых партнеров [15].

Таким образом, вагинальный половой контакт увеличивает риск развития БВ, однако также существуют доказательства того, что он не может быть обязательным условием формирования дисбиоза влагалища [16]. В исследовании, проведенном в США, колонизация бактериями, ассоциированными с БВ, была редкой у сексуально неактивных женщин, за исключением *Gardnerella vaginalis*, которая была обнаружена у 40% женщин, не ведущих половую жизнь [10]. Согласно данным бельгийских авторов, *Gardnerella vaginalis* была обнаружена у 27%, а *Atopobium vaginiae* – у 18% девственниц [17].

Важной проблемой бактериального вагиноза остается высокая частота его рецидивирования - до 50% в течение 6-12 месяцев [18,19]. Однако дискуссионными остаются вопросы связи рецидивов заболевания с реинфекцией от сексуальных партнеров и необходимость их лечения.

Цель исследования

Оценить микрофлору половых путей мужчин – партнеров женщин с бактериальным вагинозом и ее роль в развитии рецидивов данного заболевания.

Материалы и методы

В исследование включено 59 женщин с клиническим диагнозом «бактериальный вагиноз», которые были разделены на 2 группы: группа А – основная и группа В – сравнения. В группу А (n=29) вошли пациентки, обследованные и пролеченные вместе с половыми партнерами. Условием включения было наличие у женщины постоянного полового партнера и его согласие на исследование и лечение. В группе сравнения В (n=30) женщины получали лечение без половых партнеров.

Все женщины, включенные в исследование, получали одинаковую терапию: на 1 этапе проводилась антибактериальная терапия в соответствии с клиническими рекомендациями [20]: метронидазол в таблетках по 500 мг per os 2 раза в день в течение 7 дней и клиндамицин – 2% вагинальный крем один полный аппликатор (5 г) однократно на ночь в течение 7 дней. На втором этапе применялся препарат молочной кислоты 100 мг per vaginam по 1 суппозиторию 1 раз в день в течение 10 дней.

Лечение мужчин (партнеры пациенток группы А) проводилось клиндамицином местно (клиндамицин крем 2% 5,0 г на кожу полового члена однократно 7 дней).

Критерии включения: женщины с бактериальным вагинозом репродуктивного возраста от 18 до 45 лет.

Критерии исключения: беременность, злокачественное новообразование любой локализации, наличие в настоящее время специфических инфекций (сифилис, гонорея, хламидиоз, трихомониаз, ВИЧ-инфекция, генитальный герпес, кандидоз, микоплазменная и уреоплазменная инфекция), местное или системное использование антибиотиков, иммуномодулирующих препаратов в течение месяца до исследования, наличие острых воспалительных заболеваний любой локализации или обострение хронических.

Пациентки заполняли анкету для выявления особенностей анамнеза жизни, полового поведения, анамнеза заболевания. Женщинам проводился тест ПЦР с детекцией в режиме реального времени, бактериологическое исследование отделяемого влагалища с определением чувствительности выявленных микроорганизмов к антибиотикам.

Мужчинам (партнерам пациенток группы А) проводилось микроскопическое исследова-

ние отделяемого (мазка-отпечатка) с кожи внутреннего листка крайней плоти полового члена, тест ПЦР с детекцией в режиме реального времени, посев отделяемого с кожи внутреннего листка крайней плоти полового члена с определением чувствительности выявленных микроорганизмов к антибиотикам.

ПЦР-тест определял качественное и количественное содержание (процент обнаруженных микроорганизмов от общего количества бактерий: <10% или >10%), ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus*, *Prevotella spp.*, *Leptotrichia amnionii*, и качественное содержание ДНК *Mobiluncus curtisi*, *Mobiluncus mulieris*.

Через месяц после проведенной терапии женщинам проводился контроль эффективности лечения с помощью микроскопии отделяемого влагалища; ПЦР-теста с детекцией в режиме реального времени, посева отделяемого влагалища с определением чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. В течение 6 месяцев продолжалось наблюдение за пациентками, через полгода женщинам назначался контрольный визит для выявления рецидива заболевания, проводилась микроскопия отделяемого влагалища, ПЦР-теста с детекцией в режиме реального времени, посева отделяемого влагалища с определением чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ Statistica 13 и MS Excel. Применялись следующие методы статистического сравнения: непараметрический критерий χ^2 и критерий Мак-Немара. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

На первом этапе проводился анализ анамнеза всех пациенток, включенных в исследование, которым был выставлен диагноз бактериальный вагиноз. Пациентки обеих групп (основная и сравнения) были сопоставимы по возрасту и анамнестическим данным. Анализ анамнестических данных показал, что средний возраст начала половой жизни у всех обследованных женщин с бактериальным вагинозом составил $18 \pm 2,9$ лет. У 71% женщин (42/59) число половых партнеров за всю жизнь было больше одного, из них 17% (10/59) указывали на то, что число партнёров за всю по-

ловую жизнь было 5 и более. Появление симптомов бактериального вагиноза 41% женщин (24/59) связывали со сменой полового партнера, а 10% (6/59) обследованных отмечали связь дебюта данного заболевания с началом половой жизни. Только 37 % женщин (22/59) в нашем исследовании использовали барьерные методы контрацепции (презервативы). У 30 % женщин (18/59) в анамнезе имели место инфекции, передаваемые половым путем: перенесенную микоплазменную и уреаплазменную инфекцию отмечали 29% пациенток (17/59). Симптомы бактериального вагиноза впервые беспокоили 72% обследованных (43/59), а 28% женщин (16/59) отмечали рецидив заболевания.

На втором этапе проводилась оценка состояния микрофлоры половых путей супружеских пар в основной группе А. Данный этап исследования проведен с целью сравнения состояния вагинального микробиоценоза женщин, страдающих бактериальным вагинозом, и микрофлоры половых органов их постоянных партнеров.

Результаты ПЦР-теста супружеских пар представлены на **рисунке 1**.

ПЦР-диагностика отделяемого влагалища женщин группы А позволила выделить следующие микроорганизмы: *Gardnerella vaginalis* у 96% (28/29), количественно >10% от общего количества бактерий у 90% женщин; *Prevotella spp.* у 93% (27/29), количественно >10% у 52%; *A. vaginae* у 79% (23/29), количественно >10% от общего количества бактерий у 45% пациенток. Реже обнаруживались *Leptotrichia amnionii* и *Mobiluncus spp.* В 77% (20/29) случаев было обнаружено сочетание *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*.

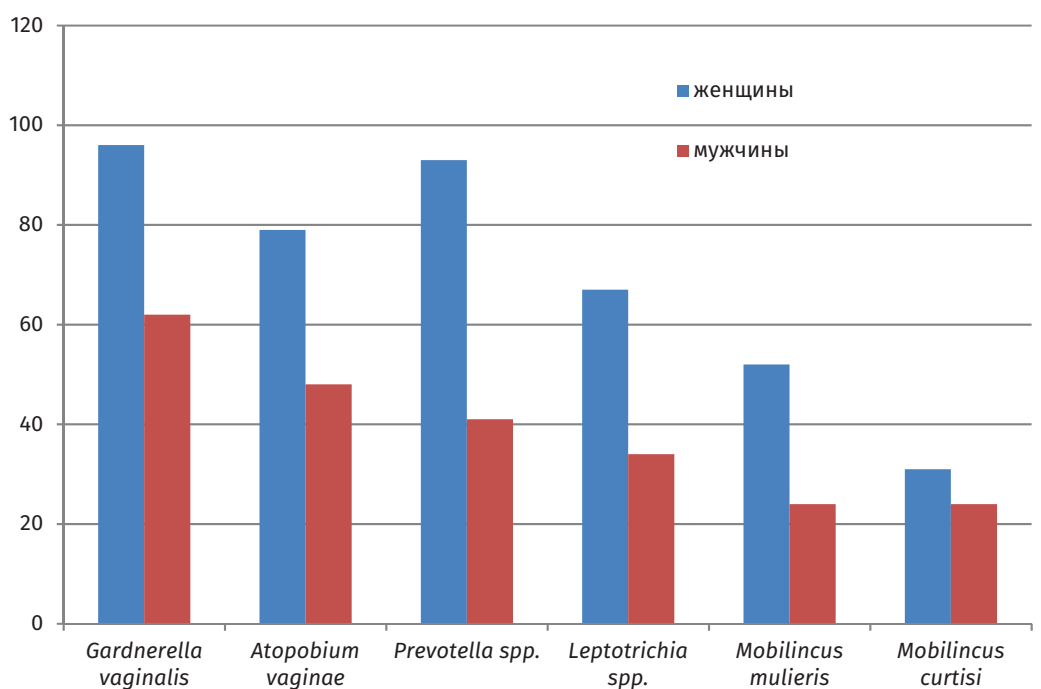
У мужчин при ПЦР-диагностике *Gardnerella vaginalis* определялась в 62% (18/29), причем во всех случаях количественно концентрация данных микроорганизмов была >10% от общего количества бактерий. *Atopobium vaginae* выявлялась у 48% мужчин (14/29), количественно >10% от общего количества бактерий в 26%; *Prevotella spp.* у 41% (12/29), количественно >10% в 10% случаях. *Leptotrichia* выделялась у 34% (10/29), *Mobiluncus mulieris* и *Mobiluncus curtisi* у 24% (6/29) половых партнеров женщин с бактериальным вагинозом. Сочетание *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* в половых органах было обнаружено у 41% мужчин (12/29).

Рисунок 1.

Микрофлора половых путей женщин с бактериальным вагинозом и их партнеров (группа А), ПЦР-тест

Figure 1.

Genital microbiota of women with bacterial vaginosis and their sexual partners (treatment group) found by PCR test



Примечание: ось x – выявленные микроорганизмы, ось y – процентное содержание (%)

X axis – detected microorganisms; Y axis – percentage.

Результаты посевов отделяемого половых органов супружеских пар (группа А) представлены на рисунке 2.

В посевах отделяемого влагалища у женщин чаще всего высевались: *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus agalactiae* (рисунок 2). При оценке чувствительности обнаруженных бактерий к клиндамицину было выявлено, что *Escherichia coli* была резистентна к клиндамицину в 60% посевов, *Enterococcus faecalis* был устойчив к клин-

дамицину в 67% случаях, *Staphylococcus spp.* в 33%. *Streptococcus agalactiae* был чувствителен к клиндамицину в 100% случаях.

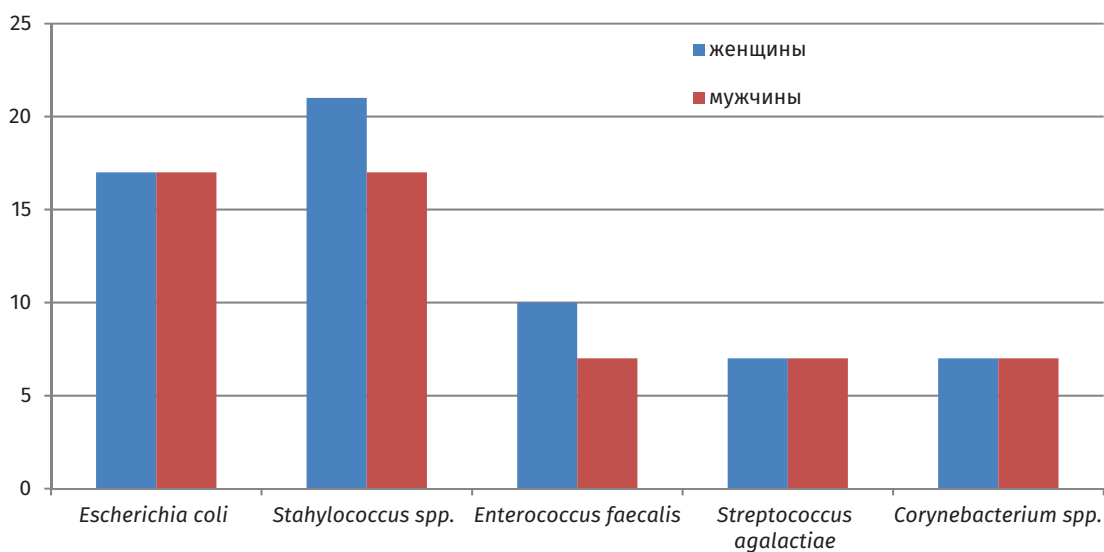
При посеве отделяемого половых органов у мужчин спектр и количество высеваемых организмов соответствовал таковому у женщин. Чаще всего были обнаружены микроорганизмы: *Escherichia coli* и *Staphylococcus spp.* (рисунок 2). У 31% (9/29) обследуемых пар при бактериологическом исследовании высевались идентичные микроорганизмы.

Рисунок 2.

Микрофлора половых путей женщин с бактериальным вагинозом и их партнеров (группа А), посев отделяемого на питательные среды

Figure 2.

Genital microbiota of women with bacterial vaginosis and their sexual partners (treatment group) identified by inoculation of the genital discharge



Примечание: ось x – выявленные микроорганизмы, ось y – процентное содержание (%)

X axis – detected microorganisms; Y axis – percentage.

Результаты бактериологического исследования (ПЦР-тест и посевы) показали, что микрофлора половых путей супружеских пар (группа А), в которых женщины страдают бактериальным вагинозом, идентична.

Оценка микрофлоры пациенток из группы сравнения В проводилась теми же методами: ПЦР-диагностика и посев отделяемого. Состав вагинального микробиоценоза женщин группы В существенно не отличался от пациенток группы А. При ПЦР-диагностике определялись: *Gardnerella vaginalis* у 97% (29/30), *Atopobium vaginae* у 90% (27/30), *Prevotella spp.* у 80% женщин (24/30), *Leptotrichia amnionii* у 70% (21/30), *Mobiluncus mulieris* у 53% (16/30) и *Mobiluncus curtisi* у 47% (14/30). Сочетание *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* было обнаружено у 73% обследованных (22/30).

По результатам посевов у женщин группы сравнения В чаще всего высевались *Escherichia coli* у 17% (5/30), *Staphylococcus spp.* у 17% (5/30), *Enterococcus faecalis* у 13% (4/30) и *Streptococcus agalactiae* у 10% (3/30). При оценке чувствительности обнаруженных бактерий к клиндамицину в группе сравнения В было выявлено, что *Escherichia coli* была резистентна к клиндамицину в 64% случаев, *Enterococcus faecalis* был устойчив к клиндамицину в 63% случаях, *Staphylococcus spp.* в 30%. *Streptococcus agalactiae* был чувствителен к клиндамицину в 97% случаях. Таким образом, по составу микрофлоры и чувствительности выявленных микроорганизмов к антибиотикам женщины, включенные в группу А и В, различий не имели.

Все пациентки, включенные в исследование (группа А и В) получали одинаковое лечение в соответствии с клиническими рекомендациями [20]: метронидазол в таблетках по 500 мг per os 2 раза в день в течение 7 дней и клиндамицин - 2% вагинальный крем один полный аппликатор (5 г) однократно на ночь в течение 7 дней. На втором этапе применялся препарат молочной кислоты 100 мг per vaginam по 1 суппозиторию 1 раз в день в течение 10 дней.

Пациентки группы А проводили лечение совместно со своими половыми партнерами. Мужчинам назначался клиндамицин местно (клиндамицин крем 2% 5,0 г на кожу полового члена однократно 7 дней).

Пациентки группы В лечились отдельно, без полового партнера.

На третьем этапе исследования проводилось сравнение результатов проведенного лечения

женщин группы А, которые санировались совместно с партнерами, и женщин группы В, которые лечились изолированно, без партнеров.

Оценка результатов проведенного лечения осуществлялась через 1 месяц после окончания терапии. Пациенткам проводился ПЦР-тест отделяемого влагалища и бактериологический посев с оценкой микрофлоры.

При контрольном обследовании через месяц после проведенного лечения у пациенток обеих групп, включенных в исследование, значительно снизилось количество предъявляемых жалоб. По результатам микроскопии отделяемого влагалища отсутствовали ключевые клетки, и в два раза возросло количество лактобактерий. У женщин в группе А было значимое снижение роста *Gardnerella vaginalis* (критерий Мак-Немара 23, $p < 0,001$), *Atopobium vaginae* (критерий Мак-Немара 19, $p < 0,001$), *Prevotella spp.* (критерий Мак-Немара 23, $p < 0,001$), *Leptotrichia amnionii* (критерий Мак-Немара 15, $p < 0,001$) и *Mobiluncus spp.* (критерий Мак-Немара 17, $p < 0,001$) (рисунок 3).

У женщин в группе сравнения В было также значимое снижение роста *Gardnerella vaginalis* (критерий Мак-Немара 22, $p < 0,001$), *Atopobium vaginae* (критерий Мак-Немара 22, $p < 0,001$), *Prevotella spp.* (критерий Мак-Немара 17, $p < 0,001$), *Leptotrichia amnionii* (критерий Мак-Немара 18, $p < 0,001$) и *Mobiluncus spp.* (критерий Мак-Немара 12, $p < 0,001$) (рисунок 4).

После лечения в обеих группах в посеве сохранялась персистенция кишечной палочки, энтерококков и стафилококков почти в том же процентном соотношении, что и до лечения (рисунок 5). Статистически значимых различий в количестве выявленных микроорганизмов при ПЦР-исследовании через месяц после лечения в обеих группах выявлено не было: *Gardnerella vaginalis* ($\chi^2 = 0,338$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,562$), *Atopobium vaginae* ($\chi^2 = 0,094$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,759$), *Prevotella spp.* ($\chi^2 = 0,885$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,347$), *Leptotrichia amnionii* ($\chi^2 = 0,660$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,417$) и *Mobiluncus spp.* ($\chi^2 = 1,092$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,297$).

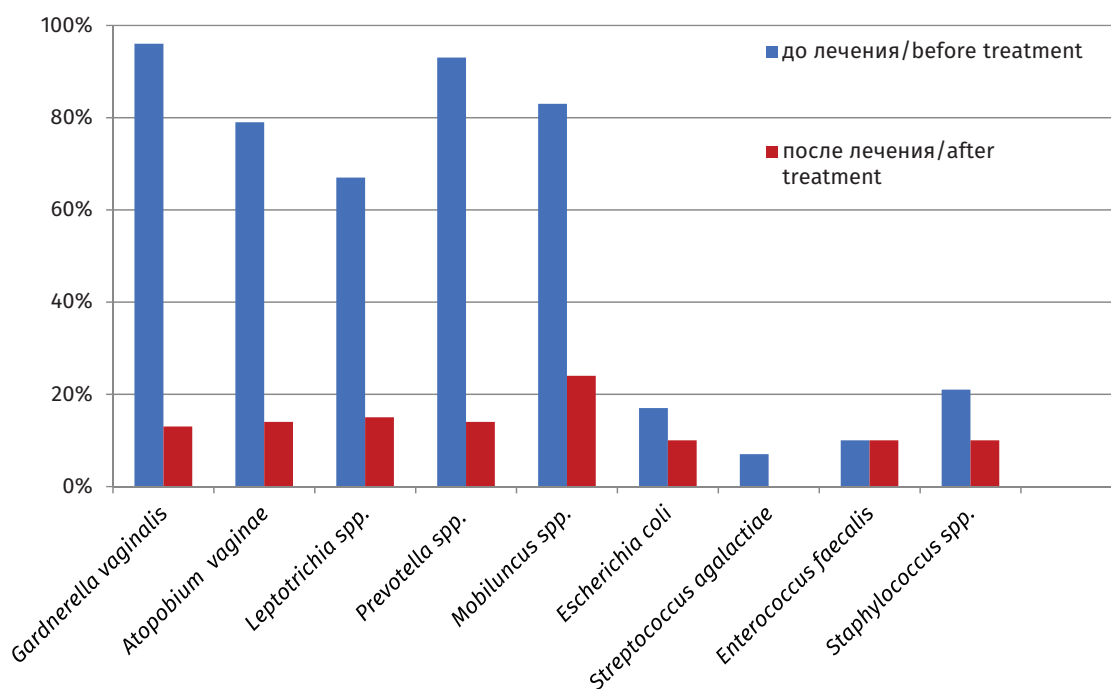
Наблюдение за данными пациентами продолжалась в течение полугода. При контрольном обследовании с помощью ПЦР-теста и посева отделяемого влагалища у женщин группы А наблюдалось значимое снижение роста

Рисунок 3.

Динамическая оценка микрофлоры влагалища до и после лечения в основной группе А (n = 29)

Figure 3.

Assessment of vaginal microbiota before and after the treatment in the treatment group (n = 29)



Примечание: ось x – выявленные микроорганизмы, ось y – процентное содержание (%)

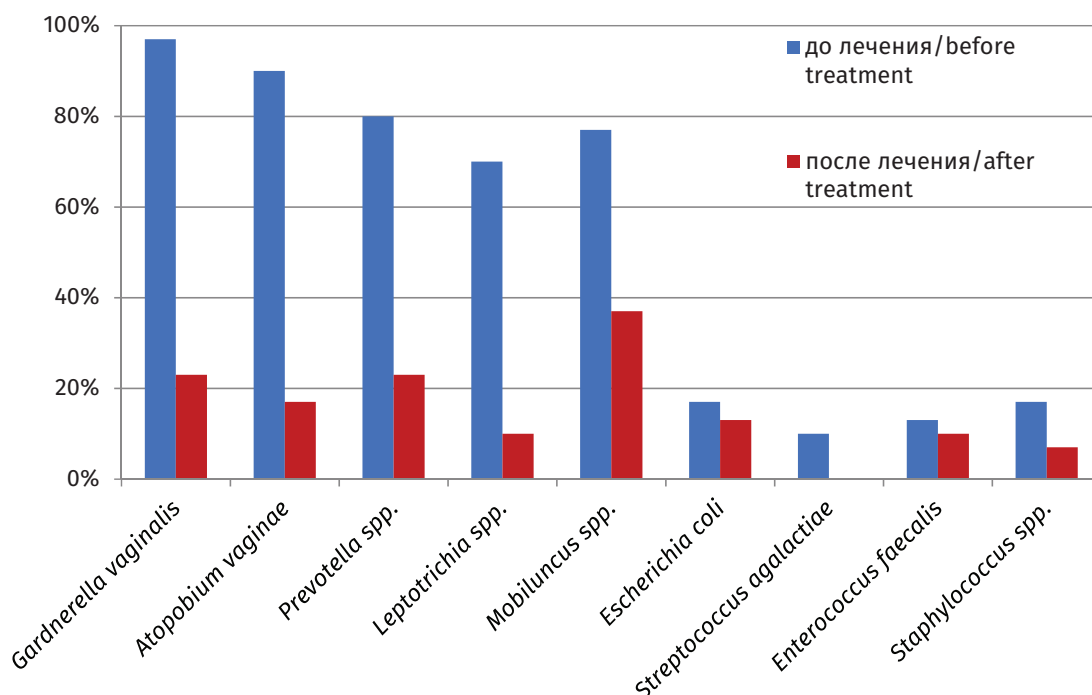
X axis – detected microorganisms; Y axis – percentage

Рисунок 4.

Динамическая оценка микрофлоры влагалища до и после лечения в группе сравнения В (n = 30)

Figure 4.

Assessment of vaginal microbiota before and after the treatment in the control group (n = 30)

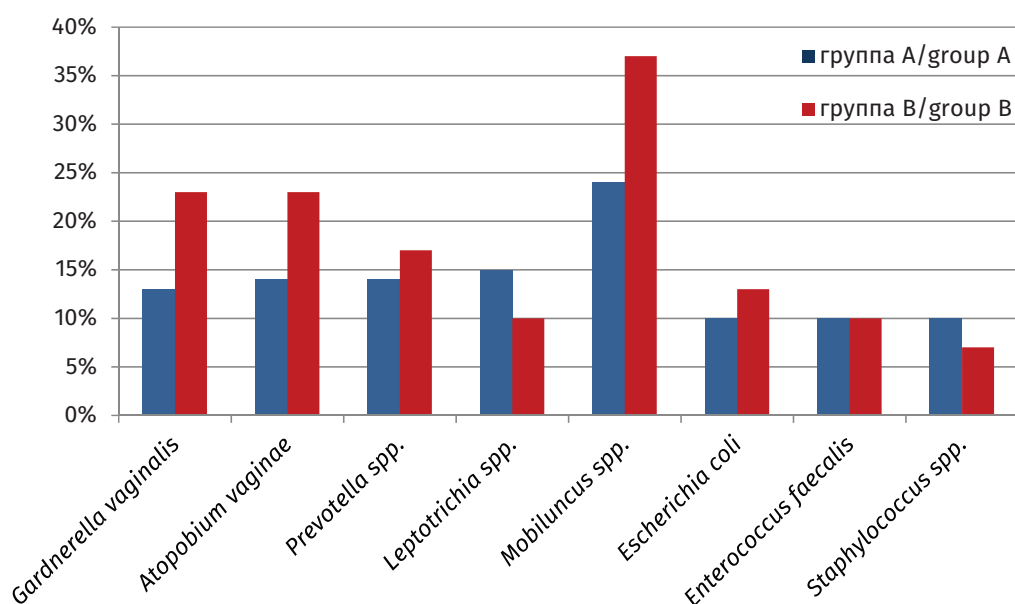


Примечание: ось x – выявленные микроорганизмы, ось y – процентное содержание (%)

X axis – detected microorganisms; Y axis – percentage

Gardnerella vaginalis ($\chi^2 = 4,218$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,041$), *Atopobium vaginae* ($\chi^2 = 4,218$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,041$), *Leptotrichia amnionii* ($\chi^2 = 5,645$, число степеней

свободы $df = 1$, $p = 0,018$) и *Mobiluncus* ($\chi^2 = 6,361$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,012$) по сравнению с женщинами группы В (рисунок 6).



Примечание: ось х – выявленные микроорганизмы, ось у – процентное содержание (%)

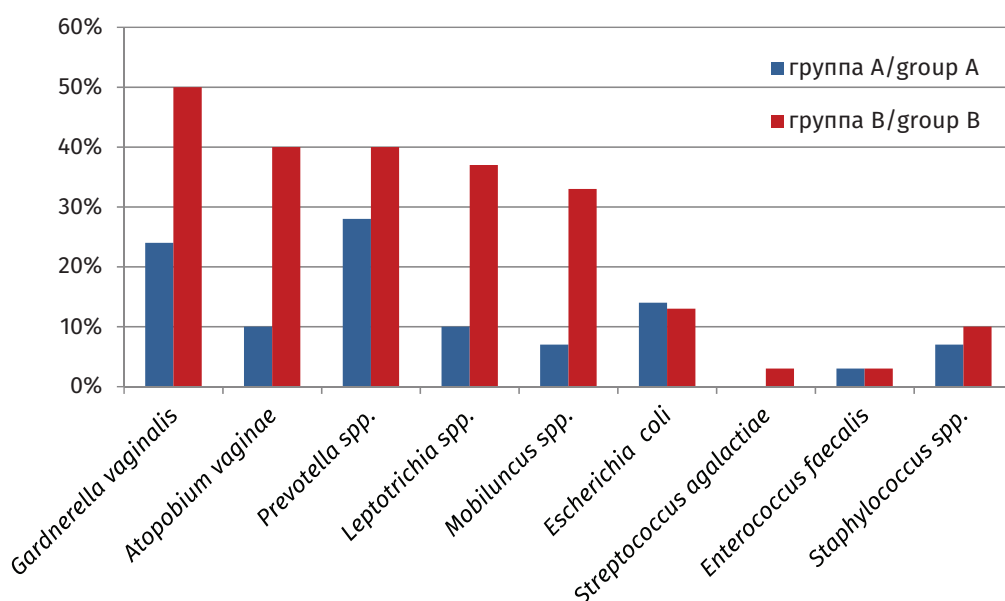
X axis – detected microorganisms; Y axis – percentage

Рисунок 5.

Сравнение эффективности проведенного лечения в группах А (n = 29) и В (n = 30) через месяц

Figure 5.

Comparison of the treatment efficacy in the treatment (n = 29) and control (n = 30) groups after 1 month of treatment



Примечание: ось х – выявленные микроорганизмы, ось у – процентное содержание (%)

X axis – detected microorganisms; Y axis – percentage

Рисунок 6.

Сравнение эффективности проведенного лечения в группах А (n=29) и В (n=30) через 6 месяцев

Figure 6.

Comparison of the treatment efficacy in the treatment (n = 29) and control (n = 30) groups after 6 months of treatment

Через 6 месяцев в группе А число рецидивов составило 24% (7/29), что было в почти в 2 раза меньше, чем в группе сравнения В, где бактериальный вагиноз был диагностирован у 43% пациенток (13/30) ($\chi^2 = 2,425$, число степеней свободы $df = 1$, $p = 0,12$).

Кроме того, в обеих группах у женщин с рецидивом заболевания при посеве отделяемого влагалища продолжали персистировать микроорганизмы, которые обнаруживались до начала лечения и были резистентны к клиндамицину

(*Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*) (рисунок 7).

Обсуждение

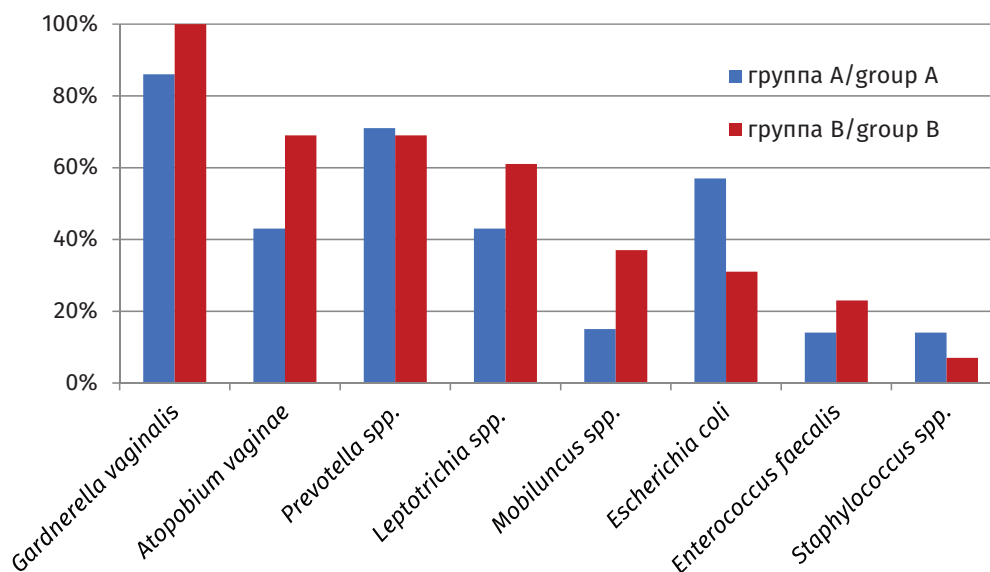
Проведенное нами исследование показало роль сексуальной активности женщин в развитии БВ: половина пациенток, включенных в исследование, связывали появление симптомов заболевания со сменой партнера или дебютом половой жизни; более половины женщин (71%) имели более 1 полового партнера, и только 37%

Рисунок 7.

Микрофлора влагалища при контрольном обследовании у пациенток с зарегистрированным рецидивом бактериального вагиноза в группах А (n=7) и В (n=13) через 6 месяцев

Figure 7.

Vaginal microbiota identified during the control examination in patients with recurrent bacterial vaginosis in the treatment (n = 7) and control groups (n = 13) after 6 months of treatment



Примечание: ось x – выявленные микроорганизмы, ось y – процентное содержание (%)

X axis – detected microorganisms; Y axis – percentage

обследованных использовали барьерные методы контрацепции. Полученные нами результаты согласуются с данными систематического обзора, проведенного в 2008 г. [13].

Согласно множественным исследованиям БВ увеличивает риск заражения инфекциями, передаваемыми половым путем, в том числе ВИЧ-инфекцией [21–25]. В нашей работе наличие специфических инфекций у женщин в момент проведения исследования было критерием исключения, но больше половины пациенток отмечали в анамнезе перенесенные инфекции, передаваемые половым путем, микоплазменную или уреаплазменную инфекцию.

При обследовании половых партнеров женщин, страдающих бактериальным вагинозом, было обнаружено, что *Gardnerella vaginalis* у мужчин выделялась более чем в половине случаев (62%), что также согласуется с данными литературы и доказывает возможность персистенции гарднерелл в половых путях мужчин и быть причиной реинфицирования женщин [14,15]. Кроме того, в проведенном нами исследовании получена идентичность обнару-

женных микроорганизмов у супружеских пар, а процент высеваемых бактерий был практически одинаковым.

В основной группе, где проводилась терапия обоих партнеров, количество рецидивов БВ регистрировалось в 2 раза меньше, чем в группе, где лечились только женщины. Это доказывает факт, что при бактериальном вагинозе необходимо назначать лечение обоим половым партнерам.

Однако следует сказать, что рецидивы в основной группе все же сохранялись, что скорее всего связано с сопутствующей условно-патогенной микрофлорой, на которую не воздействуют традиционные антибактериальные препараты.

Заключение

Таким образом, мужская микрофлора ответственна за реинфекцию БВ-ассоциированных бактерий и может приводить к рецидивированию данного заболевания. Санация мужчин-партнеров позволяет улучшить результаты лечения женщин за счет снижения количества рецидивов бактериального вагиноза.

Литература / References:

- Allsworth JE, Peipert JF. Prevalence of bacterial vaginosis: 2001–2004 national health and nutrition examination survey data. *Obstet Gynecol.* 2007;109(1):114–120. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000247627.84791.91>
- Lamont RF, Morgan DJ, Wilden SD, Taylor-Robinson D. Prevalence of bacterial vaginosis in women attending one of three general practices for routine cervical cytology. *Int J STD AIDS.* 2000;11(8):495–498. <https://doi.org/10.1258%2F0956462001916371>
- Bradshaw CS, Walker J, Fairley C, Chen MY, Tabrizi SN, Donovan B, Kaldor JM, McNamee K, Urban E, Walker S, Currie M, Birden H, Bowden F, Garland S, Pirotta M, Gurrin

- L, Hocking JS. Prevalent and incident bacterial vaginosis are associated with sexual and contraceptive behaviours in young Australian women. *PLoS One*. 2013;8(3):e57688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057688>
4. Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209(6):505-523. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.05.006>
 5. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2015. *MMWR Recomm Rep*. 2015;64(03):1-137.
 6. Bautista CT, Wurapa E, Sateren WB, Morris S, Hollingsworth B, Sanchez JL. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. *Mil Med Res*. 2016;13:4. <https://doi.org/10.1186%2Fs40779-016-0074-5>
 7. Hardy L, Jespers V, Abdellati S, De Baetselier IA, Mwambawange L, Musengamana V, van de Wijert J, Vanechoutte M, Crucitti T. A fruitful alliance: the synergy between Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis in bacterial vaginosis-associated biofilm. *Sex Transm Infect*. 2016;92(7):487-491. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2015-052475>
 8. Machado A, Cerca N. Influence of Biofilm Formation by Gardnerella vaginalis and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis*. 2015;212(12):1856-1861. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv338>
 9. Zevin AS, Xie IY, Birse K, Arnold K, Romas L, Westmacott G, Novak RM, McCorrister S, McKinnon LR, Cohen CR, Mackelprang R, Lingappa J, Lauffenburger DA, Klatt NR, Burgener AD. Microbiome Composition and Function Drives Wound-Healing Impairment in the Female Genital Tract. *PLoS Pathog*. 2016;12(9):e1005889 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005889>
 10. Mitchell C, Manhart LE, Thomas KK, Agnew K, Marrazzo JM. Effect of sexual activity on vaginal colonization with hydrogen peroxide-producing lactobacilli and Gardnerella vaginalis. *Sex Transm Dis*. 2011;38(12):1137-1144. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31822e6121>
 11. Fethers KA, Fairley CK, Morton A, Hocking JS, Hopkins C, Kennedy LJ, Fehler G, Bradshaw CS. Early sexual experiences and risk factors for bacterial vaginosis. *J Infect Dis*. 2009;200(11):1662-1670. <https://doi.org/10.1086/648092>
 12. Bilardi J, Walker S, Mooney-Somers J, Temple-Smith M, McNair R, Bellhouse C, Fairley C, Chen M, Bradshaw C. Women's views and experiences of the triggers for onset of bacterial vaginosis and exacerbating factors associated with recurrence. *PLoS ONE*. 2016;11(3): e0150272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150272>
 13. Fethers A, Fairley K, Hocking S, Gurrin LC, Bradshaw CS. Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2008;47(11):1426-1435. <https://doi.org/10.1086/592974>
 14. Zozaya M, Ferris MJ, Siren JD, Lillis R, Myers L, Nsuami MJ, Eren AM, Brown J, Taylor CM, Martin DH. Bacterial communities in penile skin, male urethra, and vaginas of heterosexual couples with and without bacterial vaginosis. *Microbiome*. 2016;4:16. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0161-6>
 15. Gottschick C, Deng ZL, Vital M, Masur C, Abels C, Pieper DH, Wagner-Döbler I. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017;5(1):99. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0305-3>
 16. Francis SC, Holm Hansen C, Irani J, Andreasen A, Baisley K, Jespers V, Crucitti T, Changalucha J, Hayes RJ, Nnko S, Watson-Jones D, Buvé A. Results from a cross-sectional sexual and reproductive health study among school girls in Tanzania: high prevalence of bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect*. 2019;95(3):219-227. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2018-053680>
 17. Jespers V, Hardy L, Buyze J, Loos J, Buvé A, Crucitti T. Association of sexual debut in adolescents with microbiota and inflammatory markers. *Obstet Gynecol*. 2016;128(1):22-31. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001468>
 18. Workowski KA. Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2015;61 Suppl 8:S759-S762. <https://doi.org/10.1093/cid/civ771>
 19. Hilbert DW, Smith WL, Paulish-Miller TE, Chadwick SG, Toner G, Mordechai E, Adelson ME, Sobel JD, Gyga SE. Utilization of molecular methods to identify prognostic markers for recurrent bacterial vaginosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86(2):231-242. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.003>
 20. Клинические рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, сопровождающихся патологическими выделениями из половых путей женщин. Российское общество акушеров-гинекологов. 2-е изд. М., 2019. Ссылка активна на 07.05.2020 [Klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu zabolevaniy, soprovozhdayushchikhsya patologicheskimi vydeleniyami iz polovykh putey zhenshchin. Rossiyskoe obshchestvo akusherov-ginekologov. 2nd ed. Moscow, 2019. (In Russ.).] Available at: <http://www.medkirov.ru/docs/id/4F7915>. Accessed: 7 April 2020.
 21. Shipitsyna E, Khusnutdinova T, Budilovskaya O, Krysanova A, Shalepo K, Savicheva A, Unemo M. Bacterial vaginosis-associated vaginal microbiota is an age-independent risk factor for Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium and Trichomonas vaginalis infections in low-risk women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(7):1221-1230. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03831-w>
 22. Low N, Chersich MF, Schmidlin K, Egger M, Francis SC, van de Wijert JH, Hayes RJ, Baeten JM, Brown J, Delany-Moretlwe S, Kaul R, McGrath N, Morrison C, Myer L, Temmerman M, van der Straten A, Watson-Jones D, Zwahlen M, Hilber AM. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and HIV infection in women: individual participant data meta-analysis. *PLoS Med*. 2011;8(2):e1000416. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000416>
 23. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis infection. *Clin Infect Dis*. 2003; 36:663-668. <https://doi.org/10.1086/367658>
 24. Balkus JE, Richardson BA, Rabe LK, Taha TE, Mgodini N, Kasaro MP, Ramjee G, Ramjee G, Hoffman IF, Abdool Karim SS. Bacterial vaginosis and the risk of trichomonas vaginalis acquisition among HIV-1-negative women. *Sex Transm Dis*. 2014; 41(2):123-128. <https://doi.org/10.1097/olq.0000000000000075>
 25. Kenyon C, Buyze J, Klebanoff M, Brotman RM. The role of sexual networks in studies of how BV and STIs increase the risk of subsequent reinfection. *Epidemiol Infect*. 2018;146(15):2003-2009. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002157>

Сведения об авторах

Баринев Сергей Владимирович профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии №2 ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: концепция и дизайн исследования, написание текста статьи, редактирование, утверждение окончательной версии для публикации.

ORCID: 0000-0002-0357-7097

Охлопков Виталий Александрович, профессор, доктор медицинских наук, ректор института высшего и дополнительного профессионального образования Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии Министерства образования и науки Российской Федерации (107031, Россия, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, строение 2).

Вклад в статью: концепция и дизайн исследования, редактирование.

ORCID: 0000-0002-3515-6027

Тирская Юлия Игоревна, доктор медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии №2 ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: концепция и дизайн исследования, написание текста статьи, редактирование.

ORCID: 0000-0001-5365-7119

Бабеева Туран Шахин кызы, аспирант кафедры акушерства и гинекологии №2 ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12). Врач акушер-гинеколог перинатального центра БУЗ Омской области «Областная клиническая больница» (644111, Россия, г. Омск, ул. Березовая, д. 3).

Вклад в статью: сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста статьи.

ORCID: 0000-0002-9960-6197

Синельникова Людмила Борисовна, врач-дерматовенеролог, БУЗ Омской области «Клинический кожно-венерологический диспансер» (644001, Россия, г. Омск, ул. 5-я линия, д. 117а).

Вклад в статью: сбор и обработка материала.

ORCID: 0000-0002-5959-7636.

Терлецкая Татьяна Викторовна, врач-дерматовенеролог, БУЗ Омской области «Клинический кожно-венерологический диспансер» (644001, Россия, г. Омск, ул. 5-я линия, д. 117а).

Вклад в статью: сбор и обработка материала.

ORCID: 0000-0001-5425-0847.

Статья поступила: 25.05.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Prof. Sergey V. Barinov, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology #2, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation)

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-0357-7097

Prof. Vitaliy A. Okhlopov, MD, DSc, Professor, Rector, Institute of the Higher and Postgraduate Professional Education, Federal Research and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation (25, Petrovka Street, Building 2, 107031, Moscow, Russian Federation)

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-3515-6027

Dr. Yuliya I. Tirskaya, MD, Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology #2, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation)

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-5365-7119

Dr. Turan S.-K. Babaeva, MD, PhD Student, Department of Obstetrics and Gynecology #2, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation); Obstetrician-Gynecologist, Perinatal Center, Regional Clinical Hospital (3, Beregovaya Street, Omsk, 644111, Russian Federation)

Contribution: collected and processed the data; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-9960-6197

Dr. Lyudmila B. Sinel'nikova, MD, Dermatologist-Venereologist, Clinical Dermatology and Venereology Dispensary, (117a, 5th Liniya Street, Omsk, 644001, Russian Federation)

Contribution: collected and processed the data.

ORCID: 0000-0002-5959-7636.

Dr. Tatiana V. Terletskaia, MD, Dermatologist-Venereologist, Clinical Dermatology and Venereology Dispensary, (117a, 5th Liniya Street, Omsk, 644001, Russian Federation)

Contribution: collected and processed the data.

ORCID: 0000-0001-5425-0847.

Received: 25.05.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-77-84>

ОСОБЕННОСТИ ГОРМОНАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С ОЖИРЕНИЕМ

АРТЫМУК Н.В. *, ТАЧКОВА О.А., СУХОВА Н.А.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

Резюме

Цель. Определить особенности гормонального профиля у женщин репродуктивного возраста с ожирением.

Материалы и методы. Проведено проспективное когортное исследование 163 пациенток на базе ГАУЗ КО «Областная клиническая больница скорой медицинской помощи им. М. А. Подгорбунского» (Кемерово). В I группу включены 140 женщин репродуктивного возраста с ожирением, во II группу – 23 женщины репродуктивного возраста с нормальной массой тела. Всем пациенткам обеих групп проводилось общеклиническое и специальное гинекологическое исследование. Концентрацию гормонов определяли методом иммуноферментного анализа при помощи наборов «Алкор Био» (Россия), Diagnostic system laboratories (США). Содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), пролактина, эстрадиола, эстрогена, тестостерона, дегидроэпандростерона сульфата (ДГЭС-С), тиреотропного гормона (ТТГ), трийодтиронина (T_3), тироксина (T_4), свободного тироксина (FT_4), кортизола, лептина и иммунореактивного инсулина (ИРИ) в сыворотке крови оценивали на 5–6 день, а уровень прогестерона определяли на 21–22 день менструального цикла.

Результаты. Женщины репродуктивного возраста с ожирением характеризовались более высокими значениями ЛГ, соотношения ЛГ/ФСГ, тестостерона, эстрадио-

ла, эстрогена, лептина, ИРИ и более низкими значениями ФСГ и прогестерона по сравнению с женщинами с нормальной массой тела. Выявлена прямая корреляционная зависимость между содержанием лептина и уровнем эстрогена ($r=0,21$, $p=0,014$), НОМА-R ($r=0,18$, $p=0,039$); некоторыми показателями липидного обмена: ТГ ($r=0,20$, $p=0,030$), ХС-ЛПНП ($r=0,22$, $p=0,016$), Ка ($r=0,19$, $p=0,026$). Отмечена статистически значимая обратная корреляционная зависимость между содержанием лептина и ХС-ЛПВП ($r=-0,18$, $p=0,043$). Установлена прямая корреляционная зависимость между содержанием инсулина и уровнем ЛГ ($r=0,24$, $p=0,030$), тестостерона ($r=0,32$, $p=0,037$), ДЭАС-с ($r=0,56$, $p=0,003$), НОМА-R ($r=0,95$, $p<0,001$), ХС ($r=0,20$, $p=0,024$), ТГ ($r=0,29$, $p<0,001$).

Заключение. Женщины репродуктивного возраста с ожирением имеют определенные особенности гормонального профиля, которые, по-видимому, лежат в основе расстройств менструальной и репродуктивной функции у этих пациенток.

Ключевые слова: ожирение; репродуктивный возраст; уровень гормонов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

Данная работа не имела источников финансирования.

Для цитирования:

Артёмук Н.В., Тачкова О.А., Сухова Н.А. Особенности гормонального профиля женщин репродуктивного возраста с ожирением. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3):77-84. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-77-84>

*Корреспонденцию адресовать:

Артёмук Наталья Владимировна, 650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а, e-mail: artymuk@gmail.com

© Артёмук Н.В. и др.

ORIGINAL RESEARCH

FEATURES OF THE HORMONAL PROFILE IN OBESE REPRODUCTIVE-AGE WOMEN

NATALIA V. ARTYMUК **, OLGA A. TACHKOVA, NATALIA A. SUKHOVA

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

English ►

Abstract

Aim. To assess the hormonal profile features in obese reproductive-age women.

Materials and Methods. We consecutively enrolled 163 women of reproductive age (140 women with body mass index ≥ 30 kg/m² and 23 women with normal body mass index) who have been admitted to Podgorbunskiy Regional Emergency Medicine Hospital. All patients of both groups underwent general and gynecological examination. Serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), prolactin, estradiol, estrone, testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, thyroid-stimulating hormone, free triiodothyronine, total and free thyroxine, cortisol, leptin, immunoreactive insulin, and progesterone were assessed on days 5-6 and 21-22 of the menstrual cycle.

Results. Obese women of reproductive age were characterised by higher values of LH, LH/FSH ratio, testosterone, estradiol, estrone, leptin, IRI and by lower levels of FSH and progesterone compared with normal weight women. A direct

correlation was found between the level of leptin and estrone ($r = 0.21$, $p = 0.014$), insulin resistance ($r = 0.18$, $p = 0.039$), triglycerides ($r = 0.20$, $p = 0.030$), and low-density lipoprotein cholesterol ($r = 0.22$, $p = 0.016$). There was a statistically significant inverse correlation between the level of leptin and high-density lipoprotein cholesterol ($r = -0.18$, $p = 0.043$). A direct correlation was established between insulin and LH ($r = 0.24$, $p = 0.030$), testosterone ($r = 0.32$, $p = 0.037$), dehydroepiandrosterone sulfate ($r = 0.56$, $p = 0.003$), insulin resistance ($r = 0.95$, $p < 0.001$), cholesterol ($r = 0.20$, $p = 0.024$), triglycerides ($r = 0.29$, $p < 0.001$).

Conclusion. Obese women of reproductive age have certain hormonal features that underlie menstrual and reproductive disorders in these patients.

Keywords: obesity, reproductive age, hormone levels, polycystic ovary syndrome

Conflict of Interest

None declared.

Funding

There was no funding for this project.

For citation:

Natalia V. Artymuk, Olga A. Tachkova, Natalia A. Sukhova. Features of the hormonal profile in obese reproductive-age women. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020;5(3):77-84. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-77-84>

****Corresponding author:**

Dr. Natalia V. Artymuk, 22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation, e-mail: artymuk@gmail.com

© Natalia V. Artymuk et al.

Введение

Ожирение является значимой проблемой во всем мире, что связано с серьезными рисками для здоровья [1]. В настоящее время ожирение приобрело характер глобальной эпидемии и ее последствия имеют большое значение в отношении заболеваемости и смертности как у взрослых, так и у детей [2, 3]. Частота встречаемости ожирения увеличивается во всех социально-экономических группах независимо от уровня доходов [2–4]. Доказано, что ожире-

ние является фактором риска сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний (молочной железы, яичника, эндометрия, толстого кишечника), а также бесплодия [5]. Для пациенток с ожирением характерна аменорея, олигоменорея и нерегулярные менструации [6]. Основной причиной бесплодия у тучных женщин, по мнению многих авторов, является хроническая ановуляция [4, 7].

В настоящее время показано влияние гормонов яичников на риск ожирения и характер

распределения жировой ткани [8]. И, напротив, доказано, что снижение массы тела с использованием гипокалорийной диеты, медикаментозной терапии или бариатрической хирургии может приводить к нормализации менструальной функции и восстановлению фертильности, особенно у женщин с глютеофеморальным ожирением I степени [9–11].

Цель исследования

Определить особенности гормонального профиля у женщин репродуктивного возраста с ожирением.

Материалы и методы исследования

Проведено проспективное когортное исследование 163 пациенток на базе ГАУЗ КО «Областная клиническая больница скорой медицинской помощи им. М. А. Подгорбунского» (Кемерово). Дизайн исследования утвержден этическим комитетом ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 2 от 25.09.2005). Все пациентки, включенные в исследование, дали информированное согласие на участие. В I группу включены 140 женщин репродуктивного возраста с ожирением, во II группу – 23 женщины репродуктивного возраста с нормальной массой тела. *Критерии включения в I группу:* репродуктивный возраст (от 18 до 45 лет); наличие ожирения – индекс массы тела (ИМТ) $\geq 30,0$ кг/м²; наличие информированного согласия на участие в исследовании. *Критерии невключения в I группу:* возраст менее 18 и старше 45 лет; ИМТ менее 30,0 кг/м²; новообразования гипофиза и надпочечников по результатам магнитно-резонансной томографии и/или компьютерной томографии. *Критерии включения во II группу:* репродуктивный возраст (18–45 лет); нормальная масса тела – ИМТ от 19 до 24,9 кг/м²; наличие информированного согласия на участие в исследовании. *Критерии невключения во II группу:* возраст менее 18 и старше 45 лет; ИМТ 25,0 кг/м² и более.

Всем пациенткам обеих групп проводилось общеклиническое и специальное гинекологическое исследование. Уровень гормонов определяли методом иммуноферментного анализа при помощи наборов «Алкор Био» (Россия), Diagnostic system laboratories (США). Концентрацию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), про-

лактина, эстрадиола, эстрона, тестостерона, дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭС-С), кортизола, трийодтиронина (Т₃), тироксина (Т₄), свободного тироксина (FT₄), тиреотропного гормона (ТТГ), иммунореактивного инсулина (ИРИ) и лептина в сыворотке крови определяли на 2–5 день, а уровень прогестерона оценивали на 21–22 день менструального цикла. Индекс инсулинорезистентности оценивали при помощи малой математической модели гомеостаза глюкозы (Homeostasis Model Assessment - HOMA) с определением показателя HOMA-R (HOMA-R = уровень гликемии натощак (ммоль/л) × уровень ИРИ натощак/22,5).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с применением пакета прикладных программ Excel 2000, Statistica 6.0. (StatSoft Inc., США). Среднюю арифметическую величину (М) и среднее квадратичное отклонение (σ) определяли по каждому признаку. Проводили проверку гипотезы о равенстве генеральных средних в двух сравниваемых группах с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Взаимосвязь между количественными признаками оценивали при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). При критическом уровне значимости $p < 0,05$ отвергали нулевую гипотезу.

Результаты исследования

Основные характеристики пациенток с ожирением и нормальной массой тела представлены в **таблице 1**.

Возраст пациенток в I и II группах составил $30,40 \pm 7,20$ и $28,57 \pm 5,89$ лет соответственно ($p=0,249$). Масса тела у пациенток с ожирением была значимо выше, чем в группе сравнения, и составляла соответственно $39,02 \pm 6,36$ и $21,73 \pm 1,46$ ($p<0,001$). Среднее значение ИМТ у пациенток I группы составлял $38,73 \pm 6,28$ кг/м², у женщин группы сравнения – $21,73 \pm 1,46$ кг/м² ($p<0,001$). Окружность талии (ОТ) и соотношение окружности талии к окружности бедер (ОТ/ОБ) у пациенток I группы были также существенно больше, чем во II группе – $108,00 \pm 13,91$ см и $0,87 \pm 0,08$ см vs $69,43 \pm 3,64$ см и $0,72 \pm 0,03$ см ($p<0,001$). 60% женщин страдали абдоминальным ожирением, 40% – глютеофеморальным ожирением. Пациентки с ожирением значимо чаще страдали экстрагенитальными и гинекологическими заболеваниями ($p<0,001$). Статистически значимо чаще у этих пациенток регистрировался метаболический синдром ($p<0,001$),

Таблица 1.

Основные характеристики обследованных женщин.

Table 1.

Clinicopathological features of the study participants.

Показатель <i>Parameters</i>	I группа (n=140) <i>Obese women</i>		II группа (n=23) <i>Normal body weight women</i>		p
	n	%	n	%	
Возраст, лет <i>Age, years</i>	30,40±7,20	-	28,57±5,89	-	0,249
ИМТ, кг/м ² <i>BMI, kg/m²</i>	38,73±6,28	-	21,73±1,46	-	<0,001
Масса тела (кг) <i>Body weight, kg</i>	103,39±17,87	-	57,61±4,9	-	<0,001
ОТ, см <i>Waist circumference, cm</i>	108,00±13,91	-	69,43±3,64	-	<0,001
ОТ/ОБ <i>Waist to hip ratio</i>	0,87±0,08	-	0,72±0,03	-	<0,001
Экстрагенитальные заболевания <i>Extragenital diseases</i>	131	93,6	15	65,2	<0,001
Метаболический синдром <i>Metabolic syndrome</i>	86	61,4	0	0	<0,001
ССЗ <i>Cardiovascular disease</i>	107	76,4	4	17,4	<0,001
Заболевания органов дыхания <i>Respiratory disease</i>	11	7,9	4	17,4	0,282
Заболевания ЛОР-органов <i>Diseases of ENT organs</i>	20	14,3	7	30,4	0,104
Заболевания мочевыводящих путей <i>Diseases of the urinary tract</i>	54	38,6	5	21,7	0,186
Заболевания щитовидной железы <i>Thyroid disease</i>	56	40,0	3	13,0	0,024
Заболевания ЖКТ <i>Gastrointestinal disease</i>	65	46,4	9	39,1	0,670
ЖКБ <i>Cholelithiasis</i>	27	19,3	0	0	0,045
Другие <i>Other disorders</i>	54	38,6	5	21,7	0,186
Гинекологические заболевания <i>Gynecological disease</i>	105	75,0	11	47,8	0,016
Нарушения менструального цикла <i>Menstrual disorders</i>	84	60,0	4	17,4	<0,001
Бесплодие <i>Infertility</i>	55	39,3	2	8,7	0,009
СПКЯ <i>Polycystic ovary syndrome</i>	60	42,9	0	0	<0,001
Гиперплазия эндометрия <i>Endometrial hyperplasia</i>	20	14,3	0	0	0,111
Миома <i>Myoma</i>	16	11,4	1	4,3	0,508
ВЗОМТ <i>Pelvic inflammatory disease</i>	35	25,0	9	39,1	0,243
ДДМЖ <i>Benign breast dysplasia</i>	60	42,9	4	17,4	0,037
Предменструальный синдром <i>Premenstrual syndrome</i>	24	17,1	3	13,0	0,851

ENT – ears, nose, and throat

сердечно-сосудистые заболевания ($p<0,001$), заболевания щитовидной железы ($p=0,025$) и желчнокаменная болезнь (ЖКБ) ($p=0,045$). Из гинекологических заболеваний у пациенток с ожирением относительно женщин репродуктивного возраста с нормальной массой тела значительно чаще выявлялись нарушения менструального цикла (НМЦ) ($p<0,001$), синдром поликистозных яичников (СПКЯ) ($p<0,001$), бесплодие ($p=0,009$), доброкачественная дисплазия молочной железы (ДДМЖ) ($p=0,037$).

Результаты исследования уровня гормонов у женщин репродуктивного возраста с ожирением

и без ожирения представлены в **таблице 2**.

Содержание ФСГ у пациенток с ожирением было статистически значимо ниже, чем у женщин с нормальной массой тела и составило $4,88\pm1,77$ и $5,79\pm1,5$ МЕ/л соответственно ($p=0,014$), при этом уровень ЛГ был, напротив, выше – $5,91\pm3,52$ и $4,12\pm2,3$ МЕ/л соответственно ($p=0,036$). Индекс ЛГ/ФСГ был статистически значимо выше в I группе по сравнению с II группой – $1,34\pm0,99$ и $0,76\pm0,47$ ($p=0,004$).

У женщин репродуктивного возраста с ожирением зарегистрированы статистически значимо более высокие уровни половых гормонов (тесто-

Показатель <i>Parameters</i>	I группа (n=140) <i>Mean ± SD</i>	II группа (n=23) <i>Mean ± SD</i>	P
ФСГ, МЕ/л <i>Follicle-stimulating hormone (FSH), IU/L</i>	4,88±1,77	5,79±1,46	0,014
ЛГ, МЕ/л <i>Luteinizing hormone (LH), IU/L</i>	5,91±3,52	4,12±2,3	0,036
ЛГ/ФСГ <i>LH/FSH</i>	1,34±0,99	0,76±0,47	0,004
Тестостерон, нмоль/л <i>Testosterone, nmol/L</i>	2,41±1,83	1,55±0,85	0,049
ДЭАС-с, пг/мл <i>Dehydroepiandrosterone sulfate, pg/mL</i>	2,46±1,6	1,85±0,7	0,205
Е1, пмоль/л <i>Estrone, pmol/L</i>	966,65±926,8	716,9±619,81	0,042
Е2, пг/мл <i>Estradiol, pg/mL</i>	110,05±73,25	70,05±32,07	0,049
Прогестерон, нмоль/л <i>Progesterone, nmol/L</i>	12,7±9,2	24,0±15,9	<0,001
ТТГ, мМЕ/л <i>Thyroid-stimulating hormone, mIU/L</i>	1,99±1,7	1,79±0,8	0,320
FT4, пмоль/л <i>Free thyroxine, pmol/L</i>	15,09±3,36	16,22±2,69	0,127
Т4, нмоль/л <i>Thyroxine, nmol/L</i>	113,68±27,97	116,95±21,6	0,594
Т3, нмоль/л <i>Triiodothyronine, nmol/L</i>	1,84±0,6	1,68±1,2	0,331
ПРЛ, мМЕ/л <i>Prolactin, mIU/L</i>	353,9±216,6	361,2±178,8	0,689
Кортизол, нмоль/л <i>Cortisol, nmol/L</i>	389,1±106,61	411,9±100,74	0,174
ИРИ, мкЕД/мл <i>Insulin, mkU/mL</i>	18,88±10,2	7,51±2,9	<0,001
Лептин, нг/мл <i>Leptin, ng/mL</i>	72,49±16,3	17,85±12,5	<0,001

SD – standard deviation

стерона, эстрогена, эстрадиола) и гормонов, регулирующих пищевое поведение (ИРИ и лептина), относительно женщин с нормальной массой тела.

У пациенток I группы также выявлено более низкое содержание прогестерона, свидетельствующее о наличии хронической ановуляции или недостаточности лютеиновой фазы – 12,7±9,2 нмоль/л, во II группе – 24,0±15,9 нмоль/л (p<0,001).

Содержание ПРЛ, ТТГ, FT4, Т3 и ДГЭАС-С и кортизола у пациенток с ожирением статистически значимо не отличалось от аналогичных показателей пациенток II группы.

У женщин с ожирением зарегистрирован большой диапазон колебания уровня лептина: от 30,72 до 107,13 нг/мл, при этом его уровень был достоверно выше, чем у женщин с нормальной массой тела – 72,49±16,3 и 17,85±12,5 нг/мл соответственно (p<0,001). У пациенток контрольной

группы колебания уровня лептина были существенно меньше: от 3,59 до 43,38 нг/мл.

Уровень лептина у женщин с абдоминальным ожирением был статистически значимо выше – 74,60±14,34 нг/мл, чем при глютеофеморальном (гиноидном) типе ожирения – 69,20±17,61 нг/мл (p=0,049). Уровень ИРИ и НОМА-R у пациенток с абдоминальным ожирением были также достоверно выше, чем у женщин с глютеофеморальным ожирением – 20,41±10,6 и 16,38±9,1 мкЕД/мл (p=0,023) и 4,83±2,9 и 3,67±2,2 (p=0,011) соответственно.

Пациентки с ожирением и СПКЯ (n=60) имели уровень лептина статистически значимо более высокий – 76,25±12,5 нг/мл относительно женщин с ожирением без СПКЯ (n=80) 69,22±17,3 нг/мл (p=0,014). Значения ИРИ и показателя НОМА-R у женщин, страдающих ожирением и СПКЯ, были также значимо выше

Таблица 2.

Уровень гормонов у пациенток с ожирением и нормальной массой тела.

Table 2.

The levels of hormones in patients with obesity and normal body weight.

Таблица 3.

Основные корреляции между уровнем лептина и инсулина в сыворотке крови с основными показателями гормонального и метаболического статуса у женщин с ожирением.

Table 3.

The main correlations of serum leptin and insulin levels with main indicators of hormonal and metabolic status in obese women.

Показатель Parameters	Лептин Leptin		Инсулин Insulin	
	r	P	r	P
ФСГ Follicle-stimulating hormone	-0,15	0,189	0,03	0,853
ЛГ Luteinizing hormone	-0,10	0,361	0,24	0,030
ЛГ/ФСГ LH/FSH	-0,10	0,459	0,19	0,088
Е1 Estrone	0,21	0,014	0,10	0,398
Е2 Estradiol	0,05	0,769	0,01	0,952
Прогестерон Progesterone	-0,17	0,300	-0,13	0,419
Тестостерон Testosterone	-0,03	0,801	0,32	0,037
ДЭАС-с Dehydroepiandrosterone sulfate	-0,24	0,236	0,56	0,003
Кортизол Cortisol	0,15	0,122	0,001	0,989
Пролактин Prolactin	-0,14	0,166	0,03	0,893
Инсулин Insulin	0,14	0,111	-	-
НОМА-R	0,18	0,039	0,95	<0,001
Глюкоза натощак Fasting glucose	0,13	0,136	0,15	0,092
ХС Cholesterol	0,05	0,515	0,20	0,024
ТГ Triglycerides	0,20	0,030	0,29	<0,001
ХС-ЛПВП High-density lipoprotein cholesterol	-0,18	0,043	0,10	0,296
ХС-ЛПНП Low-density lipoprotein cholesterol	0,22	0,016	0,10	0,364
Ка Atherogenic index	0,19	0,026	0,10	0,568

НОМА-R – homeostasis model assessment for insulin resistance

– $22,31 \pm 10,5$ мкЕД/мл и $4,92 \pm 2,3$, чем у пациенток без СПКЯ – $15,04 \pm 8,7$ мкЕД/мл ($p < 0,001$) и $3,59 \pm 2,8$ ($p = 0,004$) соответственно. Корреляции между уровнем лептина и инсулина в сыворотке крови с основными показателями гормонального и метаболического статуса у женщин с ожирением представлены в **таблице 3**.

Выявлена прямая корреляционная зависимость между содержанием лептина и уровнем эстрогена ($r = 0,21$, $p = 0,014$), НОМА-R ($r = 0,18$, $p = 0,039$); некоторыми показателями липидного обмена: ТГ ($r = 0,20$, $p = 0,030$), ХС-ЛПНП ($r = 0,22$, $p = 0,016$), Ка ($r = 0,19$, $p = 0,026$). Отмечена статистически значимая обратная корреляционная зависимость между содержанием лептина и ХС-ЛПВП ($r = -0,18$, $p = 0,043$).

Выявлена прямая корреляционная зависимость между содержанием инсулина и уровнем ЛГ ($r = 0,24$, $p = 0,030$), тестостерона ($r = 0,32$,

$p = 0,037$), ДЭАС-с ($r = 0,56$, $p = 0,003$), НОМА-R ($r = 0,95$, $p < 0,001$), ХС ($r = 0,20$, $p = 0,024$), ТГ ($r = 0,29$, $p < 0,001$).

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что уровни половых гормонов и гормонов, регулирующих пищевое поведение, отличались у женщин репродуктивного возраста с ожирением и нормальной массой тела. Для пациенток с ожирением была характерна гиперлептинемия, инсулинорезистентность, гиперэстрогенемия (как за счет эстрогена, так и за счет эстрадиола), гипопрогестеронемия, гипертестостеронемия и гиперинсулинемия. Кроме того, эти пациентки имели повышенный базальный уровень ЛГ, соотношение ЛГ/ФСГ и более низкий уровень ФСГ. Уровень лептина у данной категории больных определялся ИМТ, характером распределения

жировой ткани, НОМА-R, содержанием эстрогена, наличием СПКЯ. Большое количество исследований уделяет внимание роли лептина в регуляции репродуктивной функции [13–17]. Лептин – гормон, продуцируемый адипоцитами, выполняющий множество физиологических функций в организме, особенно в период полового созревания и репродукции. Точный механизм, с помощью которого лептин активирует нейроны гонадотропин-рилизинг-гормона, вызывая половое созревание и репродукцию, остается неясным. Учитывая широкое распространение рецепторов лептина в организме, были выдвинуты гипотезы как о центральных, так и о периферических механизмах, затрагивающих гипоталамус-гипофиз-гонадную ось. Лептин необходим для реализации репродуктивной функции, но в избытке он может оказывать пагубное воздействие как на женскую, так и на мужскую репродуктивную систему [17]. В биологии млекопитающих лептин обладает уникальной функцией модулятора энергетического баланса, полового развития и фертильности [18]. В исследовании, проведенном Кусега R и соавт. (2018), выявлен более высокий уровень лептина в фолликулярной жидкости у женщин с ановуляторным бесплодием относительно пациенток, страдающих трубно-перитонеальным бесплодием, эндометриоз-ассоциированным бесплодием и необъяснимым бесплодием. По мнению авторов, данный показатель мог бы стать диагностическим маркером ановуляторного бесплодия [19].

Содержание инсулина у пациенток репродуктивного возраста с ожирением коррелирует со степенью ожирения (ИМТ); характером распределения жировой ткани (абдоминальный тип ожирения); уровнем ЛГ, тестостерона, ДЭАС-с, НОМА-R и лептина. Известно, что инсулин является ключевым метаболическим гормоном, который играет решающую роль в регулировании энергетического гомеостаза в организме. Кроме того, инсулинозависимая передача сигналов выполняет важные функции в репродукции. [20] Наиболее характерна гиперинсулинемия для пациенток с ожирением и СПКЯ. Поми-

мо пониженной чувствительности к инсулину, женщины с СПКЯ также страдают дисфункцией β -клеток. Неблагоприятными репродуктивными последствиями у этих пациенток могут быть ановуляторное бесплодие и увеличение риска гормонозависимого рака эндометрия [21].

По мнению Silvestris E. и соавт. (2018), у женщин с ожирением возникают нарушения в «гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси» и часто наблюдаются нарушения менструальной и репродуктивной функции [22]. Помимо гормональных нарушений и снижения фертильности, которые характерны для синдрома поликистозных яичников (СПКЯ), при ожирении адипоциты действуют как эндокринный орган. Жировая ткань действительно высвобождает ряд биоактивных веществ, а именно адипокинов, которые по-разному взаимодействуют с множеством молекулярных путей инсулинорезистентности, воспаления, гипертензии, сердечно-сосудистого риска, коагуляции, а также дифференцировки и созревания ооцитов. Кроме того, вероятность имплантации и другие репродуктивные функции нарушаются у женщин с ожирением и приводят к бесплодию, невынашиванию, снижению результатов вспомогательных репродуктивных технологий [22]. Напротив, было доказано, что программы по снижению веса за счет изменения образа жизни у полных женщин восстанавливают менструальный цикл и овуляцию, повышают вероятность зачатия [10, 12, 22].

Заключение

Женщины репродуктивного возраста с ожирением характеризуются более высокими значениями ЛГ, тестостерона, эстрадиола, эстрогена, лептина, ИРИ и более низким – уровня ФСГ и прогестерона по сравнению с женщинами с нормальной массой тела. Установлены корреляционные взаимосвязи между гормонами, регулирующими метаболизм, – лептином и инсулином, и половыми гормонами. Указанные гормональные нарушения, по-видимому, лежат в основе расстройств менструальной и репродуктивной функции у этих пациенток.

Литература / References:

1. Murthy AS. Obesity and contraception: emerging issues. *Semin Reprod Med.* 2010;28(2):156-163. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1248141>
2. Hoffmann K, De Gelder R, Hu Y, Bopp M, Vitrai J, Lahelma E, Menvielle G, Santana P, Regidor E, Ekholm O, Mackenbach JP, van Lenthe FJ. Trends in educational inequalities in obesity in 15 European countries between 1990 and 2010. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2017;14(1):63. <https://doi.org/10.1186/s12966-017-0517-8>
3. Newton S, Braithwaite D, Akinyemiju TF. Socio-economic status over the life course and obesity: systematic review and metaanalysis. *PLoS One.* 2017;12(5): e0177151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177151>
4. Wagner KJ, Bastos JL, Navarro A, Boing AF. Socio-economic life course and obesity among adults in Florianopolis, southern Brazil. *Gac Sanit.* 2018;32(3): 244-250. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2017.01.006>

5. Артымук Н.В., Тачкова О.А., Шурыгин С.Н. «Порочный репродуктивный круг» ожирения: обзор литературы. *Доктор. Ру.* 2018;10(154):22-26 [Artyuk NV, Tachkova OA, Shurygin SN. The Reproductive Vicious Cycle of Obesity: Review of the Literature. *Doctor.Ru.* 2018;10(154):22-26. (In Russ.).] <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2018-154-10-22-26>
6. Seif MW, Diamond K, Nickkho-Amiry M. Obesity and menstrual disorders. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2015;29(4):516-527. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.10.010>
7. Broughton DE, Moley KH. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertil Steril.* 2017;107(4):840-847. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.017>
8. Leeners B, Geary N, Tobler PN, Asarian L. Ovarian hormones and obesity. *Hum Reprod Update.* 2017;23(3):300-321. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw045>
9. Van Dammen L, Wekker V, de Rooij SR, Mol BWJ, Groen H, Hoek A, Roseboom TJ. The effects of a pre-conception lifestyle intervention in women with obesity and infertility on perceived stress, mood symptoms, sleep and quality of life. *PLoS One.* 2019;14(2):e0212914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212914>
10. Artyuk NV, Sukhova NA, Tachkova, OA, AlJefout M. The Effect of Balanced Hypocaloric Diet on the Anthropometric and Basic Metabolic Indicators in Infertile Women with Gluteofemoral Obesity. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2019;9(10):1325-1335. <https://doi.org/10.4236/ojog.2019.910128>
11. Тачкова О.А., Артымук Н.В., Сутурин Л.В. Случай беременности и родов после хирургического лечения ожирения. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2018;3(3):97-100 [Tachkova OA, Artyuk NV, Suturina LV. Pregnancy and delivery after surgical treatment of obesity. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2018;3(3):97-100. (In Russ.).] <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-3-3-97-100>
12. Артымук Н.В., Тачкова О.А., Сухова Н.А. Влияние диетотерапии на динамику антропометрических и основных метаболических показателей у бесплодных женщин с ожирением. *Акушерство, гинекология и репродукция.* 2020;14(1):7-14 [Artyuk NV, Tachkova OA, Sukhova NA. The effect of diet therapy on the anthropometric and metabolic parameters in women with infertility and obesity. *Akusherstvo, ginekologiya i reprodukcija = Obstetrics, Gynecology and Reproduction.* 2020;14(1):7-14. (In Russ.).] <https://doi.org/10.17749/2313-7347.2020.14.1.7-14>
13. Uygun B, Kiyici S, Ozmen S, Gul Z, Sigirli D, Cavun S. The Association Between Olfaction and Taste Functions with Serum Ghrelin and Leptin Levels in Obese Women. *Metab Syndr Relat Disord.* 2019;17(9):452-457. <https://doi.org/10.1089/met.2019.0037>
14. Malik IA, Durairajanayagam D, Singh HJ. Leptin and its actions on reproduction in males. *Asian J Androl.* 2019;21(3):296-299. https://doi.org/10.4103/aja.aja_98_18
15. Mishra S, Gupta V, Mishra S, Sachan R, Asthana A. Serum level of orexin-A, leptin, adiponectin and insulin in north Indian obese women. *Diabetes Metab Syndr.* 2017;11 Suppl 2:S1041-S1043. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.07.037>
16. Farr OM, Gavrieli A, Mantzoros CS. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22(5):353-359. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000184>
17. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine.* 2017;98:51-58. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2016.10.011>
18. Zhang Y, Chua S Jr. Leptin Function and Regulation. *Compr Physiol.* 2017;8(1):351-369. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160041>
19. Kucera R, Babuska V, Ulcova-Gallova Z, Kulda V, Topolcan O. Follicular fluid levels of anti-Müllerian hormone, insulin-like growth factor 1 and leptin in women with fertility disorders. *Syst Biol Reprod Med.* 2018;64(3):220-223. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1450906>
20. Laskowski D, Sjunnesson Y, Humblot P, Andersson G, Gustafsson H, Båge R. The functional role of insulin in fertility and embryonic development-What can we learn from the bovine model?. *Theriogenology.* 2016;86(1):457-464. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.062>
21. Macut D, Bjekić-Macut J, Rahelić D, Doknić M. Insulin and the polycystic ovary syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;130:163-170. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.06.011>
22. Silvestris E, de Pergola G, Rosania R, Loverro G. Obesity as disruptor of the female fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):22. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0336-z>

Сведения об авторах

Артымук Наталья Владимировна, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии имени профессора Г.А. Ушаковой ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а).

Вклад в статью: идеология и дизайн исследования, оформление публикации.

ORCID: 0000-0001-7014-6492

Тачкова Ольга Анатольевна, к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а).

Вклад в статью: идеология и дизайн исследования, редактирование публикации.

ORCID: 0000-0002-6537-3460

Сухова Наталья Александровна, к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а).

Вклад в статью: сбор и статистическая обработка данных.

ORCID: 0000-0002-8824-7213

Статья поступила: 23.08.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Prof. Natalia V. Artyuk, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation)

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-7014-6492

Dr. Olga A. Tachkova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Internal Medicine and Clinical Pharmacology, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation)

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-6537-3460

Dr. Natalia A. Sukhova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Internal Medicine and Clinical Pharmacology, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation)

Contribution: collected and processed the data.

ORCID: 0000-0002-8824-7213

Received: 23.08.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-85-97>

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ МИКРОДИАЛИЗА ГОЛОВНОГО МОЗГА И СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕЙРОБИОЛОГИИ И НЕЙРОХИМИИ

ХАРИТОНОВА Е.В.^{1*}, ЛОПАТИНА О.Л.^{1,2}, МАРЧЕНКО С.А.¹, ГОРИНА Я.В.¹, САЛМИНА А.Б.¹

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск, Россия

²ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

Резюме

Благодаря своей универсальности микродиализ представляет собой популярный метод, используемый в различных областях, особенно в фармакологии, неврологии и биомедицинских исследованиях. Потенциальная и ценная роль этого метода заключается в использовании этой техники в качестве локального устройства для взятия проб и решения задач метаболизма, тем самым обнаружения молекул-маркеров и следов фармакотерапевтических вмешательств. В настоящее время микродиализ чаще используется в качестве метода сбора или распределения определенного вещества в определенном месте. Этот метод успешно применяется в различных исследованиях, где необходим отбор несвязанных эндогенных и экзогенных веществ из внеклеточной жидкости широкого спектра тканей организма, доставка лекарств в ткани-мишени и даже в качестве инструмента для мониторинга веществ в тканевой инженерии. Микродиализ является малоинвазивным средством обеспечения практически непрерывного измерения метаболизма любого органа или ткани, в том числе и головного мозга, который позволяет обнаружить признаки клеточного дистресса до системных проявлений. Церебральный микродиализ является безопасным методом мониторинга региональной биохимии мозга. Анализ биологической жидкости центральной нервной системы может помочь в принятии кли-

нических решений, ориентировать фармакотерапию и помочь в прогнозировании результатов лечения пациентов. Межклеточные взаимодействия, влияния гормонов, цитокинов, нейромедиаторов, продукция внеклеточной жидкости (в том числе и ликвора), а также площадь и тип поверхности мембраны направляющей канюли, скорость подачи изотонической жидкости, которая регулируется шприцевым и плунжерным насосами, влияют на финальные концентрации целевых компонентов в диализате. Вышеперечисленные параметры тесно связаны между собой и при их несоблюдении в процессе анализа впоследствии могут быть выявлены неточности. В данной публикации рассматриваются основные аспекты и параметры, которые могут оказать влияние на процесс сбора анализа и его содержание, а также области применения микродиализа в нейробиологии и нейрохимии.

Ключевые слова: микродиализ, головной мозг, нейродегенеративные заболевания, нейробиология, нейрохимия

Конфликт интересов

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

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-2547.2020.7).

Для цитирования:

Харитонов Е. В., Лопатина О. Л., Марченко С. А., Горина Я. В., Салмина А. Б. Основные принципы микродиализа головного мозга и современные возможности его применения в экспериментальной нейробиологии и нейрохимии. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3):85-97. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-85-97>

*Корреспонденцию адресовать:

Харитонов Е.В. и др.
Харитонов Е.В. и др., 660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1, e-mail: ekaterinav1201@gmail.com

REVIEW ARTICLE

BRAIN MICRODIALYSIS IN NEUROBIOLOGY
AND NEUROCHEMISTRYEKATERINA V. KHARITONOVA¹ **, OLGA L. LOPATINA^{1,2}, SERGEY A. MARCHENKO¹, YANA V. GORINA¹, ALLA B. SALMINA¹¹Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation²Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

English ►

Abstract

Microdialysis is a versatile and popular minimally invasive technique which enables sampling, collecting, and continuous measurement of small-molecular-weight substances in the extracellular fluid of virtually any tissue. Widely established in pharmacology and neuroscience, it permits evaluation of the metabolism in any organ including brain and allows early detection of the cell stress. Concentrations of the target analytes in the dialysate are determined by the type of the analysed tissue, paracrine interactions, and technical features such as membrane type and surface area or flow rate of isotonic fluid. Cerebral (or brain) microdialysis can be used

in personalised pharmacotherapy and prognostication in patients with neurological disorders. Here we discuss recent advances in brain microdialysis and focus on critical parameters defining its efficiency.

Keywords: brain microdialysis, neuroscience, neurodegenerative diseases, neurobiology, neurochemistry.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

This work was supported by a Grant of the President of the Russian Federation for State Support of Leading Research Schools of the Russian Federation (RS-2547.2020.7).

For citation:

Ekaterina V. Kharitonova, Olga L. Lopatina, Sergey A. Marchenko, Yana V. Gorina, Alla B. Salmina. Brain microdialysis in neurobiology and neurochemistry. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3):85-97. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-85-97>

****Corresponding author:**

Ekaterina V. Kharitonova, 1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022, e-mail: ekaterinav1201@gmail.com

© Ekaterina V. Kharitonova et al.

Введение

Микродиализ – один из современных методов получения биологической жидкости (внеклеточная жидкость) из ткани в процессе функционирования организма с последующим анализом компонентного состава жидкости. Принципиальной основой метода является проникновение аналита путём простой диффузии в перфузируемую жидкость (перфузат, изотоническая жидкость) с формированием анализируемой смеси – диализата [1].

Впервые эта техника была разработана в конце 1950-х годов и использована для изучения концентрации нейротрансмиттеров в ткани головного мозга у крыс [2,3]. Позднее этот метод был переработан и усовершенствован для исследования эндогенных и экзогенных соединений во внеклеточной жидкости различных тканей. Метод микродиализа не ограничивается исследованиями *in vivo*, он также использу-

ется для отбора проб в исследованиях *in vitro* [4].

Особую актуальность приобрел этот метод исследования в экспериментальной нейробиологии, нейрохимии, а также клинической медицине, например, нейрохирургии. Помимо того, что этот метод популярен для оценки уровня нейротрансмиттеров и метаболитов, в том числе, например, бета-амилоида при хронической нейродегенерации [5], в экспериментальной нейрохимии этот метод пригоден для оценки субклеточного метаболома, например, продукции лактата и пирувата в реакциях гликолиза, а также генерации промежуточных метаболитов цикла трикарбоновых кислот, что совокупно отражает энергетическую функцию митохондрий и является чувствительным способом оценки (гипо)метаболизма головного мозга. В клинической практике наибольшее распространение получил анализ спинномозго-

вой жидкости, полученной методом микродиализа головного мозга, позволяющий оценивать продукцию лактата, утилизацию глюкозы [6], продукцию цитокинов [7], аккумуляцию бета-амилоида [8].

Кроме сбора анализа, этот метод применяют как средство доставки вещества в обозначенную зону [9, 10, 11] и используют для изучения распределения лекарственного средства в тканях *in vivo*, концентрации на целевом участке, что дает возможность сопоставления содержания лекарственного препарата и фармакологических эффектов. Микродиализ позволяет повысить эффективность фармакокинетических измерений, полагаясь на дискретные образцы биологической жидкости.

Стоит отметить, что микродиализ сочетается с высокочувствительными аналитическими методами, которые позволяют количественно определять низкие концентрации в образцах малого размера [12]. Для точной идентификации соединений из современных обычно используют высокоэффективную жидкостную хроматографию, иммуоферментный анализ [13], электрофорез на микрочипах [14, 15], измерение активности ферментов [16], различные электрохимические методы [17], а также метод масс-спектрометрии прямого введения [18].

В целом микродиализ является высокочувствительным методом [9], отличается разнообразием микродиализных канюлей и множеством других возможных модификаций процесса [13, 19], в том числе в контексте использования поведенческих реакций в качестве стимулов к выработке гормонов и других потенциальных аналитов, с целью выявления зависимости картины метаболизма от экзогенных факторов при проведении экспериментов в области нейробиологии поведения [20].

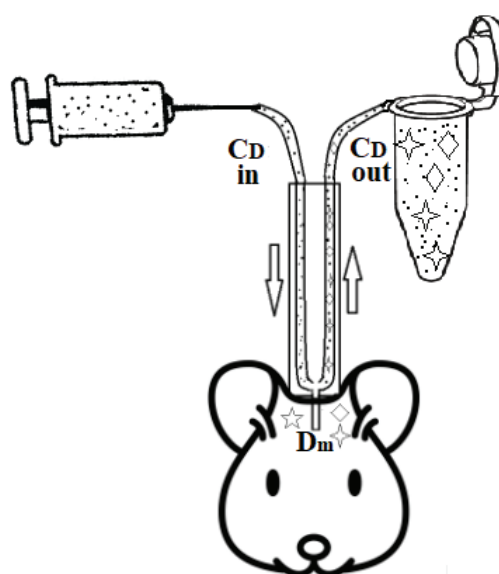


Рисунок 1.

Принцип работы метода микродиализа. С – концентрация аналита (in – входящего, out – исходящего); D – коэффициент диффузии (m – через мембрану).

Figure 1.

General principle of the microdialysis technique. CD in (inlet) – analyte concentration in the perfusate, CD out (outlet) – analyte concentration in the dialysate, Dm – membrane diffusion coefficient.

В основе метода лежит принцип простой диффузии – молекулы диффундируют из интересующего объекта в непрерывно текущую изотоническую жидкость через полупроницаемую мембрану направляющей канюли (рисунки 1) [21–23].

Типичная установка для системы микродиализа включает в себя шприцевой и перистальтический насосы, регулирующие постоянную скорость подачи и забора изотонической жидкости и диализата соответственно, прозрачный бокс для нахождения животного и наблюдения за ним, направляющую канюлю (зонд) для микродиализа, фракционный коллектор с системой охлаждения и соединительные трубки (капилляры) (рисунки 2) [9].

Одним из наиболее важных компонентов микродиализа является микродиализный зонд [11, 24]. Смысл применения направляющей канюли заключается в том, чтобы имитировать кровеносный сосуд (капилляр) [25]. На конце зонда

Рисунок 2.

Типичная установка для микродиализа. 1 – шприцевой насос; 2 – прозрачный бокс для экспериментального животного; 3 – перистальтический насос; 4 – коллектор с системой охлаждения; 5 – направляющая канюля (микродиализный зонд).

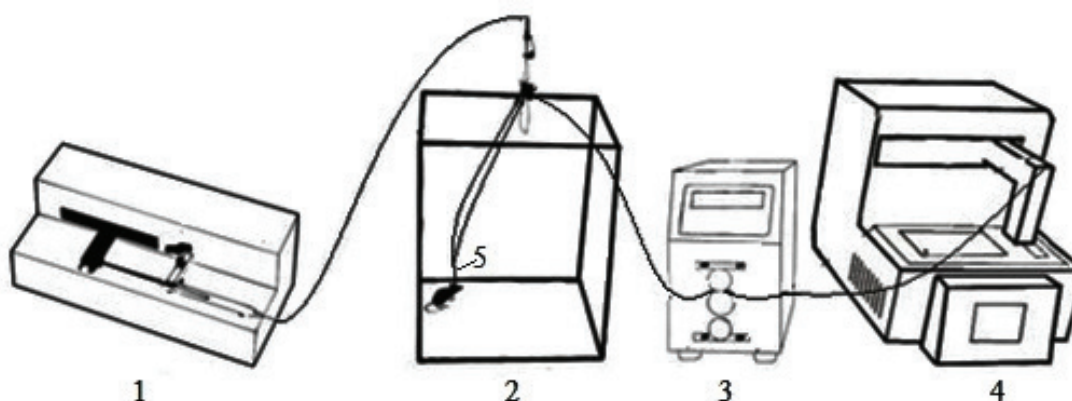


Figure 2.

Typical microdialysis setup. 1 – syringe pump; 2 – transparent box for an experimental animal; 3 – peristaltic pump; 4 – cooling collector; 5 – guide cannula (microdialysis probe).

находится полунепроницаемая мембрана, которая является ее основным «рабочим» элементом (**рисунок 3**). При достижении изотонической жидкости мембранного участка зонда происходит пассивный транспорт веществ из межклеточной жидкости в полость катетера по градиенту концентрации. Таким образом фактически достигается воспроизведение механизма диффузии внеклеточной жидкости в просвет микрососуда, но, разумеется, не учитываются возможные механизмы транспорта, существующие в естественных условиях, порозность мембраны и изменения ее структурной целостности под действием (пато)физиологических факторов.

Рисунок 3.

Схематичное изображение универсального зонда для микродиализа. 1 – капилляр на «вход» для перфузата; 2 – капилляр на «выход» для диализата; 3 – посредник; 4 – полунепроницаемая мембрана.

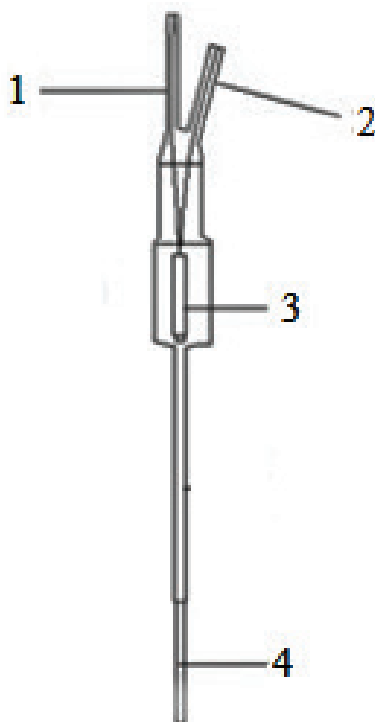


Figure 3.

Schematic representation of a microdialysis probe. 1 – inlet capillary for the perfusate; 2 – outlet capillary for the dialysate; 3 – adapter; 4 – semi-impermeable membrane.

В целом надо учитывать, что имитация проницаемости микрососуда головного мозга применением микродиализной мембраной до сих пор не может быть достигнута. Это, прежде всего, связано с тем, что гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является высокоселективным полупроницаемым физиологическим барьером, обеспечивающий постоянную и оптимальную химическую среду в паренхиме головного мозга, тем самым играя важную роль в поддержании гомеостаза в ткани [26]. Особую значимость механизмы обеспечения структурно-функциональной целостности ГЭБ приобретают при хронической нейродегенерации, нейровоспалении, острой ишемии и реализа-

ции феномена эксайтотоксичности [27-29].

Однако ограниченность знаний о механизмах регуляции проницаемости ГЭБ в норме и при патологии и недоступность материалов, воспроизводящих параметры проницаемости барьера, в том числе измененные при патологии головного мозга, ограничивают возможности по применению технологии микродиализа для решения вопросов управления проницаемостью ГЭБ, причем это ограничение справедливо и при применении микродиализного подхода в реконструируемых моделях ГЭБ *in vitro* [30].

Направляющая канюля способна пропускать соединения определённой молекулярной массы и в соответствующих концентрациях в ее внутреннее пространство. Способность к пропусканию веществ определяется специальной величиной MWCO (molecular weight cut-off, «граница отсева задерживаемых компонентов по молекулярному весу»), которая обозначает молекулярную массу условного вещества, при которой 90% его массы задерживается мембраной [9, 10]. Чаще всего коммерчески доступные мембраны имеют MWCO порядка 20-100 кДа, однако бывают мембраны и большего значения этих величин [9].

На проницаемость и «собирающую способность» мембраны в отношении целевого компонента влияют различные особенности: ее поверхностная энергия, полярность, заряд и структурные характеристики. Последние должны повторять особенности материала имплантата, клеточных стенок, поверхностей биосенсоров или фильтрационных мембран. Материалы подбираются также с учётом веществ, которые будут проходить сквозь отверстие. Belfort и др. установили, что неполярные поверхности дестабилизируют белки и таким образом вызывают конформационные изменения, приводящие к тесным взаимодействиям внутренних и наружных частей белковой молекулы [31].

Главной особенностью метода микродиализа является способность к сбору анализов при контроле лишь скорости потока. Для предотвращения эффекта ультрафильтрации (процесса переноса анализов через мембрану с использованием изменения давления в системе, наличие которого можно определить по «запотеванию» зонда) в отдельных случаях акцентируют внимание на давлении, которое может быть разным на внутренней и внешней границах мембраны [13].

Если представить микродиализ в виде некоторой последовательности действий, то его условно можно разделить на два этапа: операцию по установке канюли и собственно сбор диализата.

Установка канюли производится с помощью стереотаксического аппарата, который представляет собой прибор с направляющим штативом, способным быть сориентированным в соответствии с принятой системой координат. При этом в череп имплантируется направляющая канюля, которая обеспечивает доступ перфузата в заданную область. Стоит отметить, что происходит нарушение функционирования целевого отдела, сопровождающееся разрушением капилляров, сосудов, образованием ишемического очага [32] либо очага локального нейровоспаления, вследствие чего наблюдается дисбаланс концентраций различных метаболитов, искажается состав внеклеточной жидкости (в нем появляются продукты разрушенных клеток, провоспалительные цитокины, продукты окислительного повреждения белков и липидов). Вследствие вышеперечисленных причин необходимы поправки к концентрациям метаболитов из нарушенной области, что обычно достигается применением достаточного периода времени после установки канюли для редуцирования процессов воспаления и ишемии.

Однако нарушения физиологических параметров являются не единственной причиной применения поправок к исследуемому образцу диализата. С течением времени через мембрану проходит определённое количество вещества, что является причиной истощения концентрации метаболита в окружающей ткани [10]. Если время наблюдения достаточно велико, то это может привести к ложным заключениям о динамике секреции тех или иных нейротрансмиттеров или нейропептидов. Следует принимать во внимание и скорость потока, площадь мембраны, через которую происходит диффузия, эффективную проницаемость мембраны. Одним из основных параметров является безразмерная величина эффективности восстановления аналита – «относительное восстановление». Данный термин отражает эффективность забора аналита из межклеточного вещества, которая уменьшается при возрастании скорости потока и сопротивления внутри мембраны.

Во время процесса микродиализа вещества перемещаются через три среды, каждая

из которых имеет различный состав: перфузат, мембрану и межклеточную среду (ткань). Факторы, которые определяют диффузию, будут изменяться в каждой среде и, соответственно, уровни концентрации целевого компонента будут отличаться тоже. Следовательно, диффузионные характеристики вещества в каждой среде должны рассматриваться отдельно.

Изменения в межклеточной концентрации аналита (E_d) могут проявляться как увеличение или уменьшение концентрации диализата в анализе. Следовательно, изменения концентрации диализата не обязательно означают, что внеклеточная концентрация изменилась. Снижение эффективности восстановления может означать снижение относительного восстановления или увеличение радиального расстояния между ненарушенной тканью и зондом, а его увеличение может означать увеличение относительного восстановления или уменьшение радиального расстояния между ненарушенной тканью и зондом. В большинстве обычных вариантов интерпретации результатов микродиализа основное предположение заключается в том, что E_d остаётся неизменным в течение сбора диализата, поэтому любое изменение концентрации диализата интерпретируется как изменение внеклеточной концентрации [33].

Существует также понятие «эффективной проницаемости». Его физический смысл состоит в способности проникновении целевого компонента через мембрану из внешней среды, без учёта вещества аналита, потерянного для диализата в силу различных причин (выход аналита обратно во внешнюю среду, его адгезия к веществу мембраны и т.д.) [34].

Эффективная проницаемость мембраны выводится из понятия «чистоты диализа» (т. е. его «продуктивности») (CL_D), которая равна произведению относительного восстановления и скорости потока. Для получения «чистого» диализата необходимо выполнение следующих требований: мембрана цилиндрическая полупроницаемая и состоит из гомогенного материала; скорость потока микродиализа неизменна с течением времени; отсутствуют конвекционные потоки внутри системы «зонд-окружающие ткани»; существует как приток аналита внутрь канюли, так и его отток.

Кроме того, следует знать, каким образом осуществляется калибровка системы для на-

хождения оптимальной скорости потока с приемлемым коэффициентом восстановления.

Если представить себе общий смысл проводимых манипуляций, то все они сводятся к измерению концентрации восстановленного анализита при определённой(-ых) скорости(-ях) потока.

Одним из способов является метод медленного (нулевого) потока [9]: при нём производится забор диализата при «ультранизких» скоростях потока порядка 0,1-0,3 мкл/мин. При столь низкой интенсивности тока жидкости коэффициент восстановления стремится к 100%. Метод нулевого потока сводится к нахождению точки отсутствия изменения концентрации анализита, которая находится по обнаружению её изменения между диализатом и перфузатом. При этом строится график зависимости между концентрациями анализита в межклеточной жидкости и разницей его концентраций в диализате и перфузате. Соответственно упомянутая точка отражает концентрацию вещества в исследуемой среде. Следует, однако, иметь в виду, что данный метод нежелательно использовать для исследований *in vivo* из-за изменения в концентрации целевого соединения в окружающем пространстве.

Динамический метод нулевого потока предполагает, в отличие от описанного выше, использование группы животных для калибровки, которые формируются в зависимости от используемой концентрации анализита. В этом случае строится график зависимости концентрации от прошедшего времени. Этот метод пригоден для оценки влияния введённых в орган соединений на уровень других веществ.

Микродиализ по праву называют доминирующим методом для изучения центральной нервной системы *in vivo*. Универсальность микродиализа позволяет использовать его для изучения клеточно-молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза многих неврологических заболеваний, эффектов лекарств, внешних факторов, а также реализации сложных форм поведения и когниции [35].

Мониторинг метаболизма головного мозга с помощью внутримозгового микродиализа дает возможность предсказывать вторичные повреждения и может сопутствовать принятию решений относительно вмешательств, влияющих на исход заболеваний. Тем не менее, внутримозговой микродиализ является локальной методикой измерения, которая зависит от уста-

новки зонда вблизи очага поражения. Непрерывное использование этой методики предоставляет информацию об общем метаболизме мозга.

В последние два десятилетия появились многочисленные примеры эффективного использования метода микродиализа головного мозга при изучении функционирования головного мозга в норме и при экспериментальной патологии центральной нервной системы. Например, результаты микродиализа свидетельствуют об уменьшении концентрации свободного фенитоина – противоэпилептического препарата в мозге крыс при дисфункции ГЭБ [36, 37]. Крысам линии Wistar с искусственно вызванной моделью аутизма имплантировали микродиализную канюлю в головной мозг для исследования концентраций нейротрансмиттерных аминокислот (глутамата, глутамина и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и дальнейшим анализом с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [38].

Heidrun Potschka и др. изучали ингибирующее влияние верапамила на концентрацию Р-гликопротеина – одного из транспортеров для фенобарбитала, ламотриджина и фельбамата в головной мозг, сверхэкспрессия которого значительно снижает их биодоступность. Перфузию верапамила в кору головного мозга крысам осуществляли с использованием микродиализного зонда. В собранной межклеточной жидкости отмечалось увеличение противоэпилептических лекарственных средств, что подтверждает ингибирующий эффект верапамила на Р-гликопротеина, тем самым повышает биодоступность данной группы препаратов в мозге [39].

Для изучения количественной информации о доставке метотрексата и его липосомальных композиций в мозг в исследовании [40] применяли микродиализ. Для создания жирорастворимых форм использовали два вида фосфолипидов: 1 – гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (hydrogenated soy phosphatidylcholine, HSPC) и 2 – фосфатидилхолин яичный желток (egg-yolk phosphatidylcholine, EYPC). Самцам крыс устанавливали направляющую канюлю в стриатум, после чего помещали в специальный бокс, где животное могло свободно перемещаться. Эксперимент проводили через 24 часа после операции. Скорость подачи перфузата равнялась 0,5 мкл/мин. Собранная меж-

клеточная жидкость анализировалась путем применения ВЭЖХ с tandemной масс-спектрометрией. Физико-химический анализ продемонстрировал, что концентрация композиции метотрексата-EYPC была выше в 3 раза в межклеточной жидкости мозга, в то время как метотрексат-HSPC не показал статистически достоверного повышения биодоступности относительно введения самого метотрексата.

Применение микродиализа *in vivo* в эксперименте на мышах предоставило возможность доказать участие аквапорины-4 (AQP4) – белка, образующего водопроводящие каналы в клетках периваскулярной астроглии, в регуляции высвобождения нейромедиаторов. Были изучены изменения в выбросах нейротрансмиттеров в стандартных условиях и после стимуляции высокими концентрациями K(+) полосатого тела мышей дикого типа и AQP4-нокаутированных животных. Через 24 часа после деполяризующего стимула секреция нейротрансмиттеров не изменялась и была аналогичной у всех животных, за исключением таурина. Тем не менее, внеклеточная концентрация дофамина и его метаболитов были значительно увеличены у нокаутированных грызунов с последующим снижением или отсутствием реакции на деполяризующие раздражители при измерении через 7 дней после операции [41].

Для выявления влияния локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга на динамику отложения β -амилоида (A β) при болезни Альцгеймера Wakabayashi T. и соавт. стереотаксически имплантировали направляющую канюлю с мембраной (30 кДа MWCO) в левый гиппокамп мышей. Образцы собирали каждый час, после чего были анализированы с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) [42].

Используя метод микродиализа *in vivo*, авторы работы [43] установили, что именно липопротеин ApoE4 у мышей увеличивает период полувыведения A β в мозге при нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Уровни нейротрансмиттеров (дофамина, серотонина, норадреналина, гомованиловой кислоты и норметанефрина) и их метаболитов были изучены *in vivo* в диализатах, полученных от крыс с кетаминевой моделью шизофрении. Образцы собирали у свободно движущихся животных с имплантированными канюлями в область стриатума (полосатое тело)

мозга. Биологический материал немедленно замораживали на сухом льду (-70° C) до момента востребования. Количественное определение проводили с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектированием [44].

Для изучения роли и влияния инотропных глутаматных рецепторов (AMPA-R), на уровни β -амилоидов, которые непосредственно влияют на возникновение болезни Альцгеймера, авторы исследования [45] использовали микродиализ *in vivo* на мышинной модели APP/PS1. Направляющую канюлю имплантировали стереотаксически в левый гиппокамп и закрепили с помощью зубного цемента. Капилляры и зонды перфузировали искусственной спинномозговой жидкостью, содержащей 0,15% бычьего сывороточного альбумина (скорость 0,5 мкл/мин). Nettinger J.C. с соавторами, используя шприцевой насос, вводили α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовую кислоту (AMPA) и одновременно собирали интерстициальную жидкость для анализа A β с помощью перистальтического насоса. В конце эксперимента все образцы межклеточной жидкости анализировали на уровни A β x-40 или A β x-42 с помощью ИФА.

Авторы работы [46] разработали автоматизированный метод онлайн-сбора и количественного определения нейропептидов в микродиализатах мозга крыс. Межклеточная жидкость, собранная из гиппокампа, была изучена количественно использованием tandemной масс-спектрометрии и капиллярной жидкостной хроматографии (cLC-MS). Количественное определение концентраций нейропептидов лей-энкефалина и мет-энкефалина в диализате гиппокампа крыс анализировали с использованием деметилирования их на колонке.

Установлено, что сочетание методов микродиализа и ВЭЖХ в тандеме с масс-спектрометрией позволяет проводить одновременный и непрерывный количественный анализ нейроактивных веществ в биологической жидкости гиппокампа и плазме, изучая при этом терапевтический эффект активного целевого соединения на бодрствующих ишемизированных крысах [47].

Тканевая инженерия и регенеративная медицина для исследования и восстановления нервной системы предоставляют новые перспективные направления, прогресс в которых обусловлен новыми технологическими

возможностями в создании микрофизиологических систем в формате brain-on-chip или blood-brain barrier-on-chip [48, 49].

Не менее интересные возможности открывает применение подхода, сочетающего сбор образца с помощью метода микродиализа головного мозга и определение концентрации веществ в микрочипах, ассоциированных с зондом, например, для автоматического мониторинга концентрации серотонина и малонового диальдегида в разных регионах головного мозга [50] или для регистрации концентрации глутамата в активных зонах головного мозга [51]. Samper и др. изготовили 3D-печатную микрожидкостную биосенсорную платформу для записи on-line нейрохимических изменений в мозге человека. Система базировалась на методе микродиализа – для сбора и обнаружения нейротрансмиттеров и других молекул в межклеточной жидкости ткани, и электрохимических биосенсоров – для контроля различных биомаркеров. Используя это микрофлюидное устройство совместно с методом микродиализа, можно было обнаружить изменения концентрации переходного метаболита, а также динамическое изменение целевых компонентов в мозге живого человека в режиме реального времени впервые [52].

Другое направление совершенствования метода микродиализа головного мозга основано на разработке миниатюрных зондов, как это было сделано в работе [53]: зонд 140 на 140 микрометров позволяет обеспечивать сбор перфузата по 20 3-микрометровым каналам, что обеспечивает площадь диффузии 1200 квадратных микрометров.

Еще одно перспективное направления в развитии метода микродиализа головного мозга связано с его применением для оценки функционирования субклеточных органелл. Так, например, оценка уровней лактата и пирувата позволила исследователям [54] оценить развитие митохондриальной дисфункции в клетках головного мозга голубей при химической гипоксии. Изучение особенностей реализации реакций цикла трикарбоновых кислот в клетках головного мозга, а также влияния различных нейротрансмиттеров на энергетическую функцию митохондрий достижимо в эксперименте с применением метода микродиализа [19]. Не менее интересным является исследование функциональной активности митохондрий клеток головного мозга эксперимен-

тальных животных с применением метода микродиализа и ^{13}C -меченых метаболитов цикла трикарбоновых кислот, в том числе на фоне церебральной ишемии, индуцированной эндотелином-1 [55]. В клинической практике определение отношения уровней лактата и пирувата во внеклеточной жидкости головного мозга позволяет оценить повреждение митохондрий [56, 57].

Универсальный характер метода микродиализа позволяет широко использовать этот протокол в биомедицинских и клинических исследованиях. Тем не менее, чтобы использовать преимущества микродиализа, необходимо в полной мере учесть немалое количество параметров для минимизации ошибок и предотвращения погрешностей. Метод микродиализа в медицинской практике может быть совмещен с различными приспособлениями для детектирования того или иного типа нейротрансмиттеров. Однако предпочтение отдается tandem-ной масс-спектрометрии (МС/МС), которая часто используется для анализа. В этом методе задается «интересующий» целевой компонент для анализа, который фрагментируется масс-спектрометром, что в итоге приводит к увеличению селективности, количественной оценке и чувствительности по сравнению с одностадийными измерениями МС [35].

Повреждения, происходящие на клеточном и молекулярном уровнях, уклоняются от обнаружения с помощью обычного гемодинамического мониторинга и неврологического обследования. Церебральный микродиализ является инвазивным средством обеспечения почти непрерывного измерения метаболизма любого отдела головного мозга (**таблица 1**) и перспективным инструментом, который может обнаружить признаки клеточной патологии до системных проявлений заболевания [36].

Этот метод развивался с разработкой высокочувствительных аналитических методов, позволяющих количественно определять низкие концентрации в образцах малого размера. Потенциальная и ценная роль этого метода может заключаться в использовании метода в качестве локального устройства для отбора проб в метаболомике. Тем не менее, выбор подходящего метода должен быть тщательно продуман, поскольку чувствительность и специфичность имеют решающее значение при измерении этих медиаторов в образцах микродиализа с ограниченным объемом [12].

№	Объект исследования <i>Animal model</i>	Особенности микродиализа (технологические) <i>Microdialysis parameters</i>	Исследуемый регион головного мозга <i>Region of interest</i>	Вид патологии <i>Neurological disorder</i>	Регистрируемые данные <i>Analytes</i>	Источник информации <i>Reference</i>
1	Мыши (самцы) и AQP4-нокаутированные мыши <i>Male mice and AQP4-knockout mice</i>	Скорость подачи перфузата 2 мкл/мин; Образцы собирали каждые 20 мин, в течении 2 ч <i>Perfusate flow rate 2 µL/min</i> <i>Sample collection every 20 min for 2 h</i>	Стриатум <i>Striatum</i>	–	Аминокислоты (аспартат, глутамат, таурин и др.) Моноамины (допамин, 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота и др.) <i>Amino acids (aspartate, glutamate, taurine etc.) Monoamines (dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, etc.)</i>	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394007007100?via%3Dihub
2	Трансгенные мыши A7 (A7-Tg) <i>Transgenic mice A7 (A7-Tg)</i>	Скорость подачи перфузата 1 мкл/мин Образцы собирали каждые 60 мин после 24-часового перфузирования искусственной спинномозговой жидкостью <i>Perfusate flow rate 1 µL/min. Sample collection every 60 min after 24 hour-perfusion with artificial cerebrospinal fluid</i>	Левый гиппокамп <i>Left hippocampus</i>	Болезнь Альцгеймера <i>Alzheimer's disease</i>	Aβ	https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-019-0315-7
3	Мыши <i>Mice</i>	Скорость подачи перфузата 0,5 мкл/мин Образцы собирали каждые 3 часа/ <i>Perfusate flow rate 0.5 µL/min</i> <i>Sample collection every 3 hours</i>	Левый гиппокамп <i>Left hippocampus</i>	Болезнь Альцгеймера <i>Alzheimer's disease</i>	Aβ ₁₋₄₀ Aβ ₁₋₄₂ /	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5952376/
	Гемизиготные мыши APPswe/PS1ΔE9 (APP/PS1) APPswe / PS1ΔE9 (APP / PS1) hemizygous mice	Скорость подачи перфузата 1 мкл/мин Образцы собирали каждые 90 мин/ <i>Perfusate flow rate 1 µL/min</i> <i>Sample collection every 90 min</i>				
	Мыши IL-6 ^{-/-} IL-6 ^{-/-} mice	Скорость подачи перфузата 1 мкл/мин Образцы собирали каждые 2,5 часа <i>Perfusate flow rate 1 µL/min</i> <i>Sample collection every 2.5 hours</i>				
4	Крысы <i>Rats</i>	Скорость подачи перфузата 2 мкл/мин; Объем пробы 60 мкл (2 шт) Время на анализ 60 мин/ <i>Perfusate flow rate 2 µL/min</i> <i>Sample volume 60 µL (2 pcs) Analysis time 60 min</i>	Миндалевидное тело <i>Amygdala</i>	Дисфункция ГЭБ, Эпилептические припадки <i>Blood-brain barrier dysfunction, epileptic seizures</i>	Проникновение фенитоина во внеклеточную жидкость головного мозга <i>Penetration of phenytoin into the brain extracellular fluid</i>	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390811002620?via%3Dihub
5	Крысы (самцы) <i>Male rats</i>	Скорость подачи перфузата 0,5 мкл/мин; Объем пробы 15 мкл Время на анализ 30 мин/ <i>Perfusate flow rate 0.5 µL/min</i> <i>Sample volume 15 µL</i> <i>Analysis time 30 min</i>	Стриатум <i>Striatum</i>	–	Концентрация метотрексата в межклеточной жидкости <i>Concentration of methotrexate in the intercellular fluid</i>	https://jpharmsci.org/article/S0022-3549(17)30166-1/fulltext

Таблица 1.

Сводные данные некоторых экспериментальных исследований по изучению метаболизма головного мозга на грызунах методом микродиализа

Table 1.

Summary of the experimental studies on brain metabolism in rodents by microdialysis

6	Крысы Wistar (самцы) Male Wistar rats	Скорость потока 1 мкл/мин Образцы собирали после 60-ти минутного перфузирования искусственной спинномозговой жидкостью/ Perfusate flow rate 1 μ L/min Sample collection after 60 minutes of perfusion with artificial cerebrospinal fluid	Скорлупа Putamen	–	Фармакокинетика ремоксиприда/ Pharmacokinetics of Remoxipride	https://link.springer.com/article/10.1008%2Fs12248-016-0002-3
7	Крысы Wistar (самки) Female Wistar rats	Скорость подачи перфузата 2 мкл/мин; Объем пробы 40 мкл (2 шт) Время на анализ 60 мин/ Perfusate flow rate 2 μ L/min; Sample volume 40 μ L (2 pcs) Analysis time 60 min	Моторная кора Motor cortex	Эпилептические припадки Epileptic seizures	Влияние верапамила на концентрацию Р-гликопротеина/ The effect of verapamil on the concentration of P-glycoprotein	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394002004238?via=ihub
8	Крысы Wistar (обоих полов) Male and female Wistar rats	Скорость подачи перфузата 2 мкл/мин Объем пробы 80 мкл Образцы собирали через 30 мин после имплантации направляющей канюли каждые 40 мин в течение 4 часов Perfusate flow rate 2 μ L/min Sample volume 80 μ L Sample collection 30 minutes after implantation of the guide cannula every 40 minutes for 4 hours.	Правый гиппокамп Right hippocampus	Аутизм Autism	Глутамат, глутамин, ГАМК/ Glutamate, glutamine, GABA	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00418/full
9	Крысы Sprague-Dawley (самцы) Male Sprague-Dawley rats	Скорость подачи перфузата 1,5 мкл/мин; Объем пробы 30 мкл Образцы собирали каждые 20 мин, после 3-часового перфузирования искусственной спинномозговой жидкостью Perfusate flow rate 1.5 μ L/min Sample volume 30 μ L Sample collection every 20 min after 3-hour perfusion with artificial cerebrospinal fluid.	Стриатум Striatum	Кетамин-модель Шизофрении Ketamine model of schizophrenia	Концентрации допамина, серотонина, норадреналина и уровни их метаболитов/ Concentrations of dopamine, serotonin, noradrenaline and levels of their metabolites	https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-020-05484-1
10	Крысы Sprague-Dawley (самцы) Male Sprague-Dawley rats	Скорость подачи перфузата 0,5 мкл/мин Образцы собирали через 30 мин после имплантации направляющей канюли Perfusate flow rate 0.5 μ L/min Sample collection 30 minutes after implantation of the guide cannula	Гиппокамп Hippocampus	–	Лей-энкефалин Met-энкефалин/ Leu-enkephalin Met-enkephalin	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6236683/

Литература / References:

- Baumann KY, Church MK, Clough GF, Quist SR, Schmelz M, Skov PS, Anderson CD, Tannert LK, Giménez-Arnau AM, Frischbutter S, Scheffel J, Maurer M. Skin microdialysis: methods, applications and future opportunities an EAACI position paper. *Clin Transl Allergy*. 2019;9:24. <https://doi.org/10.1186/s13601-019-0262-y>
- KALANT H. A microdialysis procedure for extraction and isolation of corticosteroids from peripheral blood plasma. *Biochem J*. 1958;69(1):99-103. <https://doi.org/10.1042/bj0690099>
- Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem*. 1966;13(11):1057-1067. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1966.tb04265.x>
- Wang X, Stenken JA. Microdialysis sampling membrane performance during in vitro macromolecule collection. *Anal Chem*. 2006;78(17):6026-6034. <https://doi.org/10.1021/ac0602930>
- Cirrito JR, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW, Audia JE, Nissen JS, Bales KR, Paul SM, DeMattos RB, Holtzman DM. In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci*. 2003;23(26):8844-8853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-26-08844.2003>
- Thelin EP, Nelson DW, Ghatan PH, Bellander BM. Microdialysis Monitoring of CSF Parameters in Severe Traumatic Brain Injury Patients: A Novel Approach. *Front Neurol*. 2014;5:159. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00159>
- Zeiler FA, Thelin EP, Czosnyka M, Hutchinson PJ, Menon DK, Helmy A. Cerebrospinal Fluid and Microdialysis Cytokines in Severe Traumatic Brain Injury: A Scoping Systematic Review. *Front Neurol*. 2017;8:331. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00331>
- Tsitsopoulos PP, Marklund N. Amyloid- β peptides and tau protein as biomarkers in cerebrospinal and interstitial fluid following traumatic brain injury: a review of experimental and clinical studies. *Front Neurol*. 2013;4:79. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00079>
- Kho CM, Enche Ab Rahim SK, Ahmad ZA, Abdullah NS. A Review on Microdialysis Calibration Methods: the Theory and Current Related Efforts. *Mol Neurobiol*. 2017;54(5):3506-3527. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9929-8>
- Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, Shippenberg TS. Overview of Brain Microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*. 2009;Chapter 7:Unit 7.1. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0701s47>
- Lee MKK, Di L. Crosstalk the Microdialysis in Scientific Research: from Principle to its Applications. *Pharm Anal Acta*. 2013;5(1):276-296. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000276>
- van den Brink WJ, Wong YC, Gulave B, van der Graaf PH, de Lange EC. Revealing the neuroendocrine response after remoxipride treatment using multi-biomarker discovery and quantifying it by PK/PD modeling. *AAPS J*. 2017;19(1):274-285. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-0002-3>
- Hillered L, Dahlin AP, Clausen F, Chu J, Bergquist J, Hjort K, Enblad P, Lewén A. Cerebral microdialysis for protein biomarker monitoring in the neurointensive care setting - a technical approach. *Front Neurol*. 2014;5:245. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00245>
- Wang M, Roman GT, Perry ML, Kennedy RT. Microfluidic chip for high efficiency electrophoretic analysis of segmented flow from a microdialysis probe and in vivo chemical monitoring. *Anal Chem*. 2009;81(21):9072-9078. <https://doi.org/10.1021/ac901731v>
- Wang M, Slaney T, Mabrouk O, Kennedy RT. Collection of nanoliter microdialysate fractions in plugs for off-line in vivo chemical monitoring with up to 2s temporal resolution. *J Neurosci Methods*. 2010;190(1):39-48. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.04.023>
- Slaney TR, Nie J, Hershey ND, Linderman J, Burns MA, Kennedy RT. Push-pull perfusion sampling with segmented flow for high temporal and spatial resolution in vivo chemical monitoring. *Anal Chem*. 2011;83(13):5207-5213. <https://doi.org/10.1021/ac2003938>
- Rogers M, Leong C, Niu X, de Mello A, Parker KH, Boutele MG. Optimisation of a microfluidic analysis chamber for the placement of microelectrodes. *Phys Chem Chem Phys*. 2011;13(12):5298-5303. <https://doi.org/10.1039/c0cp02810j>
- Song P, Hershey ND, Mabrouk OS, Slaney TR, Kennedy RT. Mass spectrometry "sensor" for in vivo acetylcholine monitoring. *Anal Chem*. 2012;84(11):4659-4664. <https://doi.org/10.1021/ac301203m>
- Kao C-Y, Anderzhanova E, Asara JM, Wotjak CT, Turck CW. NextGen Brain Microdialysis: Applying Modern Metabolomics Technology to the Analysis of Extracellular Fluid in the Central Nervous System. *Mol Neuropsychiatry*. 2015;1(1):60-67. <https://doi.org/10.1159/000381855>
- Lukas M, Neumann ID. Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to social dysfunctions in autism spectrum disorders. *Behav Brain Res*. 2013;251:85-94. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.011>
- Bouw MR, Gardmark M, Hammarlund-Udenaes M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of morphine transport across the blood-brain barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats--a microdialysis study. *Pharm Res*. 2000;17(10):1220-1227. <https://doi.org/10.1023/a:1026414713509>
- Bostrom E, Hammarlund-Udenaes M, Simonsson US. Blood-brain barrier transport helps to explain discrepancies in in vivo potency between oxycodone and morphine barrier transport helps to explain discrepancies in in vivo potency between oxycodone and morphine. *Anesthesiology*. 2008;108(3):495-505. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318164cf9e>
- Bouw MR, Xie R, Tunblad K, Hammarlund-Udenaes M. Blood-brain barrier transport and brain distribution of morphine-6-glucuronide in relation to the antinociceptive effect in rats-pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *Br J Pharmacol*. 2001;134(8):1796-1804. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704406>
- Min KC, Aziz A, Ahmad ZA, Rahim SK, Abdullah NS. Initial efforts in modelling mass transport in microdialysis probes: physical characterization of the microdialysis probe membrane. *Adv Mater Res*. 2015;1087:365-369. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1087.365>
- Ungerstedt U. Microdialysis-principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med*. 1991;230(4):365-373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1991.tb00459.x>
- Osipova ED, Komleva YK, Morgun AV, Lopatina OL, Panina YA, Olovyanikova RY, Vais EF, Salmin VV, Salmina AB. Designing in vitro Blood-brain barrier Models Reproducing Alterations in Brain Aging. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:1-14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00234>
- Кувачева Н.В., Салмина А.Б., Комаева Ю.К., Малиновская Н.А., Моргунов А.В., Пожиленкова Е.А., Замай Г.С., Язуина Н.А., Петрова М.М. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2013;113(4):80-85 [Kuvacheva NV, Salmina AB, Komaeva YuK, Malinovskaya NA, Morgun AV, Pozhilenkova EA, Zama G.S., Yauzina N.A., Petrova M.M. Permeability of the hematoencephalic barrier in normalcy, brain development pathology and neurodegeneration. *Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2013;113(4):80-85. (In Russ.)]
- Моргунов А.В., Кувачева Н.В., Хилажева Е.Д., Горина Я.В., Таранушенко Т.Е., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. Перинатальное поражение центральной нервной системы: по-

- вреждение и возможности восстановления гематоэнцефалического барьера. *Вопросы практической педиатрии*. 2015;10(4):29-37 [Morgun AV, Kuvacheva NV, Khilazheva ED, Gorina YaV, Taranushenko TE, Pozhilenkova EA, Salmina AB. Perinatal lesion of the central nervous system: damage and possibilities of restoring the blood-brain barrier. *Clinical Practice in Pediatrics*. 2015;10(4):29-37. (In Russ.).]
29. Салмина А.Б., Бойцова Е.Б., Моргун А.В., Панина Ю.А., Горина Я.В., Писарева Н.В., Нода М., Кутищева И.А., Мартынова Г.П. Экспрессия NLRP3 инфламасом церебрального эндотелия при воспалении вирусного генеза in vitro. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017;16(4):242-249 [Salmina AB, Boytsova EB, Morgun AV, Panina YuA, Gorina YaV, Pisareva NV, Kutishcheva IA, Noda M, Martynova GP. Expression of cerebral endothelial NLRP3 inflammasome in viral inflammation in vitro. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017;16(4):242-249. (In Russ.).] <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2017-4-242-249>
 30. Моргун А.В., Салмин В.В., Успенская Ю.А., Тепляшина Е.А., Салмина А.Б. Микрофлюидные технологии в изучении и моделировании гематоэнцефалического барьера. *Биомедицина*. 2016;4:22-23 [Morgun AV, Salmin VV, Uspenskaya YuA, Teplyashina EA, Salmina AB. Microfluidic technologies in studying and modelling the blood-brain barrier. *Biomedicine*. 2016;4:22-23. (In Russ.).]
 31. Anand G, Sharma S, Dutta AK, Kumar SK, Belfort G. Conformational transitions of adsorbed proteins on surfaces of varying polarity. *Langmuir*. 2010;26(26):10803-10811. <https://doi.org/10.1021/la1006132>
 32. Olivecrona M, Rodling-Wahlström M, Naredi S, Koskinen LO. Prostaglandin Treatment in Severe Traumatic Brain Injury: A Microdialysis and Outcome Study. *J Neurotrauma*. 2009;26(8):1251-1262. <https://doi.org/10.1089=neu.2008.0605>
 33. Thompson AC, Zapata A, Justice JB, Vaughan RA, Sharpe LG, Shippenberg TS. Kappa-opioid receptor activation modifies dopamine uptake in the nucleus accumbens and opposes the effects of cocaine. *J Neurosci*. 2000;20(24):9333-9340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-09333.2000>
 34. Deguchi Y, Terasaki T, Kawasaki S, Tsuji A. Muscle microdialysis as a model study to relate the drug concentration in tissue interstitial fluid and dialysate. *J Pharmacobiodyn*. 1991;14(8):483-492.
 35. Zestos AG, Kennedy RT. Microdialysis Coupled with LC-MS/MS for In Vivo Neurochemical Monitoring. *AAPS J*. 2017;19(5):1284-1293. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0114-4>
 36. Löscher W, Friedman A. Structural, Molecular, and Functional Alterations of the Blood-Brain Barrier during Epileptogenesis and Epilepsy: A Cause, Consequence, or Both?. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):591. <https://doi.org/10.3390/ijms21020591>
 37. Potschka H, Baltes S, Fedrowitz M, Löscher W. Impact of seizure activity on free extracellular phenytoin concentrations in amygdala-kindled rats. *Neuropharmacology*. 2011;61(5-6):909-917. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.06.018>
 38. Ziemińska E, Toczyłowska B, Diamandakis D, Hilgier W, Filipkowski RK, Polowy R, Orzel J, Gorka M, Lazarewicz JW. Glutamate, Glutamine and GABA Levels in Rat Brain Measured Using MRS, HPLC and NMR Methods in Study of Two Models of Autism. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:418. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00418>
 39. Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neurosci Lett*. 2002;263(2):173-176. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00423-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00423-8)
 40. Hu Y, Rip J, Gaillard PJ, de Lange ECM, Hammarlund-Udenaes M. The Impact of Liposomal Formulations on the Release and Brain Delivery of Methotrexate: An In Vivo Microdialysis Study. *J Pharm Sci*. 2017;106(9):2606-2613. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.009>
 41. Ding JH, Sha LL, Chang J, Zhou XQ, Fan Y, Hu G. Alterations of striatal neurotransmitter release in aquaporin-4 deficient mice: An in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett*. 2007;422(3):175-180. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.06.018>
 42. Wakabayashi T, Yamaguchi K, Matsui K, Sano T, Kubota T, Hashimoto T, Mano A, Yamada K, Matsuo Y, Kubota N, Kadowaki T, Iwatsubo T. Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):15. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0315-7>
 43. Liu CC, Zhao N, Fu Y, Wang N, Linares C, Tsai CW, Bu G. ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology. *Neuron*. 2017;96(5):1024-1032.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.11.013>
 44. Białon M, Żamowska M, Antkiewicz-Michaluk L, Wąsik A. Pro-cognitive effect of 1MeTIQ on recognition memory in the ketamine model of schizophrenia in rats: the behavioural and neurochemical effects. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020;237(6):1577-1593. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05484-1>
 45. Hettinger JC, Lee H, Bu G, Holtzman DM, Cirrito JR. AMPA-ergic regulation of amyloid-β levels in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol Neurodegener*. 2018;13(1):22. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0256-6>
 46. Wilson RE, Jaquins-Gerstl A, Weber SG. On-Column Dimethylation with Capillary Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Online Determination of Neuropeptides in Rat Brain Microdialysate. *Anal Chem*. 2018;90(7):4561-4568. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04965>
 47. Wang Y, Liu S, Wang R, Shi L, Liu Z, Liu Z. Study on the therapeutic material basis and effect of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms leaves in the treatment of ischemic stroke by PK-PD analysis based on online microdialysis-LC-MS/MS method. *Food Funct*. 2020;11(3):2005-2016. <https://doi.org/10.1039/c9fo02475a>
 48. Papadimitriou L, Manganas P, Ranella A, Stratakis E. Biofabrication for neural tissue engineering applications. *Mater Today Bio*. 2020;6:100043. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100043>
 49. Saylor RA, Lunte SM. A review of microdialysis coupled to microchip electrophoresis for monitoring biological events. *J Chromatogr A*. 2015;1382:48-64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.086>
 50. Nandi P, Lunte SM. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review. *Anal Chim Acta*. 2009;651(1):1-14. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.064>
 51. Sandlin ZD, Shou M, Shackman JG, Kennedy RT. Microfluidic electrophoresis chip coupled to microdialysis for in vivo monitoring of amino acid neurotransmitters. *Anal Chem*. 2005;77(23):7702-7708. <https://doi.org/10.1021/ac051044z>
 52. Samper IC, Gowers SAN, Rogers ML, Murray DRK, Jewell SL, Pahl C, Strong AJ, Boutelle MG. 3D printed microfluidic device for online detection of neurochemical changes with high temporal resolution in human brain microdialysate. *Lab Chip*. 2019;19(11):2038-2048. <https://doi.org/10.1039/c9lc00044e>
 53. van den Brink FTG, Phisonkunkasem T, Asthana A, Bomer JG, van den Maagdenberg AMJM, Tolner EA, Odijk M. A miniaturized push-pull-perfusion probe for fewsecond sampling of neurotransmitters in the mouse brain. *Lab Chip*. 2019;19(8):1332-1343. <https://doi.org/10.1039/c8lc01137k>
 54. Nielsen TH, Olsen NV, Toft P, Nordström CH. Cerebral energy metabolism during mitochondrial dysfunction induced by cyanide in piglets. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2013;57(6):793-801. <https://doi.org/10.1111/aas.12092>
 55. Havelund JF, Nygaard KH, Nielsen TH, Nordström CH, Poulsen FR, Færgeman NJ, Forse A, Gramsbergen JB. In Vivo Microdialysis of Endogenous and ¹³C-labeled TCA Metabolites in Rat Brain: Reversible and Persistent Effects of Mitochondrial Inhibition and Transient Cerebral Ischemia. *Metabolites*. 2019;9(10):E204. <https://doi.org/10.3390/metabo9100204>
 56. Thelin EP, Carpenter KL, Hutchinson PJ, Helmy A. Microdialy-

sis Monitoring in Clinical Traumatic Brain Injury and Ist Role in Neuroprotective Drug Development. *AAPS J.* 2017;19(2):367-376. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-0027-7>
57. Nordström CH, Nielsen TH, Schälén W, Reinstrop P, Ungerstedt

U. Biochemical indications of cerebral ischaemia and mitochondrial dysfunction in severe brain trauma analysed with regard to type of lesion. *Acta Neurochir (Wien).* 2016;158(7):1231-1240. <https://doi.org/10.1007/s00701-016-283>

Сведения об авторах

Харитоновна Екатерина Викторовна, кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный сотрудник Российско-японской лаборатории изучения социального мозга научно-исследовательского института молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1).

Вклад в статью: написание статьи.

ORCID: 0000-0002-1359-9249

Лопатина Ольга Леонидовна, доктор биологических наук, PhD, профессор кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель Российско-японской лаборатории изучения социального мозга научно-исследовательского института молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1); профессор, ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» (660041, Россия, г. Красноярск, пр. Свободный, 79).

Вклад в статью: переработка ее важного интеллектуального содержания.

ORCID: 0000-0002-7884-2721

Марченко Сергей Александрович, стажер-исследователь Российско-японской лаборатории изучения социального мозга научно-исследовательского института молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1).

Вклад в статью: активное участие в написании первого варианта статьи.

ORCID: 0000-0001-8141-7526

Горина Яна Валерьевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1).

Вклад в статью: переработка ее важного интеллектуального содержания.

ORCID: 0000-0002-3341-1557

Салмина Алла Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель научно-исследовательского института молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1).

Вклад в статью: утверждение окончательной версии для публикации.

ORCID: 0000-0003-4012-6348

Статья поступила: 27.05.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Dr. Ekaterina V. Kharitonova, MD, PhD, Senior Lecturer, Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry; Research Fellow, Russian-Japanese Laboratory of Social Brain, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation)

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-1359-9249

Prof. Olga L. Lopatina, DSc, Professor, Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Russian-Japanese Laboratory of Social Brain, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation); Professor, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation ((79, Svobodnyi Prospekt, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation)

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-7884-2721

Dr. Sergey A. Marchenko, Research Associate, Russian-Japanese Laboratory of Social Brain, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation)

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-8141-7526

Dr. Yana V. Gorina, MD, PhD, Associate Professor, Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation)

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-3341-1557

Prof. Alla B. Salmina, MD, DSc, Head of the Department of Biological, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voino-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation (1, Partizana Zheleznyaka Street, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation)

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-4012-6348

Received: 27.05.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-98-105>

СТЕНТИРОВАНИЕ ВЫВОДНОГО ТРАКТА ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РАДИКАЛЬНОЙ КОРРЕКЦИЕЙ У РЕБЕНКА С ТЕТРАДОЙ ФАЛЛО: РЕЗУЛЬТАТЫ ШЕСТИЛЕТНЕГО НАБЛЮДЕНИЯ

ЛЯПИН А.А.^{1*}, ХАЛИВОПУЛО И.К.¹, ШУШПАННИКОВ П.А.¹, ТАРАСОВ Р.С.¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Резюме

Тетрада Фалло является наиболее распространенным врожденным пороком сердца цианотического типа. С первой радикальной коррекции в 1954 году тактика лечения постоянно совершенствуется. Стратегии лечения тетрады Фалло, используемые в настоящее время, приводят к достаточно высокому уровню долгосрочной выживаемости (30-летняя выживаемость колеблется от 68,5% до 90,5%). В данной статье представлен клинический случай поэтапного хирургического лечения в виде паллиативного вмешательства – стентирования выводного отдела правого желудочка и дальнейшей радикальной коррекции классической тетрады Фалло у маловесного ребенка с последующим шестилетним наблюдением. Продемонстрированы возможности технической реализации стентирования выводного отдела правого желудочка и клинический успех данного вмешательства у новорожденных пациентов с тетрадой Фалло при дефиците массы тела и выраженных одышно-цианотических приступах. Стентирование выводного отдела правого желудочка у данной когорты пациентов является альтернативой аорто-легочному шунтированию, которое, в свою очередь, представляет более высокие хирургические риски развития периоперационных осложнений. Использование преимуществ эндоваскулярного и хирургического методов лечения позволило с приме-

нением малоинвазивного метода имплантировать стент в выводной отдел правого желудочка, что привело к уменьшению выраженности гипоксемического синдрома, обеспечило удовлетворительное развитие легочного русла и увеличение конечно-диастолического индекса, что позволило выполнить эффективную радикальную коррекцию порока спустя 4 месяца. Представленные данные демонстрируют не только ближайшие обнадеживающие результаты эндоваскулярного и хирургического лечения сложного для курации ребенка с тетрадой Фалло, но и удовлетворительные отдаленные результаты в рамках шестилетнего наблюдения.

Ключевые слова: врожденные пороки сердца, тетрада Фалло, стентирование выходного отдела правого желудочка, отдаленные результаты.

Конфликт интересов

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

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0003 «Мультифокальный атеросклероз и коморбидные состояния. Особенности диагностики, управления рисками в условиях крупного промышленного региона Сибири».

Для цитирования:

Ляпин А.А., Халивопуло И.К., Шушпанников П.А., Тарасов Р.С. Стентирование выводного тракта правого желудочка с последующей радикальной коррекцией у ребенка с тетрадой Фалло: результаты шестилетнего наблюдения. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3):98-105. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-98-105>

*Корреспонденцию адресовать:

Ляпин Антон Александрович, 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6, e-mail: Lyapin11@mail.ru
© Ляпин А.А. и др.

CASE REPORTS

STENTING OF THE RIGHT VENTRICULAR OUTFLOW TRACT WITH SUBSEQUENT RADICAL CORRECTION IN A CHILD WITH A TETRALOGY OF FALLOT: RESULTS OF SIX-YEAR FOLLOW-UP

ANTON A. LYAPIN¹ **, IVAN K. KHALIVOPULO¹, PAVEL A. SHUSHPANNIKOV¹, ROMAN S. TARASOV¹*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation*

Abstract

Tetralogy of Fallot (ToF) is the most common cyanotic congenital heart defect. Since the first radical correction in 1954, treatment strategy has been constantly improving. Current treatment of ToF ensures the long-term survival (30-year survival ranges from 68.5% to 90.5%), yet it is still challenging in underweight patients. Here we present a clinical case of two-step surgery which included right ventricular outflow tract (RVOT) stenting and further radical correction in an underweight child who was then followed-up for six years. RVOT stenting is an appropriate alternative to the bypass surgery which has higher risk of perioperative complications. RVOT stenting significantly reduces hypoxia, enhances the development of the pulmonary vasculature and increases end-diastolic index ultimately permitting

efficient radical correction after 4 months. The described approach resulted in a favorable outcome and quality of life after 6 years of follow-up.

Keywords: congenital heart disease, tetralogy of Fallot, right ventricular outflow tract stenting, long-term outcomes.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

This research was funded by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 0546-2019-0003 “Atherosclerosis and its comorbidities. Features of diagnostics and risk management in a large industrial region of Siberia”.

◀ English

For citation:

Anton A. Lyapin, Ivan K. Khalivopulo, Pavel A. Shushpannikov, Roman S. Tarasov. Stenting of the right ventricular outflow tract with subsequent radical correction in a child with a tetralogy of Fallot: results of six-year follow-up. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020;5(3):98-105. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-98-105>

**Corresponding author:

Anton A. Lyapin, 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation, e-mail: Lyapin11@mail.ru

© Anton A. Lyapin et al.

Введение

Тетрада Фалло (ТФ) является наиболее распространенным врожденным пороком сердца (ВПС) цианотического типа. Со времени первой хирургической коррекции ТФ в 1954 году лечение данного ВПС непрерывно совершенствуется. Гемодинамические нарушения при данном пороке резко выражены и без хирургического вмешательства могут приводить к фатальным исходам в первые годы жизни пациентов. Тактика лечения данной когорты пациентов разрабатывается на протяжении десятков лет. Современные стратегии лечения ТФ демонстрируют высокий уровень долгосрочной выживаемости (30-летняя выживаемость колеблется от 68,5% до 90,5%). Тем

не менее, такие проблемы, как обструкция выводного отдела правого желудочка (ВОПЖ), регургитация на клапане легочной артерии (КЛА) и желудочковые аритмии достаточно распространены у данных пациентов и часто требуют повторных вмешательств [1]. Это подразумевает необходимость дальнейшего совершенствования тактических и технических аспектов хирургического лечения, включая внедрение гибридных методов лечения, что особо актуально в когорте маловесных новорожденных с тяжелой гипоксией.

Одним из методов поэтапной коррекции ТФ является формирование первым этапом системно-легочного анастомоза для устранения тяжелой гипоксии у больного с дальнейшей коррекции

ей стеноза КЛА и закрытием дефекта межжелудочковой перегородки (ДМЖП) в рамках второго этапа. Однако данная схема не является приемлемой во всех случаях, так как ассоциируется с высоким риском периперационных осложнений и летального исхода, достигающего 6%, в особенности это касается новорожденных с дефицитом массы тела и тяжелыми одышно-цианотическими приступами [2].

На настоящий момент перспективной альтернативой паллиативному хирургическому вмешательству является эндоваскулярный метод в виде стентирования ВОПЖ, позволяющий добиться уменьшения выраженности гипоксического синдрома, нормализовать легочный кровоток и состояние ветвей легочной артерии (ЛА), подготовить левый желудочек к радикальной коррекции порока [1, 3].

В рамках данного клинического случая продемонстрирована эффективность и безопасность двухэтапного метода коррекции ТФ в виде стентирования ВОПЖ первым этапом и дальнейшей радикальной коррекции порока у новорожденного ребенка с тяжелой гипоксией и дефицитом массы тела. Представлены результаты шестилетнего наблюдения.

Материалы и методы

В ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» в экстренном порядке поступила пациентка Н. возрастом 4 дня, с дефицитом массы тела (рост 47 см, вес 2140 грамм) и задержкой внутриутробного развития. Ребенок имел множественные врожденные аномалии. Согласно клиническим данным и инструментальным методам исследования был верифицирован ВПС – ТФ, цианотическая форма, зависимость от открытого артериального протока (ОАП). Порок развития головного мозга: частичная агенезия мозолистого тела. Пиелозктазия справа.

На момент поступления у ребенка сатурация артериальной крови кислородом по данным пульсоксиметрии не превышала 70%. По данным трансторакальной эхокардиографии (ЭхоКг): фракция выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ) составила 67%, передне-задний размер (ПЗР) правого желудочка (ПЖ) – 0,8 см, индекс конечного диастолического объема (КДО) ЛЖ – 28,57 мл/м², ствол легочной артерии (ЛА) – 0,3 см, правая ветвь ЛА – 0,3 см, левая ветвь ЛА – 0,3 см, размер фиброзного кольца (ФК) клапана ЛА (КЛА)

– 0,2 см, стеноз подклапанного и клапанного аппарата ЛА, диаметр (d) ВОПЖ – 0,25 см, декстропозиция аорты на 50%, максимальное давление (Pmax) в ВОПЖ составило 56 мм рт. ст, d ОАП 0,4 см, субаортальный ДМЖП 0,9 см (сброс справа налево). После проведенного консилиума кардиокомандой было принято решение о необходимости срочной коррекции ВПС. Первым этапом с целью устранения тяжелой гипоксии и подготовки к радикальной коррекции ВПС было решено выполнить стентирование ВОПЖ.

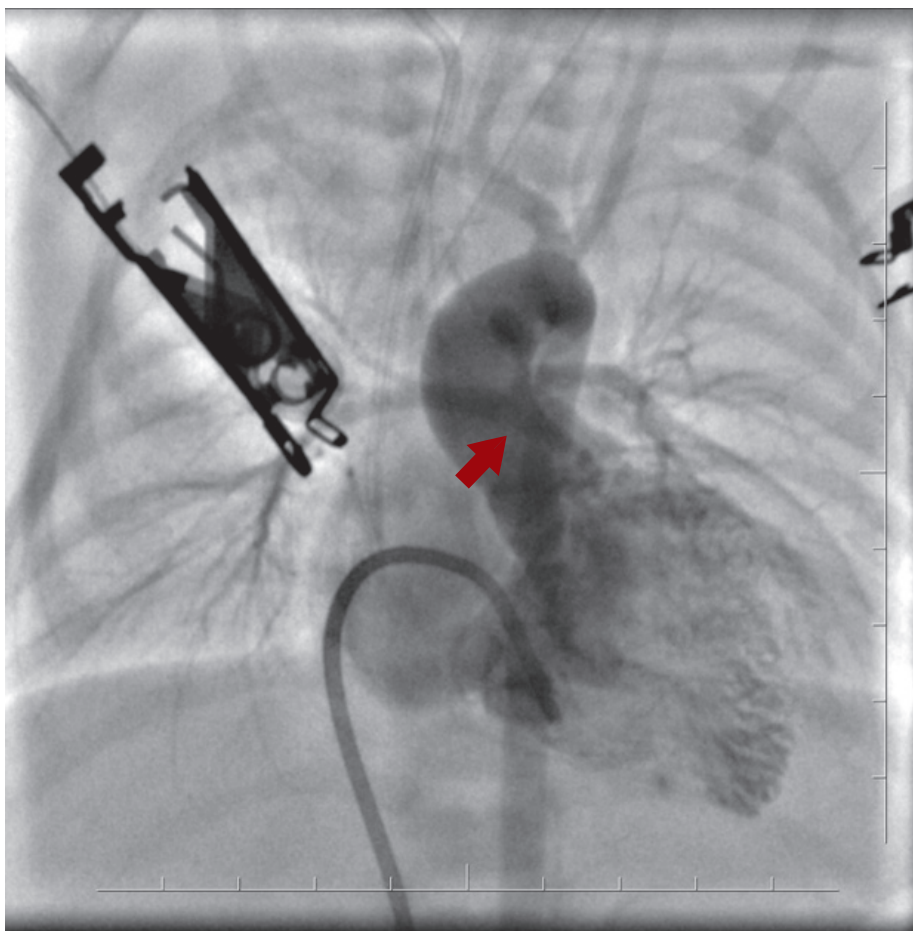
В условиях искусственной вентиляции легких сосудистый доступ был обеспечен посредством установки интродьюсера 5F в правую общую бедренную вену. При помощи многоцелевого катетера (MP) 5F были катетеризованы правые отделы сердца и ЛА. При правой вентрикулографии контрастированы ПЖ и ВОПЖ (**рисунок 1**). Визуализируется двойное отхождение сосудов от ПЖ, гипоплазия ветвей ЛА.

В дистальные сегменты ЛА был заведен коронарный проводник. В область клапанного и подклапанного стенозов ЛА был позиционирован и имплантирован давлением 12 атм. коронарный стент без лекарственного покрытия (Pro-Kinetic) длиной 15 мм и диаметром 4 мм. При контрольной правой вентрикулографии стент полностью расправлен, достигнута коррекция подклапанного и клапанного стеноза ЛА (**рисунок 2**).

Отмечено возрастание сатурации с 70% до 88%. Баллонный катетер системы доставки стента, коронарный проводник и интродьюсер удалены. Выполнен гемостаз путем мануальной компрессии и наложения давящей повязки. Ребенок переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии.

Послеоперационный период протекал стабильно. Ребенок был экстубирован на вторые сутки после проведенного вмешательства. Во время нахождения в отделении реанимации и интенсивной терапии проводилась инотропная поддержка адреналином 0,05 мкг/кг с постепенным снижением скорости введения препарата. Уровень сатурации артериальной крови кислородом при самостоятельном дыхании с подачей кислорода через носовые канюли составлял 85%.

На третьи сутки ребенок в стабильном состоянии был переведен в отделение детской кардиологии. Послеоперационный период протекал без осложнений, в зоне пункции общей бедренной вены гематома отсутствовала, по результатам дуплексного сканирования зоны пункции кровотока в артерии и вене был сохранен.

**Рисунок 1.**

Вентрикулография с визуализацией двойного отхождения сосудов от правого желудочка и гипоплазией ветвей легочной артерии (обозначено стрелкой).

Figure 1.

Ventriculography visualising double branching of the blood vessels from the right ventricle and pulmonary artery hypoplasia (indicated by an arrow).

**Рисунок 2.**

Финальный ангиографический результат: при вентрикулографии визуализируется выводной отдел правого желудочка с успешно имплантированным стентом (обозначено стрелкой).

Figure 2.

Ventriculography demonstrates the successful right ventricular outflow tract stenting (stent is indicated by an arrow).

На седьмые сутки после вмешательства пациент был выписан для дальнейшего наблюдения и лечения на амбулаторный этап. На момент выписки из стационара по данным ЭхоКг: ФВ ЛЖ составила 71%, градиент на стенте в ВОПЖ не превысил 30 мм рт.ст., наблюдалось стабильное увеличение уровня сатурации артериальной крови кислородом до 85%.

Стентирование ВОПЖ в данном случае позволило устранить критический подклапанный и клапанный стеноз, восстановить адекватный кровоток в малом круге кровообращения и купировать тяжелую системную гипоксию, что также отразилось на уменьшении одышно-цианотического синдрома.

Спустя 4 месяца, при достижении массы тела 4660 г и роста 54 см, ребенок в плановом порядке был повторно госпитализирован в кардиоцентр для проведения радикальной коррекции ТФ. На момент поступления у ребенка по данным ЭхоКг: ФВ ЛЖ составила 80%, ПЗР ПЖ – 1,1 см, индекс КДО ЛЖ – 43,48 мл/м², увеличились диаметры правой ветви ЛА до 0,54 см, левой ветви ЛА до 0,4, градиент на стенте в ВОПЖ возрос до 74 мм рт.ст., сохранялся субаортальный ДМЖП 1 см (сброс справа налево), лоцировалась большая аорто-легочная коллатераль (БАЛК) 0,3 см.

В данную госпитализацию ребенку было проведено хирургическое вмешательство в объеме радикальной коррекции ТФ, закрытия ДМЖП, миотомии и миоэктомии ВОПЖ, с остаточной фенестрой на уровне межпредсердной перегородки (-3 мм - 4 мм), пластика ВОПЖ заплатой из аутоперикарда, удаление стента из ВОПЖ, пластика устьевого стеноза левой ветви ЛА заплатой из аутоперикарда в условиях искусственного кровообращения. Время искусственного кровообращения составило 174 минуты, пережатие аорты – 91 минуту.

Ребенок из операционной доставлен в отделение реанимации и интенсивной терапии на искусственной вентиляции легких. Гемодинамика стабильна с поддержкой адреналином до 0,05 мкг/кг/мин, норадреналином до 0,05 мкг/кг/мин, милринон 0,5 мкг/кг/мин. Ритм сердца синусовый. Диурез достаточный. Насыщение артериальной крови кислородом 90%. В первые послеоперационные сутки у ребенка развивается клиника отека легких, появляется розовая мокрота. На рентгенограмме органов грудной клетки гиперволемию правого легкого. Пациенту показано рентгенэндоваскулярная окклюзия большой аорто-легочной коллатерали (БАЛК).

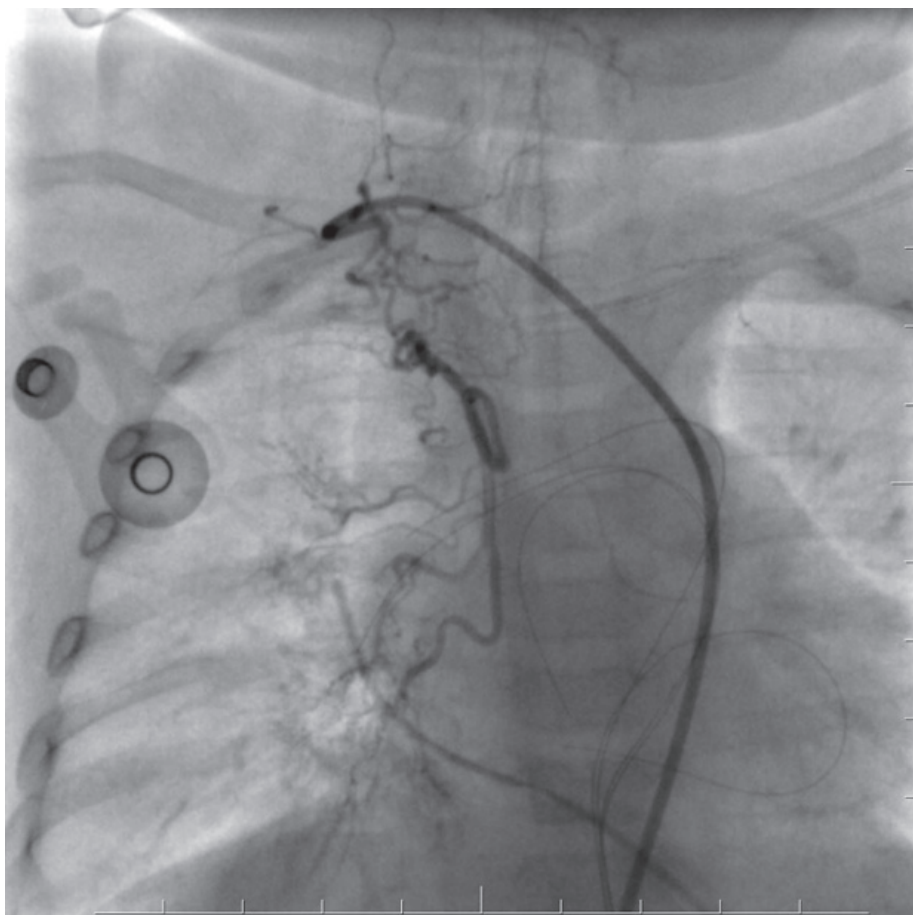
На вторые послеоперационные сутки ребенок поступает в рентген-операционную. Выполнена аортография, визуализирована БАЛК, отходящая от правой подключичной артерии к правому легкому. БАЛК закрыта спиралью Flipper 6.5/5. Кровоток по БАЛК прекращен (**рисунок 3**).

БАЛК закрыта спиралью Flipper 6.5/5. Кровоток по БАЛК прекращен (**рисунок 4**).

Состояние пациентки соответствовало сроку и объему проведенного вмешательства. В динамике альвеолярный отек купирован. На четвертые послеоперационные сутки пациентка переведена на самостоятельное дыхание. Сатурация кислородом 99%. Гемодинамика стабилизирована на фоне инотропной поддержки адреналином 0.7 мкг/кг/мин. Диурез соответствовал количеству введенной жидкости. На девятые сутки пациентка в стабильном состоянии была переведена в отделение кардиохирургии и на этап реабилитации.

В послеоперационном периоде наблюдались явления умеренного гидроторакса, который не требовал пункции и был купирован медикаментозно. На семнадцатые сутки после радикальной коррекции ребенок в стабильном состоянии выписан из клиники. По ЭхоКГ на момент выписки: ФВ ЛЖ = 75%, ПЗР ПЖ – 1 см, индекс КДО ЛЖ – 34,78 мл/м², Pmax КЛА (максимальный градиент на КЛА) – 2 мм рт.ст., градиент на ветвях ЛА: в устье правой = 4 мм рт.ст., в устье левой = 13 мм рт.ст.

После выписки состояние пациентки осталось стабильным. Со слов родителей, обращало на себя внимание наличие частых простудных заболеваний, сниженный аппетит, беспокойный сон у ребенка. Девочка отставала в развитии от своих сверстников, это было связано с сопутствующей патологией - агенезией мозолистого тела головного мозга, по поводу чего ребенок состоит на учете у невролога. Девочка посещала реабилитационный детский сад, где занималась с логопедом, психологом, занималась лечебной физической культурой. Активно идет на контакт с другими детьми, знает алфавит, цифры до 20, регулярно занимается развивающими детскими играми. При повышенных физических нагрузках у ребенка появляется цианоз носогубного треугольника и начинается одышка. Спортивные секции и дошкольные детские учреждения не посещает. На постоянной основе принимает эналаприл 0,625 мг (1/4 таб по 2,5 мг) на ночь. Регулярно наблюдается и проходит плановое обследование. По результатам ЭхоКГ от февраля 2020 года (спустя 6 лет после радикальной коррекции ВПС): ФВ ЛЖ 75%, ПЖ 1,8

**Рисунок 3.**

БАЛК, отходящая от правой подключичной артерии к правому легкому.

Figure 3.

The large aortopulmonary collateral artery extending from the right subclavian artery to the right lung.

**Рисунок 4.**

БАЛК закрыта спиралью Flipper 6.5/5. Кровоток по БАЛК прекращен.

Figure 4.

The large aorta pulmonary collateral artery is closed by a Flipper 6.5/5. Blood flow through the large aorta pulmonary collateral has been stopped.

см, КДО ЛЖ 20 мл, Ствол ЛА: 1,2 см, на ветвях ЛА: на правой ветви – 7 мм рт.ст, на левой – 12 мм рт.ст. Рекомендовано дальнейшее динамическое наблюдение.

Обсуждение

Согласно данным литературы, ранняя радикальная коррекция ТФ в возрасте до одного года, а именно в период 3–6 месяцев, ассоциируется с меньшим риском послеоперационных осложнений и лучшим прогнозом для данной когорты пациентов. Преимущественно это связано с особенностями и временем обратного ремоделирования ПЖ в связи с повышением его жесткости и более выраженной гипертрофии, риска желудочковых тахикардий и летального исхода при коррекции в более старшем возрасте [4, 5]. В этой связи крайне важно в короткий срок обеспечить готовность к радикальной хирургической коррекции детей, имеющих дефицит массы тела при рождении, гипоплазию легочного русла, малый индекс конечного диастолического объема ЛЖ путем паллиативной операции аорто-легочного шунтирования или менее инвазивного и травматичного вмешательства стентирования ВОПЖ, что и было сделано в представленном случае. Нужно отметить, что выбор малотравматичной стентирующей процедуры в данном случае был оправдан с учетом дефицита массы тела ребенка, сопутствующей патологии и выраженного одышно-цианотического синдрома.

Вопрос выбора оптимальной хирургической тактики ведения у симптомных новорожденных с ТФ остается противоречивым. Первоначальная коррекция с сохранением фиброзного кольца кЛА может быть подходящим вариантом для пациентов с нормальным размером кольца кЛА, но для пациентов с небольшим кольцом кЛА предпочтительнее паллиативные вмешательства, которые позволяют увеличить кольцо, диаметр ЛА и повысить вероятность сохранения кольца кЛА при дальнейшей радикальной коррекции.

На сегодняшний день у таких пациентов тактика и сроки хирургического лечения выбираются индивидуально в зависимости от клинической картины, демографических особенностей и анатомических характеристик.

В ряде зарубежных и отечественных работ описан опыт использования стратегии поэтапной коррекции ТФ с выполнением стентирования ВОПЖ первым этапом. Так, в работе Quandt D и соавторов проводился ретроспективный анализ, посвященный сравнению эффективности метода паллиатив-

ного вмешательства в виде стентирования ВОПЖ и модифицированного аорто-легочного шунтирования Блелока-Тауссига у пациентов с ТФ. Было продемонстрировано преимущество стентирования ВОПЖ, проявляющееся в виде значимо лучшей динамики Z-score правой и левой ЛА после выполнения вмешательства, что также отразилось на более выраженном увеличении сатурации артериальной крови кислородом. При этом период до проведения радикальной коррекции ТФ был значимо меньше у пациентов после стентирования ВОПЖ при сравнении с аорто-легочным шунтированием Блелока-Тауссига [6].

Схожие положительные результаты после стентирования ВОПЖ у пациентов с ТФ также были продемонстрированы в ряде других зарубежных пилотных исследований [7]. Однако проспективные исследования являются единичными, при этом с небольшой выборкой пациентов.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово) имеет успешный опыт по проведению таких вмешательств, сочетающих преимущества эндоваскулярной процедуры и последующей радикальной коррекции у пациентов с ТФ. Так с 2012 по 2019 гг. стентирование ВОПЖ с последующей радикальной коррекцией ТФ было выполнено в 22 случаях. Помимо обнадеживающих клинических результатов были получены данные гистологических исследований, свидетельствующих об эффективном формировании неососуда в области ВОПЖ посредством эндотелизации имплантированного коронарного стента [3].

Вышеописанный клинический случай наглядно демонстрирует эффективность и безопасность данной стратегии в виде поэтапного проведения коррекции ТФ с помощью первоначального проведения стентирования ВОПЖ с последующей радикальной коррекцией ВПС, что проявилось в улучшении клинического статуса ребенка, купировании тяжелой гипоксии и улучшении параметров гемодинамики малого круга кровообращения и ЛЖ.

Заключение

Стентирование ВОПЖ может быть технически реализовано и иметь клинический успех у новорожденных пациентов с ТФ при дефиците массы тела и выраженных одышно-цианотических приступах, являясь альтернативой аорто-легочному шунтированию, представляющему более высокие хирургические риски в дан-

ной когорте пациентов. Использование преимуществ эндоваскулярного и хирургического методов лечения позволило с применением малоинвазивного метода имплантировать стент в ВОПЖ, что привело к уменьшению выраженности гипоксемического синдрома, обеспечило удовлетворительное развитие легочного русла и увеличение конечно-диастолического индекса,

позволило выполнить эффективную радикальную коррекцию порока спустя 4 месяца. Представленные данные демонстрируют не только ближайшие обнадеживающие результаты эндоваскулярного и хирургического лечения сложного для курации ребенка с тетрадой Фалло, но и удовлетворительные отдаленные результаты в рамках шестилетнего наблюдения.

Литература / References:

1. van der Ven JPG, van den Bosch E, Bogers AJCC, Helbing WA. Current outcomes and treatment of tetralogy of Fallot. *F1000Res*. 2019;8:F1000 Faculty Rev-1530. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17174.1>
2. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия – 2014. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева; 2015:95-140 [Bockeria LA, Gudkova RG. *Serdechno-sosudistaya khirurgiya* – 2014. *Bolezni i vrozhdennye anomalii sistemy krovoobrashcheniya*. Moscow: AN Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery Publ; 2015:95-140. (in Russ.).]
3. Nokhrin AV, Tarasov RS, Mukhamadiyarov RA, Shishkova, DK, Kutikhin AG, Dzyuman AN, Khlusov IA, Barbarash LS. Two-stage approach for surgical treatment of tetralogy of Fallot in underweight children: Clinical and morphological outcomes. *Journal of Cardiac Surgery*. 2019;34:293-299. <https://doi.org/10.1111/jocs.14031>
4. Peck D, Tretter J, Possner M, Yutzey K, Zafar F, Morales D, Alsaied T. Timing of Repair in Tetralogy of Fallot: Effects on Outcomes and Myocardial Health. *Cardiol Rev*. 2020;10.1097/CRD.0000000000000293. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000293>
5. Jeon B, Kim DH, Kwon BS, Choi ES, Park CS, Yun TJ. Surgical treatment of tetralogy of Fallot in symptomatic neonates and young infants. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2020;159(4):1466-1476.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.10.172>
6. Quandt D, Ramchandani B, Stickley J, Mehta CS, Bhole V, Barron DJ, Stumper O. Stenting of the Right Ventricular Outflow Tract Promotes Better Pulmonary Arterial Growth Compared With Modified Blalock-Taussig Shunt Palliation in Tetralogy of Fallot-Type Lesions. *JACC. Cardiovascular interventions*. 2017;10 17:1774-1784. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2017.06.023>
7. Bigdelian H, Ghaderian M, Sedighi M. Surgical repair of Tetralogy of Fallot following primary palliation: Right ventricular outflow track stenting versus modified Blalock-Taussig shunt. *Indian Heart Journal*. 2018;70:S394-S398. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.06.020>

Сведения об авторах

Ляпин Антон Александрович, аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: наблюдение за пациентом, статистический анализ материала, написание статьи.

ORCID: 0000-0002-1661-1135

Халивопуло Иван Константинович, заведующий кардиохирургическим отделением ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: проведение радикальной коррекции ТФ данному пациенту.

ORCID: 0000-0002-0661-4076

Шушпанников Павел Александрович, сердечно-сосудистый хирург ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: участие в стентировании ВОПЖ у данного пациента, экспертиза проведенного анализа материала.

ORCID: 0000-0001-7928-1121

Тарасов Роман Сергеевич, заведующий лабораторией рентгенэндоваскулярной и реконструктивной хирургии сосудов и сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6)

Вклад в статью: проведение стентирования ВОПЖ пациенту. Окончательная экспертиза проведенного анализа информации и корректности отображения материала.

ORCID: 0000-0003-3882-709X

Статья поступила: 14.07.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Dr. Anton A. Lyapin, MD, PhD Student, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

Contribution: provided the medical care; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-1661-1135

Dr. Ivan K. Khalivopulo, MD, Head of the Cardiovascular Surgery Unit, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: provided the medical care.

ORCID: 0000-0002-0661-4076

Dr. Pavel A. Shushpannikov, MD, Cardiovascular Surgeon, Cardiovascular Surgery Unit, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

Contribution: provided the medical care.

ORCID: 0000-0001-7928-1121

Dr. Roman S. Tarasov, MD, DSc, Head of the Laboratory for Endovascular and Reconstructive Cardiovascular Surgery, Department of Cardiovascular Surgery, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

Contribution: provided the medical care.

ORCID: 0000-0003-3882-709X

Received: 14.07.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.