

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ВЕСТНИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

Научно-теоретический журнал. Выходит один раз в два месяца. Основан в 1946 г.

Входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК
Учредитель — Российская академия медицинских наук

Главный редактор И.И. ДЕДОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Э.К. АЙЛАМАЗЯН, А.И. АРЧАКОВ, Л.И. АФТАНАС, А.А. БАРАНОВ, В.В. БЕРЕГОВЫХ (зам. гл. редактора),
Л.А. БОКЕРИЯ, Н.Н. ВОЛОДИН, Н.Ф. ГЕРАСИМЕНКО, Е.К. ГИНТЕР, П.В. ГЛЫБОЧКО, Е.З. ГОЛУХОВА,
В.В. ЗВЕРЕВ, Р.С. КАРПОВ, С.И. КОЛЕСНИКОВ, В.В. КУХАРЧУК, Г.А. МЕЛЬНИЧЕНКО, Н.А. МУХИН,
Е.Л. НАСОНОВ, Г.Г. ОНИЩЕНКО, В.И. ПЕТРОВ, В.И. ПОКРОВСКИЙ, В.П. ПУЗЫРЁВ, В.Г. САВЧЕНКО,
В.И. СЕРГИЕНКО, Г.А. СОФРОНОВ, В.И. СТАРОДУБОВ, Г.Т. СУХИХ, В.А. ТУТЕЛЬЯН (зам. гл. редактора),
И.Б. УШАКОВ, Р.М. ХАИТОВ, Е.И. ЧАЗОВ, В.П. ЧЕХОНИН, В.И. ЧИССОВ, Е.В. ШЛЯХТО

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР: А.А. КУБАНОВ

2016/ТОМ 71/№2

Журнал «Вестник Российской академии медицинских наук» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 16.09.1992 г. Регистрационный номер 01574.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов.

Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без согласия редакции является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством РФ

Тираж 1000 экз. Подписные индексы: в агентстве Роспечать — 71488, в агентстве «Пресса России» — 38814

Издательство «ПедиатрЪ»: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, 2/62, тел./факс: +7 (499) 132-30-43, <http://vestnikramn.spr-journal.ru>
e-mail: vestnikramn@nczd.ru

ООО «ХОМОПРИНТ»: 117623, Москва, ул. Типографская, д. 10

THE RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES

ANNALS OF THE RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES

Published bimonthly. Founded in 1946.

The Journal is in the List of the leading scientific journals and publications
of the Supreme Examination Board (VAK)
Founder — The Russian Academy of Medical Sciences

Editor-in-chief I.I. Dedov

EDITORIAL BOARD:

E.K. AILAMAZYAN, A.I. ARCHAKOV, L.I. AFTANAS, A.A. BARANOV, V.V. BEREGOVYKH (deputy editors-in-chief),
L.A. BOKERIYA, N.N. VOLODIN, N.F. GERASIMENKO, E.K. GINTHER, P.V. GLYBOCHKO, L.Z. GOLUKHOVA,
V.V. ZVEREV, R.S. KARPOV, S.I. KOLESNIKOV, V.V. KUKHARCHUK, G.A. MELNICHENKO, N.A. MUKHIN,
E.L. NASONOV, I.I. ONISHCHENKO, V.I. PETROV, V.I. POKROVSKII, V.P. PUZYREV, V.G. SAVCHENKO,
V.I. SERGIENKO, G.A. SOFRONOV, V.I. STARODUBOV, G.T. SUKHIKH, V.A. TUTELYAN (deputy editors-in-chief),
I.B. USHAKOV, R.M. KHAITOV, E.I. CHAZOV, V.P. CHEKHONIN, V.I. CHISSOV, E.V. SHLYAKHTO

RESEARCH EDITOR: A.A. KUBANOV

2016/ 71 (2)

Mass media registration certificate dated September, 16, 1992. Series № 01574 Federal service for surveillance over non-violation
of the legislation in the sphere of mass communications and protection of cultural heritage.

Editorial office takes no responsibility for the contents of advertising material.

No part of this issue may be reproduced without permission from the publisher. While reprinting publications one must make reference
to the journal «Annals Of The Russian Academy Of Medical Sciences»

Edition 1000 copies. Subscription indices are in the catalogue «Rospechat» 71488

Publisher «PEDIATR»: 2/62, Lomonosov avenue, Moscow, 119991, tel./fax: +7 (499) 132-30-43, <http://vestnikramn.spr-journal.ru>
e-mail: vestnikramn@nczd.ru

Printed in the printing office «KHOMOPRINT», 10, Tipografskaya st., Moscow, 117623

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОХИМИИ**
**BIOCHEMISTRY:
CURRENT ISSUES**

- С.А. Афанасьев, М.В. Егорова, Т.В. Куцыкова, С.В. Попов* 97 *S.A. Afanasiev, M.V. Egorova, T.V. Kutsykova, S.V. Popov*
Влияние жирных кислот на поглощение кислорода
изолированными кардиомиоцитами крыс с ишеми-
ческим или диабетическим поражением сердца
Influence of Fatty Acids on Oxygen Consumption in
Isolated Cardiomyocytes of Rats with Ischemic or Diabetic
Heart Disease

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ВНУТРЕННИХ
БОЛЕЗНЕЙ**
**INTERNAL DISEASES:
CURRENT ISSUES**

- С.В. Смирнова, А.А. Барило, М.В. Смольникова* 102 *S.V. Smirnova, A.A. Barilo, M.V. Smolnikova*
Заболевания гепатобилиарной системы как предикторы прогрес-
сирования псориаза
Hepatobiliary System Diseases as the Predictors of Psoriasis
Progression

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
МИКРОБИОЛОГИИ**
**MICROBIOLOGY:
CURRENT ISSUES**

- А.В. Рунина, А.С. Старовойтова, Д.Г. Дерябин, А.А. Кубанов* 109 *A.V. Runina, A.S. Starovoitova, D.G. Deryabin, A.A. Kubanov*
Рекомбинантный белок Тр0965
Treponema pallidum как перспективный антиген для
совершенствования серологической диагностики
сифилиса
Evaluation of the Recombinant Protein Тр0965 of
Treponema Pallidum as Perspective Antigen for the
Improved Serological Diagnosis of Syphilis

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
ОНКОЛОГИИ**
**ONCOLOGY:
CURRENT ISSUES**

- Ю.В. Рылова, Л.Б. Буравкова, Б.Д. Животовский* 114 *Yu.V. Rylova, L.B. Buravkova, B.D. Zhitovskiy*
Воздействие цисплатина на мультипотентные мезен-
химальные стромальные клетки жировой ткани чело-
века при различном уровне кислорода
The Effects of Cysplatin on Human Adipose Tissue Derived
Mesenchymal Stromal Cells Under Different Oxygen
Levels
- Г.М. Волгарева, И.Н. Михайлова, Д.А. Головина* 121 *G.M. Volgareva, I.N. Mikhaylova, D.A. Golovina*
Меланомы и вирусы папилломы человека: есть ли перспектива
для исследования?
Melanoma and Human Papillomaviruses: Is There an Outlook for
Study?

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
ПЕДИАТРИИ**
**PEDIATRICS:
CURRENT ISSUES**

- Е.Ю. Брыксина, В.С. Брыксин, А.В. Почивалов* 128 *E.Y. Bryksina, V.S. Bryksin, A.V. Pochivalov*
Частота развития, патоморфоз и исходы бронхолегочной
дисплазии, ассоциированной с микроаспирацией
желудочного содержимого
Incidence, pathomorphism and outcomes of the bronchopulmonary
dysplasia associated with microaspiration of gastric
contents

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
РЕВМАТОЛОГИИ**
**RHEUMATOLOGY:
CURRENT ISSUES**

- И.А. Стародубцева, Л.В. Васильева, А.В. Никитин* 141 *I.A. Starodubtseva, L.V. Vasilieva, A.V. Nikitin*
Анализ эффективности применения ингибитора интерлей-
кина 1 в комплексном лечении вторичного остеоар-
троза с учетом динамики клинико-функциональных
показателей
The Analysis of Efficacy of The Application of Interleukin-1 Inhibitor
in the Complex Therapy of Secondary Osteoarthritis
Taking Into Account the Dynamics of Clinical and
Functional Indicators

- П.Н. Кравченко, Г.А. Жулай, А.В. Чуров, Е.К. Олейник, 148* *P.N. Kravchenko, G.A. Zhulai, A.V. Churov, E.K. Oleinik, V.M. Oleinik, O.Yu. Barysheva, N.N. Vezikova, I.M. Marusenko* Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом
- P.N. Kravchenko, G.A. Zhulai, A.V. Churov, E.K. Oleinik, V.M. Oleinik, O.Yu. Barysheva, N.N. Vezikova, I.M. Marusenko* Subpopulations of Regulatory T-lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
ЭНДОКРИНОЛОГИИ**

**ENDOCRINOLOGY:
CURRENT ISSUES**

- А.О. Разина, С.Д. Руненко, Е.Е. Ачкасов* Проблема ожирения: современные тенденции в России и в мире **154** *A.O. Razina, S.D. Runenko, E.E. Achkasov* Obesity: Current Global and Russian Trends

**СОСТОЯНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ
НАУКИ**

STATE OF MEDICAL SCIENCES

- А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, И.В. Смирнов, 160* *A.A. Baranov, L.S. Namazova-Baranova, I.V. Smirnov, D.A. Devyatkin, A.O. Shelmanov, E.A. Vishneva, E.V. Antonova, V.I. Smirnov* Технологии комплексного интеллектуального анализа клинических данных
- A.A. Baranov, L.S. Namazova-Baranova, I.V. Smirnov, D.A. Devyatkin, A.O. Shelmanov, E.A. Vishneva, E.V. Antonova, V.I. Smirnov* Technologies for Complex Intelligent Analysis of Clinical Data

ЮБИЛЕИ

ANNIVERSARIES, CONGRATULATIONS

Ирина Соломоновна Фрейдлин

172 *Irina Solomonovna Freidlin*

DOI: 10.15690/vramn612

С.А. Афанасьев, М.В. Егорова, Т.В. Куцыкова, С.В. Попов

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томск, Российская Федерация

Влияние жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца

Обоснование. Одной из причин нарушения функциональной состоятельности миокарда считается нарастание кислородного и энергетического дефицита. Его возникновение связывают с ингибированием окисления глюкозы жирными кислотами. Однако в последнее время были опубликованы новые данные, доказывающие необходимость и высокую значимость жирных кислот в поддержании и регуляции функциональной активности миокарда при хронических патологиях. **Цель исследования:** изучить влияние свободных полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот (ЖК) на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами intactных крыс и животных с ишемическим или диабетическим поражением сердца. **Методы.** Выполнено нерандомизированное контролируемое исследование. Рассмотрены 3 группы крыс-самцов линии Вистар (масса 250–300 г) по 10 животных в каждой группе. Инфаркт миокарда (группа «инфаркт») вызывали перевязкой левой коронарной артерии, а диабет (группа «диабет») — внутривентрикулярной инъекцией стрептозоцина. Группа «контроль» была представлена intactными животными. Изолированные кардиомиоциты получали ферментативным способом. Потребление кислорода оценивали полярографически при разной насыщенности инкубационной среды кислородом ($[O_2] \leq 8$ мг/л и $[O_2] \geq 16$ мг/л). В качестве жирных кислот использовали арахидоновую и пальмитиновую. **Результаты.** Установлено, что введение в среду инкубации 20 мМ арахидоновой или пальмитиновой ЖК статистически значимо увеличивало потребление кислорода кардиомиоцитами intactных крыс. Как при ишемическом, так и при диабетическом поражении сердца был получен прямо противоположный результат. Наиболее выраженное снижение потребления кислорода показано при сахарном диабете. **Заключение.** Ингибирующий эффект ЖК на скорость потребления кислорода как при ишемическом, так и при диабетическом поражении сердца может быть обусловлен их влиянием на барьерные функции митохондриальных мембран кардиомиоцитов, активность мембрансвязанных ферментов и сопряженные с ними процессы.

Ключевые слова: кардиомиоциты, жирные кислоты, стрептозоциновый диабет, постинфарктный кардиосклероз.

(Для цитирования: Афанасьев СА, Егорова МВ, Куцыкова ТВ, Попов СВ. Влияние жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца. Вестник РАМН. 2016;71(2):97–101. doi: 10.15690/vramn612)

97

S.A. Afanasiev, M.V. Egorova, T.V. Kutsykova, S.V. Popov

Research Institute for Cardiology, Tomsk, Russian Federation

Influence of Fatty Acids on Oxygen Consumption in Isolated Cardiomyocytes of Rats with Ischemic or Diabetic Heart Disease

Background: one of the reasons of violation of the functional viability of the myocardium is considered to be the oxygen deprivation and lack of energy. The reason is the inhibitory effect of fatty acids on glucose oxidation. Recently, however, new data have been published proving the need for fatty acids and their importance in the maintenance and regulation of the functional activity of the myocardium in chronic pathology. **Objective:** to investigate the influence of free polyunsaturated and saturated fatty acids (FA) on the oxygen uptake of isolated cardiomyocytes in intact rats and animals with ischemic or diabetic heart disease. **Methods:** the executed non-randomized controlled study. It included 3 groups of male rats of Wistar line (weight 250–300 g) with 10 animals in each group. Myocardial infarction (“heart attack” group) was caused by ligation of the left coronary artery, diabetes (“diabetes” group) — by intraperitoneal injection of streptozotocin, and «control» group (intact animals). Myocardial infarction caused by ligation of the left coronary artery, and diabetes by intraperitoneal injection of streptozotocin. Isolated cardiac myocytes were obtained by the enzymatic method. Oxygen consumption was assessed polarographically at different saturation incubation medium with oxygen ($[O_2] \leq 8$ mg/l and $[O_2] \geq 16$ mg/l). Arachidonic and palmitic acids were applied as fatty acids. **Results:** It is established that the introduction of the incubation medium 20 μm arachidonic or palmitic fatty acid significantly increased the oxygen consumption of intact cardiomyocytes of rats. Both at the ischemic and at the diabetic injury to the heart the opposite result was obtained. The most pronounced decrease in oxygen consumption was indicated in the group with diabetes mellitus. **Conclusion:** The inhibitory effect of LCD on the rate of oxygen consumption may be associated with the influence of the ischemic or diabetic injury to the heart on the barrier function of mitochondrial membranes of cardiomyocytes, the activity of membrane-associated enzymes and their associated processes.

Key words: cardiomyocytes, fatty acids, streptozotocin-induced diabetes, myocardial infarction.

(Для цитирования: Afanasiev SA, Egorova MV, Kutsykova TV, Popov SV. Influence of Fatty Acids on Oxygen Consumption in Isolated Cardiomyocytes of Rats with Ischemic or Diabetic Heart Disease. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2016;71(2):97–101. doi: 10.15690/vramn612)

Обоснование

Хорошо известно, что одним из факторов, приводящих к нарушению функциональной состоятельности миокарда, является несоответствие между увеличением потребности миокарда в кислороде и нарастанием кислородного, а также энергетического дефицита. Этот фактор имеет место при формировании сердечной недостаточности ишемического генеза и развитии «метаболической» ишемии миокарда при сахарном диабете [1]. Возникновение такого дисбаланса связывают с ингибированием окисления глюкозы жирными кислотами [1–3]. Среди результатов экспериментальных и клинических исследований можно встретить часто противоречащие друг другу данные об интенсивности процессов окисления жирных кислот в кардиомиоцитах и, соответственно, о «кислородном запросе» миокарда [1, 4]. Появление противоречивых представлений часто связано с вынужденным сопоставлением литературных данных, полученных на разных объектах и в разных условиях. Так, одной из проблем экстраполяции результатов, полученных на изолированных органах, клетках и митохондриях, являются экспериментальные условия, создаваемые искусственно и, конечно же, не в полной мере отражающие естественные условия *in situ*. В частности, для изолированных кардиомиоцитов невозможно воспроизвести условия естественной оксигенации и ее регуляции, обусловленной поступлением кислорода из крови и изменением коронарного кровотока. Однако в последнее время были опубликованы данные исследований, доказывающие необходимость и высокую значимость длинноцепочечных жирных кислот в поддержании и регуляции функциональной активности патологического миокарда [5–7].

Цель исследования — оценить влияние свободных полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот (ЖК) на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца.

Методы

План (дизайн) исследования

Выполнено экспериментальное нерандомизированное контролируемое проспективное исследование.

Критерии соответствия

В работе использованы 3 группы крыс-самцов линии Вистар (масса 250–300 г): группа «контроль» (интактные крысы, $n=10$), группа «инфаркт» ($n=10$) и группа «диабет» ($n=10$).

Условия проведения

Крысы имели свободный доступ к воде и пище и содержались в стандартных условиях вивария.

Продолжительность исследования

После моделирования инфаркта миокарда и инициации сахарного диабета последующие исследования выполняли через 6 нед.

Описание медицинского вмешательства

Для моделирования инфаркта миокарда у крыс перерезывали левую переднюю нисходящую коронарную артерию [8, 9]. Для инициации сахарного диабета крысам производили однократную инъекцию стрептозотоцина (Sigma, США) в дозе 60 мг/кг, внутривенно [10].

Исходы исследования

Через 6 нед после перевязки коронарной артерии у крыс формировался постинфарктный кардиосклероз [9]. Инъекция стрептозотоцина приводила к развитию сахарного диабета I типа. Диабет верифицировали по увеличению в крови крыс концентрации глюкозы (в 3–4,5 раза), снижению массы тела, развитию полиурии и полидипсии.

Методы регистрации исходов

Для получения изолированных кардиомиоцитов применяли собственной модификации метод ферментативного разделения миокарда взрослой крысы [11, 12]. Скорость потребления кислорода кардиомиоцитами определяли полярографически, используя электрод Кларка [12, 13]. Инкубацию кардиомиоцитов проводили в растворе Кребса–Хенселяйта с добавлением 2 мМ хлорида кальция (CaCl_2). Измерения выполняли в термостабилизированной ячейке при температуре раствора 37 °C и pH 7,4 в условиях постоянного перемешивания магнитной мешалкой. Концентрацию белка в пробе определяли методом Лоури.

Все измерения проводили в течение первого часа после получения суспензии изолированных кардиомиоцитов. Учитывая высокую чувствительность кардиомиоцитов к кислороду, инкубацию осуществляли в среде с низкой концентрацией кислорода ($[\text{O}_2] \leq 8$ мг/л) и в среде с высоким содержанием кислорода ($[\text{O}_2] \geq 16$ мг/л). В качестве полиненасыщенной и насыщенной жирных кислот использовали, соответственно, арахидоновую и пальмитиновую (Sigma, США), которые добавляли в среду инкубации в концентрации 20 мМ/л. Скорость потребления кислорода выражали как нМ O_2 в минуту на 1 мг белка.

Этическая экспертиза

Утверждение протокола исследования в Этическом комитете не проводили.

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывался. Данные представлены как среднее значение (M) и стандартное отклонение (\pm SD). Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили по критерию Шапиро–Уилка. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках гипотезу о равенстве средних выборочных величин проверяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Участники исследования

Ни одна из крыс опытных групп после перевязки коронарной артерии или инъекции стрептозотоцина не погибла, и по прошествии 6 нед животные были взяты в следующие этапы исследования.

Основные результаты исследования

В табл. 1 приведены данные, полученные при исследовании скорости потребления кислорода изолированными кардиомиоцитами в среде с высоким содержанием кислорода. Согласно представленным значениям, исходная скорость потребления кислорода изолированными кардиомиоцитами, полученными из сердец крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца, в 2–2,5

Таблица 1. Скорость поглощения кислорода (нМ в мин на 1 мг белка) изолированными кардиомиоцитами при высокой концентрации ($[O_2] \geq 16$ мг/л) в среде инкубации

Группы	Условия инкубации		
	Без добавок	Пальмитиновая кислота, 20 μ М /л	Арахидоновая кислота, 20 μ М /л
Контроль	65,4 \pm 3,0	86,2 \pm 5,0#	85,0 \pm 7,1#
«Инфаркт»	152,3 \pm 8,5*	102,1 \pm 6,5*#	125,3 \pm 9,5*#
«Диабет»	164,3 \pm 12,4*	128,3 \pm 9,8*#	118,2 \pm 6,5*#

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с соответствующим показателем в контрольной группе, # — $p < 0,05$ — внутригрупповые сравнения.

Таблица 2. Скорость поглощения кислорода (нМ в мин на 1 мг белка) изолированными кардиомиоцитами при низкой концентрации ($[O_2] \leq 8$ мг/л) в среде инкубации

Группы	Условия инкубации		
	Без добавок	Пальмитиновая кислота, 20 μ М /л	Арахидоновая кислота, 20 μ М /л
Контроль	49,5 \pm 2,1	32,4 \pm 3,0#	30,5 \pm 4,1#
«Инфаркт»	81,3 \pm 6,5*	49,3 \pm 6,3*#	51,3 \pm 5,5*#
«Диабет»	97,8 \pm 4,0*	104,3 \pm 8,8*	108,5 \pm 10,0*

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с соответствующим показателем в контрольной группе, # — $p < 0,05$ — внутригрупповые сравнения.

раза превышает таковую в кардиомиоцитах из сердец интактных крыс.

Введение в среду инкубации клеток свободных жирных кислот, как пальмитиновой, так и арахидоновой, приводило к статистически значимому увеличению потребления кислорода кардиомиоцитами интактных крыс, но к снижению скорости потребления кислорода, если использовали кардиомиоциты крыс с развившимися ишемическими или диабетическими поражениями сердца (см. табл. 1). Более того, изменения, отмеченные в контрольной группе, а также в группах «инфаркт» и «диабет», имели противоположную направленность. Так, если для кардиомиоцитов интактных крыс присутствие в инкубационной среде жирных кислот привело к увеличению потребления кислорода (при использовании пальмитиновой кислоты почти на 32%), то для кардиомиоцитов крыс в группах «инфаркт» и «диабет» было отмечено не менее выраженное снижение скорости потребления кислорода.

При сопоставлении данных, представленных в табл. 1 и 2, видно, что в среде инкубации с низким содержанием кислорода была зафиксирована более низкая исходная скорость дыхания кардиомиоцитов независимо от того, из сердец крыс какой группы они были выделены. Различия для групп «контроль», «диабет» и «инфаркт» составили 1,3; 1,7 и 1,9 раза, соответственно. Введение в этих условиях пальмитиновой или арахидоновой кислоты приводило к еще большему снижению скорости потребления кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. В группе «инфаркт» жирные кислоты снижали скорость потребления кислорода кардиомиоцитами практически до значений, полученных в контрольной группе (интактные крысы). Однако в группе «диабет» ни одна из использованных жирных кислот не оказывала заметного влияния на дыхание кардиомиоцитов (см. табл. 2).

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Из полученных данных следует, что изменение интенсивности дыхания изолированных кардиомиоцитов в присутствии свободных жирных кислот может быть разнонаправленным. Наблюдаемый эффект зависит как от функционального состояния кардиомиоцитов, так и от содержания кислорода во внеклеточном пространстве. Нам представляется, что такой результат вполне может

быть объясним ограничением скорости диффузии O_2 при уменьшении его градиента. Разное влияние насыщенной жирной кислоты на интенсивность потребления кислорода в кардиомиоцитах интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением миокарда, по всей видимости, объясняется разными метаболическими возможностями их митохондрий. В первую очередь, здесь имеет значение способность митохондрий утилизировать кислород и использовать жирные кислоты в качестве энергетического субстрата.

Обсуждение основного результата исследования

Полученные нами результаты вполне согласуются с существующими представлениями о метаболических последствиях для миокарда в результате ишемического воздействия и сахарного диабета [3, 14, 15]. Насыщенные и ненасыщенные свободные жирные кислоты приводили к однонаправленным изменениям потребления кислорода кардиомиоцитами, выделенными из миокарда интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца. Отсутствие различий в эффектах жирных кислот на дыхание кардиомиоцитов в рассматриваемых условиях позволяет предположить, что оно является следствием неспецифического действия жирных кислот на митохондриальные процессы, как это было показано нами ранее [13].

Обнаруженная разнонаправленность действия и кислородозависимость влияния жирных кислот, как насыщенной, так и ненасыщенной, по-видимому, объясняется именно функциональным состоянием митохондрий, их способностью утилизировать кислород и использовать жирные кислоты в качестве энергетического субстрата. Традиционно считается, что жирные кислоты усиливают кислородный запрос кардиомиоцитов, что в свою очередь должно увеличивать кислородный дефицит при ишемии миокарда [3, 14, 15]. Однако наши результаты не согласуются с этим представлением. Напротив, судя по полученным данным, жирные кислоты поддерживают определенный баланс между поступлением кислорода и его расходом на уровне клетки.

Результаты нашей работы перекликаются с предположениями и выводами, сделанными другими исследователями [4, 6]. Так, авторы этих публикаций отмечают, что в здоровом организме стойкое повышение циркулирующих жирных кислот не является необходимым и потенциально способно привести к нарушению функциональной актив-

ности миокарда. Однако жирные кислоты необходимы для поддержания нормальной активности кардиомиоцитов при уже развившихся заболеваниях сердца. Одним из возможных механизмов обнаруженных эффектов экзогенных жирных кислот на дыхание кардиомиоцитов может быть их способность как увеличивать неспецифическую проницаемость мембран митохондрий, так и ингибировать эти процессы в патологическом миокарде.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты на клеточном уровне способны поддерживать баланс между поступлением кислорода и его расходом.

Действия свободных жирных кислот на интенсивность дыхания изолированных кардиомиоцитов определяется как их функциональным состоянием, так и содержанием кислорода во внеклеточном пространстве. Это обстоятельство, вероятно, может определять состояние энергетического метаболизма кардиомиоцитов при

реальном ишемическом или диабетическом поражении сердца пациентов.

Одним из возможных механизмов обнаруженных эффектов экзогенных жирных кислот может быть их влияние на неспецифическую проницаемость мембран митохондрий.

Источник финансирования

Проведенное исследование выполнено на личные средства авторского коллектива.

Конфликт интересов

Представленный в статье материал является частью диссертационной работы Куцыковой Т.В. (предполагаемый срок защиты — 2016 г.).

Авторы данной статьи подтверждают отсутствие иных явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оруджева С.А., Звягин А.А. Оценка функциональных резервов сердечно-сосудистой системы у больных сахарным диабетом. Опасности анестезии и возможности анестезиологического обеспечения больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы // *Новости анестезиологии и реаниматологии*. — 2006. — №3. — С. 1–19. [Orudzheva SA, Zvyagin AA. Otsenka funktsional'nykh rezervov serdechno-sosudistoi sistemy u bol'nykh sakharnym diabetom. Opasnosti anesteziyi i vozmozhnosti anesteziologicheskogo obespecheniya bol'nykh s gnoino-nekroticheskimi formami sindroma diabeticheskoi stopy. *Novosti anesteziologii i reanimatologii*. 2006;3:1–19. (In Russ).]
2. Вельков В. Свободные жирные кислоты — фактор риска инсулинорезистентности и ишемии: перспективы для оценки рисков и диагностики // *Поликлиника*. — 2008. — №4. — С. 50–51. [Vel'kov V. Svobodnye zhirnye kisloty — novyi marker insulinorezistentnosti i ishemii: perspektivy dlya otsenki riskov i diagnostiki. *Poliklinika*. 2008;4:50–51. (In Russ).]
3. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90(1):207–258. doi: 10.1152/physrev.00015.2009.
4. Brindley DN, Kok BPC, Kienesberger PC, et al. Shedding light on the enigma of myocardial lipotoxicity: the involvement of known and putative regulators of fatty acid storage and mobilization. *Am J Physiol*. 2010;298:E897–E908. doi: 10.1152/ajpendo.00509.2009.
5. Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2014;160(6):398–406. doi: 10.7326/M13-1788.
6. Mozaffarian D, Lemaitre RH, King IB, et al. Plasma Phospholipid Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Total and Cause-Specific Mortality in Older Adults: the Cardiovascular Health Study. *Ann Intern Med*. 2013;158:515–525. doi: 10.7326/0003-4819-158-7-201304020-00003.
7. Van Bilsen M, Planavila A. Fatty acids and cardiac disease: fuel carrying a message. *Acta Physiol*. 2014;211(3):476–490. doi: 10.1111/apha.12308.
8. Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Барзах Е.И. Активность перекисного окисления липидов и функциональное состояние миокарда при ремоделировании сердца крысы после экспериментального инфаркта // *Кардиология*. — 2007. — №6. — С. 41–45. [Rebrova TY, Kondrat'eva DS, Afanas'ev SA, Barzakh EI. Activity of lipid peroxidation and functional state of the myocardium in remodeling of rat heart after experimental myocardial infarction. *Kardiologiya*. 2007;6:41–45. (In Russ).]
9. Афанасьев С.А., Реброва Т.Ю., Кондратьева Д.С. Особенности фосфолипидного состава мембран эритроцитов в условиях постинфарктного кардиосклероза // *Биомедицинская химия*. — 2007. — №53. — С. 541–546. [Afanas'ev SA, Rebrova TY, Kondrat'eva DS. Phospholipid composition of erythrocyte membranes under conditions of postmyocardial infarction cardiosclerosis. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2007;53:541–546. (In Russ).]
10. Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Попов С.В. Разработка модели сочетанной патологии сердечной недостаточности и сахарного диабета 1-го типа в эксперименте // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2012. — Т. 153. — №4. — С. 523–526. [Afanasiev SA, Kondratyeva DS, Popov SV. Development of an Experimental Model of Cardiac Failure Combined with Type I Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med*. 2012;153(4):530–532.] doi: 10.1007/s10517-012-1759-8.
11. Егорова М.В., Афанасьев С.А., Попов С.В. Простой метод выделения кардиомиоцитов из сердца взрослой крысы // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2005. — Т. 140. — №9. — С. 357–360. [Egorova MV, Afanas'ev SA, Popov SV. A Simple Method for Isolation of Cardiomyocytes from Adult Rat Heart. *Bull Exp Biol Med*. 2005;140(3):370–373.] doi: 10.1007/s10517-005-0492-y.
12. Егорова М.В., Афанасьев С.А., Попов С.В. Роль фосфолипазы А2 в активации дыхания изолированных кардиомиоцитов при постинфарктном кардиосклерозе // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2008. — Т. 146. — №12. — С. 631–633. [Egorova MV, Afanas'ev SA, Popov SV. Role of Phospholipase A2 in Activation of Isolated Cardiomyocyte Respiration in Postinfarction Cardiosclerosis. *Bull Exp Biol Med*. 2009;146(6):695–697.] doi: 10.1007/s10517-009-0398-1.
13. Егорова М.В., Афанасьев С.А. Регуляторная роль свободных жирных кислот в поддержании мембранного гомеостаза митохондрий сердца при экспериментальной ишемии миокарда // *Бюллетень сибирской медицины*. — 2012. — №3. — С. 31–38. [Egorova MV, Afanas'ev SA. Regulatory role of free fatty acids

- in maintain of membrane homeostasis in heart mitochondria at experimental myocardial ischaemia. *Bulleten' sibirskoi meditsiny*. 2012;3:31–38. (In Russ).]
14. Александров А.А. Диабетическое сердце: схватка за митохондрии // *Consilium medicum (Педиатрия)*. – 2003. – №5. – С. 509–513. [Aleksandrov AA. Diabeticheskoe serdtse: skhvatka za mitokhondrii. *Consilium medicum (Pediatriya)*. 2003;5:509–513. (In Russ).]
15. Ashrafian H, Redwood C, Blair E, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet*. 2003;19(5):263–268. doi: 10.1016/s0168-9525(03)00081-7.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Афанасьев Сергей Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии
Адрес: 634012, Томск, ул. Киевская, д. 111А, **e-mail:** tursky@cardio-tomsk.ru

Егорова Маргарита Владимировна, доктор биологических наук, доцент, научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии
Адрес: 634012, Томск, ул. Киевская, д. 111А, **e-mail:** mwegorova@yadex.ru

Куцькова Татьяна Викторовна, аспирант лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии
Адрес: 634012, Томск, ул. Киевская, д. 111А, **e-mail:** naf30@mail.ru

Попов Сергей Валентинович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отделения хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции НИИ кардиологии
Адрес: 634012, Томск, ул. Киевская, д. 111А, **e-mail:** psv@cardio-tomsk.ru

Заболевания гепатобилиарной системы как предикторы прогрессирования псориаза

Цель исследования. Оценить состояние гепатобилиарной системы при псориазе и псориатическом артрите с целью установления причинно-следственной взаимосвязи и выявления клинико-функциональных предикторов прогрессирования псориатической болезни. **Методы.** В исследование включены больные распространенным вульгарным псориазом ($n=175$) в возрасте от 18 до 66 лет и практически здоровые доноры крови ($n=30$), сопоставимые по полу и возрасту: 1-я группа — больные псориазом (ПС, $n=77$), 2-я группа — больные псориатическим артритом (ПсА, $n=98$), 3-я группа — контроль. Оценку функционального состояния гепатобилиарной системы проводили с помощью анализа клинико-anamnestических данных и лабораторно-инструментальных методов обследования. **Результаты.** Выявлены предикторы псориаза: наличие триггеров (стресс и алиментарный фактор); эозинофилия; повышение уровней общего билирубина, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтрансферазы; лямблиоз; носительство вируса гепатита С; протоковые изменения и очаговые образования в печени; утолщение стенок желчного пузыря по данным ультразвукового исследования. Предикторы псориатического артрита: возраст старше 50 лет; диспепсические жалобы; наличие сопутствующих заболеваний гепатобилиарной системы; положительный синдром правого подреберья; клинические признаки хронического холецистита; избыточная масса тела; высокий уровень общего билирубина, холестерина и липопротеидов низкой плотности; гепатомегалия; неалкогольная жировая болезнь печени. **Заключение.** Высокая активность цитолиза гепатоцитов, холестаза, воспалительного процесса, наличие метаболических нарушений позволяют рассматривать псориатический артрит как тяжелую клиническую стадию псориатической болезни, где гепатобилиарная система, в свою очередь, является одним из центральных органов-мишеней в системном псориатическом процессе. Неалкогольная жировая болезнь печени и хронический холецистит являются предикторами прогрессирования псориатической болезни.

Ключевые слова: псориаз, псориатический артрит, псориатическая болезнь, гепатобилиарная система, неалкогольная жировая болезнь печени.

(Для цитирования: Смирнова С.В., Барило А.А., Смольникова М.В. Заболевания гепатобилиарной системы как предикторы прогрессирования псориаза. Вестник РАМН. 2016;71(2):102–108. doi: 10.15690/vramn636)

Обоснование

Псориаз (ПС) — хроническое системное рецидивирующее заболевание, проявляющееся гиперпролиферацией кератиноцитов и характеризующееся поражением различных органов и систем с преимущественным вовлечением в патологический процесс кожи [1–4]. Актуальность изучения ПС обусловлена высокой распространенностью

заболевания, формированием тяжелых и резистентных к проводимой терапии форм, повышением смертности больных, недостаточной эффективностью существующих методов патогенетического и симптоматического лечения [5]. Одной из наиболее тяжелых клинических форм прогрессирования ПС с формированием необратимых инвалидизирующих костно-деструктивных повреждений является псориатический артрит (ПсА) [6, 7].

S.V. Smirnova, A.A. Barilo, M.V. Smolnikova

Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Hepatobiliary System Diseases as the Predictors of Psoriasis Progression

Purpose of the study. To assess the state of the hepatobiliary system in psoriasis and psoriatic arthritis in order to establish a causal relationship and to identify clinical and functional predictors of psoriatic disease progression. **Methods.** The study included patients with extensive psoriasis vulgaris ($n=175$) aged 18 to 66 years old and healthy donors ($n=30$), matched by sex and age: Group 1 — patients with psoriasis (PS, $n=77$), group 2 — patients with psoriatic arthritis (PsA, $n=98$), group 3 — control. The evaluation of functional state of the hepatobiliary system was performed by the analysis of the clinical and anamnestic data and by the laboratory-instrumental methods. **Results.** We identified predictors of psoriasis: triggers (stress and nutritional factor), increased total bilirubin, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase, eosinophilia, giardiasis, carriers of hepatitis C virus, ductal changes and focal lesions in the liver, thickening of the walls of the gallbladder detected by ultrasound. Predictors of psoriatic arthritis: age over 50 years, dyspeptic complaints, the presence of hepatobiliary system diseases, the positive right hypochondrium syndrome, the clinical symptoms of chronic cholecystitis, excess body weight, high levels of bilirubin, cholesterol and low density lipoprotein, hepatomegaly, non-alcoholic fatty liver disease. **Conclusion.** High activity of hepatocytes cytolysis, cholestasis, inflammation, metabolic disorders let us consider psoriatic arthritis as a severe clinical stage psoriatic disease when the hepatobiliary system, in turn, is one of the main target organs in systemic psoriatic process. Non-alcoholic fatty liver disease and chronic cholecystitis are predictors of psoriatic disease progression.

Key words: psoriasis; psoriatic arthritis; psoriatic disease; hepatobiliary system; non-alcoholic fatty liver disease.

(For citation: Smirnova SV, Barilo AA, Smolnikova MV. Hepatobiliary System Diseases as the Predictors of Psoriasis Progression. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(2):102–108. doi: 10.15690/vramn636)

Вовлечение в патологический процесс сердечно-сосудистой, пищеварительной, нервной и других систем организма позволяют рассматривать ПС и ПсА с позиции системного заболевания — псориазической болезни [8]. Поскольку манифестация заболеваний печени и желчевыводящих путей может проявляться различными внеорганными признаками, в том числе кожными высыпаниями, важная роль в семиотике органопатий отводится функциональным изменениям гепатобилиарной системы (ГБС), распространенность которой при ПС и ПсА составляет от 42,0 до 71,0% случаев [9–12]. Заболевания ГБС негативно влияют на течение псориазической болезни, обуславливая частые рецидивы, утяжеление кожного процесса и резистентность к проводимой фармакотерапии [13, 14]. В связи с тем, что печень участвует в белковом, жировом, углеводном, водном, минеральном и пигментном обмене, а также выполняет детоксикационную функцию, можно предположить, что в патогенезе ПС и ПсА гепатобилиарная система инициирует и усугубляет выраженность эндотоксикоза, воспалительного ответа, иммунного дисбаланса, поддерживает нарушения процессов регенерации в коже и суставах [15, 16]. Кроме того, эндотоксинемия и длительная иммуносупрессивная терапия при ПС также приводят к повреждению печеночных клеток [14].

Несмотря на проявленный интерес к вопросу о взаимосвязи патологии ГБС и ПС, нет данных о клинико-функциональных предикторах прогрессирования псориазической болезни. Следствием этого является ограниченное количество данных в литературе о методах скрининга билиарной патологии у больных с различными клиническими формами и степенью тяжести ПС, а также при прогрессировании патологии.

Цель исследования: оценить состояние гепатобилиарной системы при псориазе и псориазическом артрите с целью установления причинно-следственной взаимосвязи и выявления клинико-функциональных предикторов прогрессирования псориазической болезни.

Методы

План (дизайн) исследования

Контролируемое нерандомизированное исследование.

В исследование включены больные распространенным вульгарным ПС (n=175) в возрасте от 18 до 66 лет.

Критерии соответствия

Критерии включения в исследование: наличие клинически подтвержденного ПС либо ПсА, письменное информированное добровольное согласие больного на участие в исследовании.

Критерии исключения из исследования: наличие сопутствующих соматических хронических заболеваний в стадии декомпенсации, указание в анамнезе на проведенную ранее терапию системными глюкокортикостероидами либо цитостатиками, наличие доброкачественных и злокачественных опухолей, сахарного диабета, системных и психических заболеваний, беременность и лактация, алкоголизм и/или наркомания.

Условия проведения

Обследование больных и набор материала проводились на базе Краевого кожно-венерологического диспансера № 1 г. Красноярск в 2008/2009 и 2013/2014 гг. Лабораторные и инструментальные исследования проводились на базе клиники и лаборатории молекулярно-кле-

точной физиологии и патологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера.

Продолжительность исследования

Обследование больных и набор материала проводились в 2008/2009 и 2013/2014 гг.

Описание медицинского вмешательства

Больным проводились опрос и осмотр кожных покровов, антропометрия (с использованием ростомера и напольных весов), обследование состояния гепатобилиарной системы: пальпация живота, исследование симптомов Кера, Мюсси (синоним — френрикус-симптом), Ортнера–Грекова.

Пальпацию живота проводят в положении больного лежа на спине с опущенными вдоль туловища или сложенными на груди руками и выпрямленными ногами. Врач предварительно обрабатывает руки антисептиком и садится правым боком у постели больного, лицом к нему. Пальпацию проводят правой рукой на симметричных участках брюшной стенки. Пальпирующую ладонь с сомкнутыми и выпрямленными пальцами кладут на исследуемый участок. Последовательно ощупывают вначале парные области живота — подвздошные, боковые и подреберные, а затем непарные — эпигастральную, пупочную и надлобковую. Пальпацию желчного пузыря проводят в области нижнего края печени, кнаружи от латерального края правой прямой мышцы живота, приблизительно в области пересечения продолженной на брюшную стенку правой срединно-ключичной линии с горизонтальной линией, проведенной на уровне IX ребер. Симптом Кера определяют при проведении пальпации в правом подреберье на высоте вдоха, симптом Мюсси — при надавливании между ножками грудино-ключично-сосцевидной мышцы, симптом Ортнера–Грекова — при поколачивании ребром ладони по правой части реберной дуги.

Лабораторные обследования проводились согласно стандартам оказания медицинской помощи: развернутый анализ крови, биохимический анализ крови, анализ на антиген вируса гепатита В (HbsAg); суммарные антитела к вирусу гепатита С (anti-HCV), антигенам гельминтов (*Opisthorchis felineus*, *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis*, *Echinococcus granulosus*, *Lambliа intestinalis*). Материалом для лабораторного исследования служила периферическая кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 8–10 мл. Кровь забирали в специальные стерильные одноразовые вакутейнеры. Порядок проведения процедуры: данные пациента регистрируют в журнале, маркируют вакутейнеры и направления, пациента усаживают либо укладывают в удобное положение, чтобы был разогнут локтевой сустав. Под локоть подкладывают валик либо специальную подушку, резиновый жгут накладывается на среднюю часть плеча поверх тканевой салфетки, пациента просят несколько раз провести манипуляцию, сжав и разжав кулак, обрабатывают кожу ватным шариком, заранее смоченным спиртом, шарики выбрасывают и производят пункцию вены специальной иглой с переходником, к которому после попадания в вену присоединяется вакутейнер. После забора крови наполненный вакутейнер отсоединяется, извлекается игла после прижатия к месту прокола ватного шарика со спиртом. Пациента просят прижать ватный шарик и удерживать его на локтевом сгибе в течение 5 мин; промаркированные пробирки укладывают в специальный контейнер, чтобы осуществлять дальнейшую транспортировку в лабораторию, а

все используемые инструменты и расходные материалы дезинфицируются и утилизируются.

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости проводится натощак в положении пациента лежа на спине. Перед процедурой на кожу пациента в области передней брюшной стенки наносится ультразвуковой гель. Датчик 3,5 МГц помещается центрально в верхней части живота под мечевидным отростком, затем врач просит пациента глубоко вдохнуть и задержать дыхание на вдохе. Затем пациент дышит спокойно, врач передвигает датчик по передней брюшной стенке. По завершении процедуры пациент салфеткой убирает остатки ультразвукового геля с поверхности кожи.

Исходы исследования

Основной исход исследования

В результате обработки крови получены результаты развернутого анализа: общий уровень лейкоцитов, подсчет лейкоцитарной формулы, СОЭ. В результате обработки крови получены результаты биохимических показателей: общий билирубин и его фракции, общий холестерин, липопротеиды, аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), щелочная фосфатаза (ЩФ). Кроме того, в результате обработки крови получены результаты иммунологического исследования: качественное определение HbsAg, anti-HCV, суммарных антител к антигенам гельминтов (*O. felinus*, *T. canis*, *T. spiralis*, *E. granulosus*, *L. intestinalis*). В результате ультразвукового исследования получены данные о гепатомегалии, диффузных и протоковых изменениях печени, очаговых образованиях печени.

Дополнительных исходов исследования нет.

Осложнений для обследованных нет.

Анализ в подгруппах

В исследование включены больные распространенным вульгарным ПС ($n=175$) в возрасте от 18 до 66 лет и практически здоровые доноры крови ($n=30$), сопоставимые по полу и возрасту: 1-я группа — больные псориазом (ПС, $n=77$), 2-я группа — больные псориагическим артритом (ПсА, $n=98$), 3-я группа — контроль.

Методы регистрации исходов

Обследование больных ПС и ПсА проводилось по единому специально разработанному протоколу, который состоял из 15 пунктов с описанием данных опроса, анкетирования и объективного осмотра. Все разделы протокола внесены в базу данных в виде таблиц программы Microsoft Excel 2007. Все больные обследованы в прогрессирующую стадию кожного процесса до начала проведения симптоматической и патогенетической терапии. Степень тяжести ПС и распространенности кожного процесса оценивалась путем расчета индекса охвата и тяжести ПС (Psoriasis Area and Severity Index, PASI) с учетом уровня выраженности основных клинических проявлений (эритемы, инфильтрации, десквамации) и площади патологического процесса [1].

Оценку функционального состояния ГПС проводили с помощью анализа клинико-anamnestических данных и лабораторно-инструментальных методов обследования. Основные разделы протокола включали паспортную часть, антропометрические данные (индекс массы тела, ИМТ), жалобы со стороны пищеварительной системы (диспепсия, синдром правого подреберья), анамнестические данные о патологии органов пищеварения (наличие патологии желудочно-кишечного тракта и ГПС в анамнезе, связь обострений патологии ГПС с ПС), спектр и значение пуско-

вых факторов дебюта и обострений ПС и ПсА, описание кожного и суставного процесса, данные объективного исследования гепатобилиарной системы (пальпация живота, пальпация желчного пузыря, исследование симптомов Кера, Мюсси, или френкиус-симптом, Ортнера—Грекова).

Лабораторно-инструментальное обследование печени и билиарного тракта проводилось в городском гастроэнтерологическом центре на базе клиники Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера. Всем больным проводился развернутый анализ крови. HbsAg, суммарные anti-HCV и к антигенам гельминтов определялись методом твердофазного иммуноферментного анализа. Ультразвуковое исследование печени и билиарного тракта проводилось на аппарате Medison SonoAce-X6 (Medison, Ю. Корея).

Этическая экспертиза № 12 от 10.12.2007 г.

Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным письменным согласием пациента. Протокол обследования больных и здоровых людей (контрольная группа) соответствовал этическим стандартам и был разрешен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Методы статистического анализа данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием прикладных программ Statistica 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критериев Шапиро—Уилка. Для получения коэффициента парной корреляции использовали метод Спирмена. Результаты представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах в виде 25 и 75% перцентилей: Me (25%; 75%) либо $M \pm m$. Для всех видов статистического анализа различия считались статистически достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Участники исследования

В группе больных ПсА достоверно чаще встречались женщины (61,2%), а в группе больных ПС — мужчины (70,2%); $p_{1,2} = 0,00004$. Средний возраст больных ПС составил $31,0 \pm 1,41$ года, больных ПсА — $49,12 \pm 1,22$ года; $p_{1,2} = 0,04$.

Основные результаты исследования

Возраст дебюта заболевания у обследованных больных варьировал от 5 до 60 лет, составив в среднем $25,0 \pm 0,9$ года. Длительность заболевания у обследованных больных составила от 2 мес до 47 лет (в среднем $7,0 \pm 1,2$ года при ПС и $18,0 \pm 1,4$ года при ПсА); $p_{1,2} = 0,000003$. Значения индекса PASI колебались от 2,8 до 41,7 и составили в среднем $14,3 \pm 0,9$ при ПС и $18,2 \pm 1,3$ при ПсА; $p_{1,2} = 0,03$.

В результате проведенного анализа данных анамнеза выделены основные провоцирующие (триггерные) факторы обострения ПС и ПсА. Так, установлена связь обострения кожного процесса при ПС и ПсА с психоэмоциональным стрессом: 75,5 и 75,0%, соответственно; $p_{1,2} = 0,9$. Алиментарные факторы (переедание, употребление жирной, острой, жареной пищи, алкоголя) были причиной обострения ПС в 67,3% случаев, ПсА — в 60,4%; $p_{1,2} = 0,6$.

Анализ анамнеза жизни больных показал, что ПсА сочетается с повышением частоты встречаемости заболеваний органов пищеварения. Так, при ПсА достоверно чаще определяются признаки желудочно-печеночной диспепсии (жалобы на изжогу, тошноту, метеоризм) в сравнении с группой больных ПС — 43,7 и 24,4%, соответственно; $p_{1,2}=0,04$. Заболевания органов пищеварения (хронический гастродуоденит, хронический холецистит, хронический панкреатит) достоверно чаще отмечаются при ПсА в сравнении с ПС — 56,2 и 34,7%, соответственно; $p_{1,2}=0,03$.

Псориатический артрит в сравнении с псориазом характеризуется наличием поливалентных клинических признаков хронического холецистита (табл. 1).

Так, на основании анамнеза жизни установлено, что в группе больных ПсА в сравнении с группой больных ПС достоверно чаще отмечается синдром правого подреберья (жалобы на боли и тяжесть в области правого подреберья) и заболевания ГБС (хронический холецистит, дискинезия желчного пузыря, жировая дегенерация печени). Вовлечение в патологический процесс ГБС подтверждается наличием болезненности при пальпации в области правого подреберья, которая чаще отмечена при ПсА в сравнении с ПС. Кроме того, при ПсА достоверно чаще определяются объективные признаки хронического холецистита в сравнении с ПС. У больных ПС преобладают моновалентные признаки заболеваний желчного пузыря (1 пу-

зырный симптом) — 75,0%, а у больных ПсА — поливалентные (2 и более пузырных симптомов), выявленные в 57,9% случаев; $p_{1,2}=0,003$. Так, в структуре признаков заболеваний желчного пузыря, по данным объективного осмотра, при ПсА преобладают симптомы Кера (39,6%) и Ортнера–Грекова (35,4%), реже выявлены симптомы Мерфи (16,6%) и Мюсси (10,4%).

При анализе ИМТ определено повышение данного показателя в группе ПсА в сравнении с группой больных ПС. Причем избыточная масса тела ($ИМТ \geq 25$) при ПсА отмечалась в 64,2% случаев, а при ПС — в 41,5%; $p_{1,2}=0,001$.

При изучении биохимических показателей крови больных псориатической болезнью выявлены признаки цитолиза гепатоцитов и холестаза (табл. 2).

Цитолиз обусловлен изменением проницаемости мембран гепатоцитов и выделением внутриклеточного содержимого в межклеточный матрикс и кровь. Цитолиз является одним из основных показателей активности патологического процесса в печени и характеризуется повышением активности печеночных ферментов (АСТ и АЛТ), билирубина, витамина В₁₂ и железа [17]. Так, при ПС и ПсА выявлено статистически значимое повышение уровней общего билирубина и АСТ в сравнении с группой контроля. Уровень общего билирубина при ПсА достоверно выше в сравнении с ПС, что свидетельствует о высокой активности цитолиза гепатоцитов у больных

Таблица 1. Особенности клинико-anamnestических показателей при псориазе (ПС) и псориатическом артрите (ПсА)

Клинический показатель	ПС (1) (n=77)	ПсА (2) (n=98)	$p_{1,2}$
Жалобы на боли и тяжесть в области правого подреберья, %	14,3	35,4	0,016
Заболевания гепатобилиарной системы в анамнезе, %	4,0	22,0	0,016
Болезненность в области правого подреберья при пальпации, %	16,3	34,5	0,004
Другие признаки заболеваний желчного пузыря по данным объективного осмотра (пузырные симптомы), %	48,9	79,2	0,003
Индекс массы тела, кг/см ²	24,2±0,5	26,2±0,7	0,001

Примечание. Достоверность различий (p) — критерий Манна–Уитни.

Таблица 2. Особенности биохимических показателей крови при псориазе (ПС) и псориатическом артрите (ПсА), Ме [25%; 75%]

Биохимический показатель крови	ПС (1) (n=77)	ПсА (2) (n=98)	Контроль (3) (n=30)	p
Общий билирубин, мкмоль/л	14,5 [12,4; 17,0]	16,3 [12,3; 18,7]	12,3 [10,5; 13,6]	$p_{1,2}=0,05$ $p_{1,3}=0,000001$ $p_{2,3}=0,00001$
Аспаратаминотрансфераза, Ед/л	27,3 [19,0; 43,7]	26,0 [18,2; 45,4]	15,7 [12,9; 20,9]	$p_{1,2}=0,6$ $p_{1,3}=0,000001$ $p_{2,3}=0,000006$
Гамма-глутамилтрансфераза, Ед/л	20,1 [14,1; 25,3]	18,6 [13,9; 28,2]	12,9 [11,5; 16,5]	$p_{1,2}=0,7$ $p_{1,3}=0,00007$ $p_{2,3}=0,005$
Щелочная фосфатаза, Ед/л	57,4 [52,4; 71,5]	78,9 [61,9; 101,1]	49,3 [37,5; 57,4]	$p_{1,2}=0,09$ $p_{1,3}=0,01$ $p_{2,3}=0,0001$
Общий холестерин, ммоль/л	4,2 [3,8; 5,6]	5,0 [4,3; 6,1]	4,26 [3,9; 5,0]	$p_{1,2}=0,03$ $p_{1,3}=0,6$ $p_{2,3}=0,002$
Холестерин липопротеидов низкой плотности, ммоль/л	1,98 [1,55; 2,48]	2,6 [2,3; 3,3]	1,66 [1,48; 2,09]	$p_{1,2}=0,03$ $p_{1,3}=0,4$ $p_{2,3}=0,001$

Примечание. Достоверность различий (p) — критерий Манна–Уитни.

Таблица 3. Особенности показателей развернутого анализа крови при псориазе (ПС) и псориатическом артрите (ПсА), Ме [25%; 75%]

Показатель развернутого анализа крови	ПС (1) (n=77)	ПсА (2) (n=98)	Контроль (3) (n=30)	p
Лейкоциты, 10 ⁹ клеток /л	7,05 [5,8; 8,5]	7,7 [5,9; 9,8]	4,37 [3,5; 6,16]	$p_{1,2}=0,05$ $p_{1,3}=0,000001$ $p_{2,3}=0,000001$
Эозинофилы, %	3,0 [1,0; 5,0]	3,0 [1,0; 5,0]	0,0 [0,0; 0,0]	$p_{1,2}=0,9$ $p_{1,3}=0,000001$ $p_{2,3}=0,000001$
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 2,0]	$p_{1,2}=0,04$ $p_{1,3}=0,4$ $p_{2,3}=0,01$
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	7,0 [3,0; 14,0]	15,0 [7,0; 20,5]	6,0 [1,5; 13,0]	$p_{1,2}=0,0005$ $p_{1,3}=0,3$ $p_{2,3}=0,0002$

Примечание. Достоверность различий (p) — критерий Манна–Уитни.

с наличием суставного синдрома. О повреждении гепатоцитов также свидетельствуют данные ультразвукового исследования, согласно которым в обеих группах больных ПС выявлены паренхиматозные изменения печени, проявляющиеся диффузным изменением структуры печени с повышением или понижением эхоплотности органа ($p_{1,3}=0,01$; $p_{2,3}=0,004$). Гепатомегалия достоверно чаще встречается при ПсА в сравнении с ПС и группой контроля (26,8; 12,2; 6,7%, соответственно; $p_{1,2}=0,07$, $p_{2,3}=0,02$, $p_{1,3}=0,7$) и может служить предиктором формирования суставного синдрома.

Холестаз обусловлен повреждением мембран гепатоцитов и желчевыводящих путей и характеризуется гиперхолестеринемией, гипербилирубинемией, повышением активности ЩФ, ГГТ, фосфолипидов и желчных кислот в крови [18]. При исследовании биохимических маркеров холестаза отмечено, что в обеих группах больных уровни общего билирубина, ЩФ, ГГТ достоверно выше в сравнении с контрольной группой. Протоковые изменения печени ($p_{1,3}=0,00000001$; $p_{2,3}=0,000001$) и утолщение стенок желчного пузыря ($p_{1,3}=0,02$, $p_{2,3}=0,004$), по данным ультразвукового исследования, являются признаками наличия холестаза, выявляемого при ПС и ПсА. Причем при ПС достоверно чаще встречаются протоковые изменения и очаговые образования в печени в сравнении с ПсА: 87,8 против 68,7% и 7,3 против 0%, соответственно; $p_{1,2}=0,02$; 0,02. Высокая активность холестаза при ПсА подтверждается наличием дислипидемии, которая характеризуется повышением общего холестерина и изменением соотношения липопротеидов в пользу преобладания холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), а также увеличением уровня общего билирубина [19].

При сравнении биохимических показателей крови больных ПС и группы контроля достоверных изменений содержания прямого билирубина, АЛТ, холестерина ЛПВП не выявлено.

В результате проведенных исследований установлены статистически значимые различия показателей развернутого анализа крови при сравнении больных псориазом и псориатическим артритом (табл. 3).

В сравнении с группой контроля при ПС и ПсА выявлены изменения показателей периферической крови, связанные с воспалительным процессом, которые характеризуются повышением уровня лейкоцитов в периферической крови. Уровень лейкоцитов в периферической крови выше при ПсА в сравнении с ПС, причем отмечена

тенденция к сдвигу лейкоцитарной формулы влево с преобладанием палочкоядерных нейтрофилов. Кроме того, уровень СОЭ при ПсА достоверно выше, чем при ПС.

В обеих группах больных ПС в сравнении с группой контроля отмечено статистически значимое повышение содержания уровня эозинофилов в периферической крови, которое может быть признаком паразитарной инвазии как этиологического фактора заболеваний ГБС. Так, лямблиоз чаще выявлялся при ПсА и ПС в сравнении с группой контроля — 24,0; 17,8; 0%, соответственно. При анализе частоты встречаемости суммарных антител к антигенам *O. felinus*, *T. canis*, *T. spiralis*, *E. granulosus* не выявлено статистически значимых различий между группами больных и группой контроля. При ПС и ПсА достоверно чаще отмечалось носительство вируса гепатита С в сравнении с группой контроля — 25,0; 5,5; 0%, соответственно. При анализе частоты встречаемости HbsAg не выявлено статистически значимых различий между группами больных псориатической болезнью и группой контроля.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Функциональные изменения гепатобилиарной системы подтверждают полисистемность псориатической болезни и коррелируют с тяжестью клинического течения псориаза [13, 20].

Обсуждение основного результата исследования

Изучение причинно-следственной связи поражения гепатобилиарной системы с псориазом — актуальная задача, поскольку печень является одним из основных органов-мишеней, вовлекаемых в системный псориатический процесс [8, 21]. Вовлечение в патологический процесс гепатобилиарной системы негативно влияет на течение псориаза и коррелирует с тяжестью клинического течения заболевания [14, 21]. Для псориаза и псориатического артрита, согласно данным анамнеза, доказана значимая триггерная роль алиментарного и психосоциального фактора [22]. В обеих группах больных псориазом выявлено наличие цитолиза гепатоцитов, холестаза и изменений периферической крови, связанных с воспалительным процессом. Эозинофилия, выявленная у отдельных больных псориатической болезнью, вероятно,

является отражением паразитарной инвазии, влияющей на биохимическую структуру и литогенные свойства желчи с формированием хронического холецистита [23]. Выявленное носительство вируса гепатита С у больных ПС подтверждает установленные ранее факты тесной причинно-следственной взаимосвязи кожного синдрома и паренхиматозной патологии печени [12].

В результате проведенных нами исследований выявлены клинико-функциональные предикторы прогрессирования псориазического артрита. Установлено, что псориазический артрит в сравнении с псориазом характеризуется высокой частотой встречаемости признаков заболевания органов пищеварения, желудочно-печеночной диспепсии, а также анамнестических данных о заболевании желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарной системы, поджелудочной железы. У больных с суставным синдромом отмечена высокая активность цитолиза гепатоцитов, холестаза, что позволяет рассматривать псориазический артрит как тяжелую клиническую стадию псориаза, где гепатобилиарная система, в свою очередь, является одним из центральных органов-мишеней в системном псориазическом процессе [8, 15]. Гепатомегалия при псориазическом артрите может являться следствием жировой дегенерации печени в результате нарушения липидного обмена либо отражать системность аутоиммунного воспалительного процесса в гепатоцитах [13]. Кроме того, псориазический артрит характеризуется преобладанием метаболических изменений, связанных с нарушением жирового обмена и изменениями функционального состояния ГС, наличием признаков местной и системной воспалительной реакции [21]. Данные изменения отражают проявления неалкогольной жировой болезни печени, которая формируется в результате жировой инфильтрации и очагового воспаления гепатоцитов при отсутствии чрезмерного употребления алкоголя. Следовательно, неалкогольная жировая болезнь печени является фактором риска развития псориазического артрита у больных псориазом [24, 25]. Таким образом, причинно-следственная взаимосвязь заболеваний гепатобилиарной системы с клиническим течением псориаза и псориазического артрита подтверждается наличием изменений основных клинико-лабораторных и инструментальных показателей и характеризуется разнообразными проявлениями, включая дисфункциональные расстройства, симптомы некалькулезного хронического холецистита,

неалкогольной жировой болезни печени [21]. Установлена ассоциация тяжести псориазического процесса с заболеваниями гепатобилиарной системы.

Заключение

В результате проведенного нами исследования установлена тесная причинно-следственная взаимосвязь псориазической болезни и заболеваний гепатобилиарной системы. Показано, что заболевания гепатобилиарной системы предшествуют развитию кожного синдрома при ПС и формированию системных проявлений при ПсА. Выявленные в ходе исследования признаки протоковых и паренхиматозных изменений ГС у больных ПС и ПсА свидетельствуют в пользу выдвинутой нами гипотезы. Так, при псориазической болезни независимо от ее тяжести отмечаются признаки цитолиза гепатоцитов, холестаза, хронического холецистита. По мере прогрессирования псориазической болезни изменяются нозологическая структура и тяжесть заболеваний печени и желчевыводящих путей. Так, псориазический артрит сопровождается увеличением частоты встречаемости заболеваний гепатобилиарной системы, высоким уровнем цитолиза гепатоцитов и холестаза, наличием метаболических изменений, неалкогольной жировой болезни печени и поливалентных клинических признаков хронического холецистита. Таким образом, в качестве клинико-анамнестических предикторов прогрессирования псориазической болезни можно представить неалкогольную жировую болезнь печени и хронический холецистит.

107

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кубанова А.А. Дерматовенерология: клинические рекомендации. — М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006. 320 с. [Kubanova AA. *Dermatovenerologiya: klinicheskie rekomendatsii*. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. 320 p. (In Russ).]
2. Скрипкин Ю.К. Клиническая дерматовенерология. — М.: Триада-фарм; 2005. 687 с. [Scripkin YuK. *Klinicheskaya dermatovenerologiya*. Moscow: Triada-farm; 2005. 687 p. (In Russ).]
3. Chandran V, Raychaudhuri SP. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Autoimmun*. 2010;34:314–321. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.001.
4. Palijan TZ, Kovacević D, Koić E, et al. The impact of psoriasis on the quality of life and psychological characteristics of persons suffering from psoriasis. *Coll Antropol*. 2011;35(2):81–85.
5. Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В. Клинико-анамнестические предикторы псориазического артрита / Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом». Новосибирск; 2015. С. 80–83. [Barilo AA, Smirnova SV, Smolnikova MV. Kliniko-anamnesticheskie prediktory psoriaticeskogo artrita / Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Aktual'nye problemy meditsiny v Rossii i za rubezhom». Novosibirsk; 2015. p. 80–83. (In Russ).]
6. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Барило А.А. Особенности иммунопатогенеза псориаза и псориазического артрита // *Фундаментальные исследования*. — 2015. — №1–7. — С. 1443–1447. [Smolnikova MV, Smirnova SV, Barilo AA. Features of immunopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2015;1–7:1443–1447. (In Russ).]
7. Мельниченко А.Б., Кочергин Н.Г., Белоусова Т.А. Псориазический артрит: клиническая картина, диагностика и терапия // *Клиническая дерматология и венерология*. — 2010. — №5. — С. 17–24. [Mel'nichenko AB, Kochergin NG, Belousova TA. Psoriatic arthritis: clinical features, diagnostics, and treatment. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2010;5:17–24. (In Russ).]

8. Довжанский С.И., Утц С.Р. Псориаз или псориагическая болезнь. – Саратов; 1992. 272 с. [Dovzhanskii SI, Utts SR. *Psoriasis ili psoriaticheskaya bolezni*. Saratov; 1992. 272 p. (In Russ).]
9. Зеленцова С.Е. Комплексная фармакотерапия тяжелых форм псориаза с учетом биохимических и иммунологических показателей. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М.; 2007. 24 с. [Zelentsova SE. *Kompleksnaya farmakoterapiya tyazhelykh form psoriaza s uchetom biokhimicheskikh i immunologicheskikh pokazatelei*. [dissertation] Moscow; 2007. 24 p. (In Russ).]
10. Матушевская Ю.И. Оценка эффективности терапии больных тяжелыми формами псориаза с применением генно-инженерного биологического препарата инфликсимаб на основании клинических и иммунологических показателей. Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – М.; 2008. 21 с. [Matushevskaya YuI. *Otsenka effektivnosti terapii bol'nykh tyazhelymi formami psoriaza s primeneniem genno-inzhenernogo biologicheskogo preparata infliksimab na osnovanii klinicheskikh i immunologicheskikh pokazatelei*. [dissertation] Moscow; 2008. 21 p. (In Russ).]
11. Бурханова Н.Р. Оптимизация терапии больных псориазом на основании оценки клинических, биохимических и иммунологических показателей. Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Екатеринбург; 2014. 25 с. [Burkhanova NR. *Optimizatsiya terapii bol'nykh psoriazom na osnovanii otsenki klinicheskikh, biokhimicheskikh i immunologicheskikh pokazatelei*. [dissertation] Ekaterinburg; 2014. 25 p. (In Russ).]
12. Смирнова С.В. К механизму формирования внеорганных проявлений патологии печени // *Сибирский медицинский журнал*. – 2004. – №2. – С. 4–12. [Smirnova SV. About the mechanisms of the formation of extraorgan signs of liver pathology. *Sibirskii meditsinskii zhurnal*. 2004;2:4–12. (In Russ).]
13. Бакулев А.Л., Шагова Ю.В., Козлова И.В. Псориаз как системная патология // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2008. – №1. – С. 13–19. [Bakulev AL, Shagova YuV, Kozlova IV. Psoriasis as system pathology. *Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal*. 2008;1:13–19. (In Russ).]
14. Бакулев А.Л., Кравченя С.С. Применение гепатопротекторов при псориазе: сравнительная клинико-лабораторная и ультразвуковая оценка эффективности // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2010. – №1. – С. 112–117. [Bakulev AL, Kravchenya SS. Administering hepatoprotectors for psoriasis: a comparative clinical, laboratory and ultrasonic assessment of its efficacy. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2010;1:112–117. (In Russ).]
15. Морозов С.В., Труфанова Ю.М., Исаков В.А. Клиническое использование эластографии печени для диагностики выраженности фиброза у пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени // *Вестник Российского государственного медицинского университета имени Н.И. Пирогова*. – 2010. – Т.2. – С. 6–11. [Morozov SV, Trufanova YuM, Isakov VA. Transient elastography for the evaluation of liver fibrosis stage: clinical use in patients with chronic liver diseases. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta imeni N.I. Pirogova*. 2010;2:6–11. (In Russ).]
16. Бокова Т.А., Урсова Н.И., Тишенина Р.С., Лебедева А.В. Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению патологии гепатобилиарной системы у больных с метаболическим синдромом. Учебное пособие / Под общ. ред. Римарчук Г.В. – М.; 2011. 28 с. [Bokova TA, Ursova NI, Tishenina RS, Lebedeva AV. *Sovremennye podkhody k profilaktike, diagnostike i lecheniyu patologii gepatobiliarnoi sistemy u bol'nykh s metabolicheskim sindromom*. *Uchebnoe posobie*. Ed by G.V. Rimarchuk. Moscow; 2011. 28 p. (In Russ).]
17. Вялов С.С. Синдром цитоллиза в гастроэнтерологии: тактика ведения пациентов в общей практике // *Consilium Medicum*. Гастроэнтерология. – 2013. – №1. – С. 42–48. [Vyalov SS. Sindrom tsiitoliza v gastroenterologii: taktika vedeniya patsientov v obshchei praktike. *Consilium Medicum*. Gastroenterologiya. 2013;1:42–48. (In Russ).]
18. Вялов С.С. Синдром холестаза: тактика диагностики и ведения пациентов // *Эффективная фармакотерапия в гастроэнтерологии*. – 2012. – №6. – С. 10–15. [Vyalov SS. Sindrom kholestaza: taktika diagnostiki i vedeniya patsientov. *Effektivnaya farmakoterapiya v gastroenterologii*. 2012;6:10–15. (In Russ).]
19. Wu S, Li WQ, Han J, et al. Hypercholesterolemia and risk of incident psoriasis and psoriatic arthritis in US women. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(2):304–310. doi:10.1002/art.38227.
20. Потеев Н.Н., Серов Д.Н. Патогенетически обусловленная терапия псориаза и псориагического артрита // *Клиническая дерматология и венерология*. – 2012. – №4. – С. 4–9. [Potekaev NN, Serov DN. Pathogenetic therapy for psoriasis and psoriatic arthritis. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2012;4:4–9. (In Russ).]
21. Розумбаева Л.П., Козлова И.В., Быкова А.П., Сафонова М.В., Пахомова А.Л. Патология гепатобилиарной системы и псориаз: взаимосвязи и взаимовлияния // *Современные проблемы науки и образования*. – 2014. – №4. – С. 1–7. [Rozumbaeva LP, Kozlova IV, Bykova AP, Safonova MV, Pakhomova AL. Psoriasis and pathology of the hepatobiliary system: the relationship and mutual influence. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014;4:1–7. (In Russ).]
22. Топычканова Е.П., Филонкова Н.Н., Бочкарев Ю.М., Киселева Н.В. Липидный спектр сыворотки крови у больных псориазом с избыточной массой тела // *Клиническая дерматология и венерология*. – 2013. – №1. – С. 57–60. [Topychkanova EP, Filimonkova NN, Bochkarev YM, Kiseleva NV. Serum lipid spectrum in overweight patients with psoriasis. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2013;1:57–60. (In Russ).]
23. Хардикова С.А., Куранова Н.Ю. Особенности течения псориаза при хроническом описторхозе // *Клиническая дерматология и венерология*. – 2010. – №2. – С. 9–14. [Khardikova SA, Kuranova NYu. Psoriasis and biliary excretory system: clinical features in patients with chronic opisthorchosis. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2010;2: 9–14. (In Russ).]
24. Madanagobalane S, Anandan S. The increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in psoriatic patients: a study from South India. *Australas J Dermatol*. 2012;53(3):190–197. doi:10.1111/j.1440-0960.2012.00905.x.
25. Voort EA, Koehler EM, Dowlatshahi EA, et al. Psoriasis is independently associated with nonalcoholic fatty liver disease in patients 55 years old or older: Results from a population based study. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(3):517–524. doi:10.1016/j.jaad.2013.10.044.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Смирнова Светлана Витальевна, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе, руководитель отдела клинической иммунологии и клеточных технологий Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3г, тел.: +7 (391) 228-06-81, +7 (391) 228-06-83, e-mail: svetvita@mail.ru

Барило Анна Александровна, аспирант Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера Адрес: 660077, Красноярск, ул. Батурина, д. 34-26, тел.: +7 (391) 228-06-81, +7 (391) 228-06-83, e-mail: annntomsk@yandex.ru

Смольникова Марина Викторовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3г, тел.: +7 (391) 228-06-81, +7 (391) 228-06-83, e-mail: smarinv@yandex.ru

DOI: 10.15690/vramn653

А.В. Рунина¹, А.С. Старовойтова², Д.Г. Дерябин¹, А.А. Кубанов¹¹ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, Москва, Российская Федерация² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Рекомбинантный белок Tr0965 *Treponema pallidum* как перспективный антиген для совершенствования серологической диагностики сифилиса

Обоснование. Специфические (трепонемные) серологические тесты, основанные на поиске антител к иммуореактивным белковым антигенам *Treponema pallidum*, являются ключевым методом современной лабораторной диагностики сифилиса. В связи с невозможностью культивирования данного микроорганизма *in vitro* широкое распространение получило клонирование целевых генов *T. pallidum* с последующим выделением и использованием рекомбинантных белков для проведения диагностических исследований. Актуальным является расширение спектра подобных антигенов как инструментов совершенствования диагностики сифилиса и дифференциальной диагностики различных форм этого заболевания. **Цель исследования.** Оценка аналитических возможностей (чувствительности и специфичности) рекомбинантного белка Tr0965 *T. pallidum* как нового антигена для серологической диагностики сифилиса. **Методы.** Ген tr0965 *T. pallidum* клонирован в вектор pET28a; трансформированный полученной экспрессионной системой штамм *Escherichia coli* BL-21(DE3) использован для выделения и очистки целевого белка. Прямое сравнительное нерандомизированное исследование аналитических возможностей рекомбинантного белка Tr0965 проведено методом твердофазного иммуоферментного анализа с использованием сывороток крови пациентов с различными формами сифилиса ($n=84$) в сравнении с группой здоровых доноров ($n=25$). **Результаты.** Иммуоферментный анализ в отношении рекомбинантного белка Tr0965 показал высокое число положительных результатов с сыворотками крови больных сифилисом в сравнении с группой здоровых доноров. Чувствительность серологического исследования составила 97,5%, специфичность — 87,5%. Наиболее высокие значения чувствительности (100%) зафиксированы в группах пациентов с первичным, вторичным и ранним скрытым сифилисом с некоторым снижением (до 89,5%) в группе пациентов с поздним скрытым сифилисом. **Заключение.** Результаты исследования характеризуют рекомбинантный белок Tr0965 *T. pallidum* как новый перспективный антиген для совершенствования трепонемных тестов серологической диагностики сифилиса, в том числе предназначенный для выявления ранних форм этого заболевания.

Ключевые слова: сифилис, серологическая диагностика, *Treponema pallidum*, рекомбинантные белки, Tr0965.

(Для цитирования: Рунина А.В., Старовойтова А.С., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А. Рекомбинантный белок Tr0965 *Treponema pallidum* как перспективный антиген для совершенствования серологической диагностики сифилиса. *Вестник РАМН*. 2016;71(2):109–113. doi: 10.15690/vramn653)

Обоснование

Серологические методы сохраняют ведущее значение в лабораторной диагностике сифилитической инфекции [1]. Ежегодно в Российской Федерации проводится более 28 миллионов серологических исследований, по результатам которых в 2015 году выявлено 34426 новых случаев данного заболевания. При этом, наряду с использованием традиционных нетрепонемных тестов диагностики сифилиса, все более широкое распространение находят методы, основанные на обнаружении антител к созданным с использованием генной инженерии рекомбинантным белкам или синтетическим пептидам *T. pallidum* [2, 3]. В частности, широкое применение в составе диагностических тест-систем получили рекомбинантные белки Tr15, Tr17, Tr47 и TmpA, совместное использование которых обеспечивает 98,3–99,6% специфичность проводимых диагностических исследований [4]. Однако, достигаемые при этом значения чувствительности существенно варьируют на разных стадиях заболевания, оказываясь сниженными в случае первичного и позднего скрытого сифилиса [5]. Сохраняются сложности диагностики данного заболевания в семейных парах и у беременных, определяемые возможным расхождением результатов различных лабораторных тестов. Указанные

обстоятельства определяют актуальность продолжения поиска новых белков *T. pallidum*, использование которых в качестве антигенов в серологических реакциях обеспечит высокий уровень чувствительности и специфичности лабораторного исследования на всех стадиях сифилитической инфекции.

Одним из кандидатов на эту роль является белок Tr0965 *T. pallidum* с последовательностью 320 аминокислотных остатков и молекулярной массой 35,4 кДа [6], имеющий один альфа-спиральный трансмембранный участок и локализованный на внутренней цитоплазматической мембране бледной трепонемы [7, 8]. Существующие источники описывают Tr0965 как белок с транспортной функцией, одновременно участвующий в развитии и прогрессировании сифилитической инфекции через активацию клеток эндотелия и регуляцию проницаемости эндотелиального барьера [9]. Ранее полученные результаты биоинформационного анализа [10] указывают на высокую специфичность Tr0965 для рода *Treponema*, что позволяет предполагать возможность его использования в качестве дополнительного антигена для серологической диагностики сифилиса.

Цель исследования: оценка аналитических возможностей (чувствительности и специфичности) рекомбинантного белка Tr0965 *T. pallidum* как нового антигена для серологической диагностики сифилиса.

Методы

Дизайн исследования

План исследования заключался в прямом сравнительном нерандомизированном исследовании реактивности предварительно верифицированных сывороток от больных различными формами сифилиса, находящихся на обследовании и лечении в ФГБУ «ГНЦДК» Миздрава России в 2014-2015 гг., и здоровых доноров, тестированных в отношении рекомбинантного белка Trp0965 *T. pallidum* с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа. Гипотеза о возможности использования рекомбинантного белка Trp0965 *T. pallidum* для серодиагностики сифилиса проверялась на основе расчета показателей чувствительности и специфичности результатов ИФА.

Критерии соответствия

Критериями включения в анализируемую выборку являлись принадлежность сыворотки пациенту с клинически установленным диагнозом сифилиса, подтвержденным комплексом лабораторных исследований (реакция пассивной гемагглютинации, реакция быстрых реагинов, реакция иммобилизации бледных трепонем). Для исследования использовались 84 сыворотки крови больных первичным, вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом (по 21 образцу в каждой группе). В качестве контроля использовались сыворотки крови, полученные от 25 здоровых лиц, не имевших в анамнезе указаний на заболевание сифилисом и показавших отрицательные результаты в комплексе лабораторных исследований.

Описание исследования

Этапами исследования являлись: 1) клонирование гена *tp0965 T. pallidum*; 2) выделение и очистка рекомбинантного белка Trp0965; 3) оценка диагностической эффективности рекомбинантного белка Trp0965 при серологической диагностике сифилиса методом твердофазного иммуноферментного анализа; 4) статистический анализ полученных данных с определением чувствительности и специфичности диагностического исследования.

Клонирование гена *tp0965 T. pallidum*

В качестве материала для амплификации последовательности гена *tp0965* (GenBank NC_000919.1: 1134809..1135342), выделенную из яичек лабораторных кроликов, зараженных *T. pallidum* штамм *Nichols*.

Амплификация кодирующей последовательности гена *tp0965* проведена с применением смеси полимераз Thersus (Евроген, Россия) и специфических праймеров (Trp0965_F 5'-TTTCATATGCTGCGTCGGGTTCCGC CG-3' и Trp0965_R 5'-TTTGGATCCCTATTTCCCTCGCTG CACTTTGGTC-3'), содержащих на 5'-концах сайты распознавания эндонуклеаз NdeI и BamHI. Режим амплификации: 95°C — 5 мин, 45 циклов (95°C — 30 с, 59°C — 30 с, 72°C — 5 мин); 72°C — 7 мин. Амплифицированные фрагменты гена *tp0965* и вектор pET28a (Novagen, США) рестрицировали, очищали от компонентов реакционной смеси и лигировали. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма TOP10, которые высевали на агаризованную среду 2×TY с 50 мкг/мл канамицина. Наличие гена *tp0965* в выросших колониях подтверждали амплификацией с использованием описанной выше пары праймеров и

A.V. Runina¹, A.S. Starovoitova², D.G. Deryabin¹, A.A. Kubanov¹

¹ State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology,
Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Evaluation of the Recombinant Protein Trp0965 of *Treponema Pallidum* as Perspective Antigen for the Improved Serological Diagnosis of Syphilis

Background. *Treponemal tests based on the detection of antibodies against the Treponema pallidum antigens are the most specific methods for serological diagnosis of syphilis. Due to the inability to cultivate this bacterium in vitro, the most promising sources of antigens for diagnostics are recombinant proteins of T. pallidum. Evaluation of the analytical value of certain T. pallidum proteins is the approach to improve sensitivity, specificity, and reproducibility of syphilis serological tests, including possibilities of differential diagnosis of various forms of the disease. Objective.* The aim of the research was to evaluate the analytical values (sensitivity and specificity) of recombinant protein Trp0965 of *T. pallidum* as a candidate antigen for serological diagnosis of syphilis. **Methods.** *tp0965 gene was cloned into the expression vector pET28a and the construct was used for the transformation of E. coli BL-21 (DE3) cells and further expression and purification of the recombinant protein. The collected protein was used as T.pallidum antigen for serum analysis (ELISA) of groups of patients with various forms of syphilis (n=84) and the group of healthy donors (n=25). Results.* High frequency of positive ELISA results was shown with serum of patients with syphilis, compared to the group of healthy donors. The sensitivity of serological reactions using recombinant protein Trp0965 was 98.8%, specificity — 87.5%. The highest sensitivity (100%) was detected in the groups of patients with primary, secondary and early latent syphilis while in the group of patients with late latent syphilis it decreased to 95.2%. **Conclusions.** We concluded that due to its specificity *T. pallidum* recombinant protein Trp0965 can be used as a novel perspective antigen for development of syphilis serological diagnostic assays (for primary and early latent forms).

Key words: syphilis, serological diagnosis, *Treponema pallidum*, recombinant protein, Trp0965.

(For citation: Runina AV, Starovoitova AS, Deryabin DG, Kubanov AA. Evaluation of the Recombinant Protein Trp0965 of *Treponema Pallidum* as Candidate Antigen for Serological Diagnosis of Syphilis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(2):109–113. doi: 10.15690/vramn653)

праймерами к регионам T7 промотера/терминатора в векторе pET28a. Положительную колонию *E. coli* TOP10 pET28a-tp0965 использовали в качестве источника плазмидной ДНК, которой с целью получения продуцента целевого белка трансформировали клетки штамма *E. coli* BL-21(DE3) (Novagen, США).

Выделение и очистка рекомбинантного белка Tr0965

Ночную культуру *E. coli* BL-21 (DE3) pET28a-tp0965 засеивали в жидкую среду 2×TY с 50 мкг/мл канамицина и культивировали в течение 3 ч при 37°C и непрерывном перемешивании до оптической плотности (ОП) ≈0,8–0,9 при длине волны 600 нм. Индукцию экспрессии рекомбинантного белка вызывали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозиды с последующим дополнительным культивированием. Присутствие белка Tr0965 определяли методом денатурирующего гель-электрофореза в полиакриламидном геле с окраской Кумасси G250.

Полученную биомассу осаждали при 3000 g в режиме охлаждения (4°C) и лизировали добавлением лизоцима и смеси ингибиторов протеиназ (Sigma Aldrich, США) согласно рекомендациям производителя. Очистку рекомбинантного белка Tr0965 проводили с использованием металл-хелатной хроматографии на сорбенте Sepharose Ni-NTA (GE Healthcare, Великобритания). Выход целевого белка подтверждали денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле с окраской Кумасси G250. Содержащие целевой белок фракции объединяли, диализировали против 50 мМ фосфатного буфера (pH 7,4) и концентрировали на фильтрационных колонках Amicon Ultra-4 Ultracel (Millipore, США).

Оценка диагностической эффективности рекомбинантного белка Tr0965 для серологической диагностики сифилиса методом твердофазного иммуноферментного анализа

Очищенный рекомбинантный белок Tr0965 в концентрации 2 нг/мл наносили на 96-луночные планшеты высокой сорбции (Greiner BioOne, Германия), несвязанный белок отмывали, планшеты блокировали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина. Сыворотки больных с различными формами сифилиса и здоровых доноров разводили 1:100 в 50 мМ фосфатном буфере с 0,1% бычьим сывороточным альбумином и 0,05% Tween-20 и вносили в лунки планшета в объеме 100 мкл. Для определения значения фонового поглощения использовали лунки, заполненные тем же объемом буфера без содержания сыворотки. После 1 ч инкубации при 37°C планшет промывали и проводили реакцию с антителами к Fc-фрагменту иммуноглобулина человека, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США). После удаления несвязанных конъюгатов в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора о-фенилендиамина (Thermo Scientific, США) в цитратном буфере с 0,03% перекиси водорода и инкубировали в темноте в течение 15–30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,1 М соляной кислоты, после чего регистрировали оптическую плотность при длине волны 492 нм (ОП(492)).

Статистический анализ полученных данных

Оценку результатов иммуноферментного анализа (ИФА) проводили с использованием программного обеспечения *AtteStat* по критерию Манна–Уитни для непарных выборок с поправкой на множественное сравнение. В качестве порогового значения статистически значимых отличий принимали $p < 0,05$. Расчет показателей чувствительности и специфичности диагностической ре-

акции проводили по формулам: чувствительность = ИП/(ИП+ЛО)*100%; специфичность = ИО/(ИО+ЛП)*100%, где ИП – истинно положительные результаты, ЛО – ложноотрицательные результаты, ИО – истинно отрицательные результаты, ЛП – ложноположительные результаты.

Результаты

Фрагмент ДНК *T. pallidum* штамма *Nichols* длиной 945 пар оснований, содержащий ген *tp0965*, был клонирован в экспрессионный вектор pET28a, после чего наличие соответствующей кодирующей последовательности в экспрессионной системе было подтверждено ПЦР и секвенированием по Сенгеру. Экспрессия рекомбинантного белка Tr0965 штаммом-продуцентом *E. coli* BL-21 (DE3) pET28a-tp0965 была подтверждена результатами денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле, свидетельствующими о появлении четко выраженной полосы (рис. 1, А), при сравнении с маркерами молекулярных весов несколько превышающей молекулярную массу нативного белка (35,4 кДа) за счет присоединения фрагмента из 6 аминокислотных остатков гистидина. Проведенная на следующем этапе очистка целевого белка с использованием металл-хелатной хроматографии на никель-сефарозном сорбенте позволила получить высокоочищенные (по результатам денатурирующего гель-электрофореза) фракции рекомбинантного белка Tr0965 (рис. 1, Б; фракции 6, 7).

После диализа очищенный рекомбинантный белок Tr0965 использовали в качестве антигена для твердофазного ИФА при исследовании сывороток больных с различными формами сифилиса (n=84) и здоровых доноров (n=25).

Для интерпретации результатов ИФА экспериментально был определен пороговый уровень оптического поглощения при 492 нм (ОП(порог)), рассчитанный на основе среднего значения ОП(492) для образцов сывороток крови здоровых доноров с поправкой +3σ (где σ – квадратичное отклонение для данной выборки). При этом в проведенной серии экспериментов с использованием рекомбинантного белка Tr0965 в качестве антигена для серологической диагностики сифилиса методом ИФА значение ОП(порог) было установлено на уровне 0,075 оптических единиц (о.е.; $0,0683 + 3 \times 0,0024$). В дальнейшем «положительными» считались значения ОП(492), превышающие указанный пороговый уровень более чем на 10%; «отрицательными» — значения, составляющие менее 90% порогового значения оптической плотности, а случаи со значениями ±10% расценивались как «сомнительные».

Результаты ИФА (значения ОП(492)) сыворотки крови пациентов с различными формами сифилиса в отношении рекомбинантного белка Tr0965 *T. pallidum* приведены на рис. 2. В группе пациентов с первичным сифилисом (n=21) значения ОП(492) распределялись в диапазоне 0,107–0,471 о.е., в среднем в 3,65 раза ($p < 0,001$) превышая значения оптического поглощения в контрольной группе. Интерпретация полученных результатов ИФА в соответствии с обозначенными выше критериями позволила оценить все исследуемые сыворотки больных первичным сифилисом как положительные.

Существенное превышение среднего значения ОП(492) (в 3,72 раза относительно контрольной группы; $p < 0,001$) также зафиксировано у пациентов со вторичным сифилисом (n=21), что сопровождалось менее выраженной вариабельностью величин ОП(492) при тестировании отдельных сывороток — от 0,116 до 0,370 о.е.

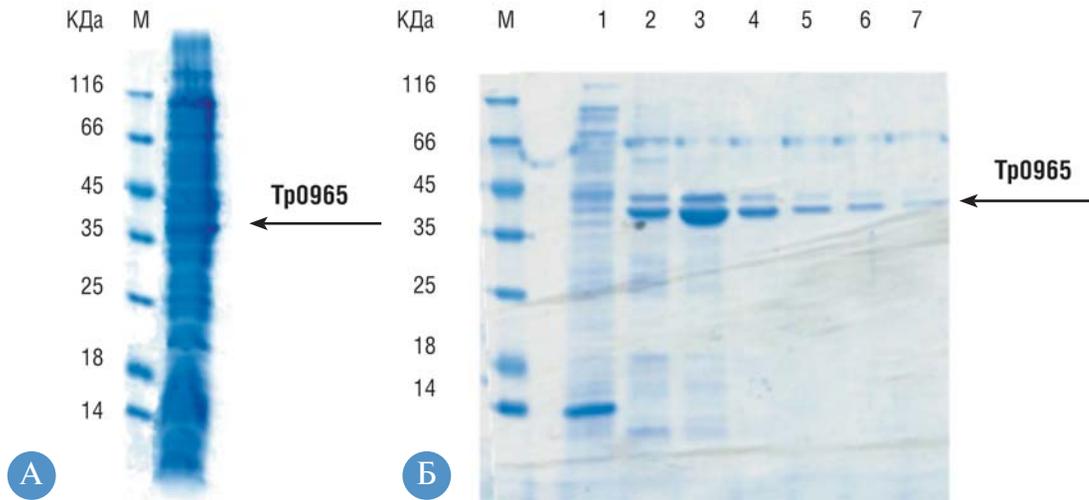


Рис. 1. Результаты денатурирующего гель-электрофореза в полиакриламидном геле: А — оценка экспрессии рекомбинантного белка Trp0965 в клетках *E. coli* BL-21(DE3); Б — выход рекомбинантного Trp0965 после хроматографической очистки (1 — фракции, не связанные с хроматографической колонкой; 2–7 — фракции, элюированные с колонки градиентом имидазола 50–500 мМ)

Примечание. М — маркеры молекулярных масс (кДа). Стрелками указано положение целевого белка.

112

Исследование сывороток крови, полученных от пациентов с ранним скрытым сифилисом (n=21), демонстрировало некоторое снижение значений ОП(492) (0,097–0,451 о.е.; в среднем в 3,13 раза выше значений в контрольной группе), однако сохраняло высокую степень статистической значимости ($p < 0,001$) и оценку каждой из анализируемых сывороток как положительной.

Наконец, в группе пациентов с поздним скрытым сифилисом (n=21) среднее значение ОП(492) превышало контрольные значения только в 2,35 раза (0,061–0,315 о.е.), что статистически значимо отличалось от результатов, полученных в группах больных первичным и вторичным сифилисом ($p = 0,04$ и $p = 0,003$, соответственно). При этом 1 из 21 исследованного образца сыворотки в группе пациентов с поздним скрытым сифилисом при сравнении с ОП(порог) был оценен как отрицательный (в контексте проводимого исследования — ложноотрицательный) с оценкой остальных как истинно положительных.

Полученные результаты стали основой для расчета чувствительности и специфичности диагностического

исследования с использованием рекомбинантного белка Trp0965 *T. pallidum* в качестве антигена для серологической диагностики сифилиса. При этом общая чувствительность метода, рассчитанная как процент истинно положительных результатов ИФА при исследовании сывороток больных сифилисом, составила 97,5%, будучи максимальной (100%) в группах пациентов с первичным, вторичным и ранним скрытым сифилисом, и несколько снижаясь (89,5%) в группе позднего скрытого сифилиса. В свою очередь, расчет процента истинно отрицательных результатов ИФА в группе образцов сывороток здоровых доноров определил специфичность проведенного диагностического исследования на уровне 87,5%.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования подтверждают возможность использования белка Trp0965 для серологической диагностики сифилиса, в том числе определяемую

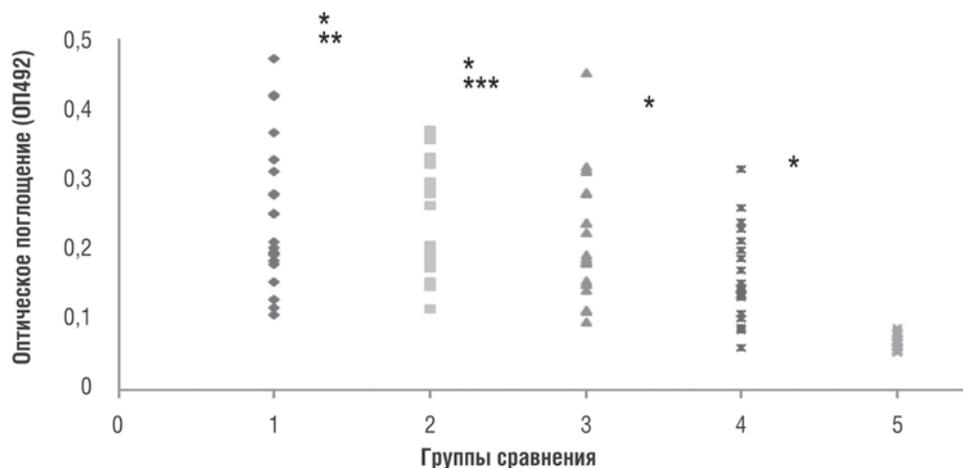


Рис. 2. Распределение значений оптического поглощения при длине волны 492 нм по результатам ИФА с рекомбинантным белком Trp0965 в качестве антигена в группах больных первичным (1), вторичным (2), ранним (3) и поздним (4) скрытым сифилисом, а также в группе здоровых доноров (5).

Примечание. * — $p < 0,001$ при сравнении с группой здоровых доноров; ** — $p < 0,01$ при сравнении групп больных первичным и поздним скрытым сифилисом; *** — $p < 0,05$ при сравнении групп больных вторичным и поздним скрытым сифилисом.

его относительно высокой иммуногенностью, ранее экспериментально продемонстрированной при подкожном введении лабораторным животным [6]. Об этом же свидетельствуют предварительные данные о выраженной серореактивности нативного белка Tr0965 *T. pallidum* [11], взаимодействующего с антителами в сыворотках больных первичным, вторичным, ранним скрытым и поздним скрытым сифилисом в отсутствии соответствующих антител в сыворотках крови здоровых доноров. В настоящем исследовании использование рекомбинантного белка Tr0965 в качестве антигена для твердофазного иммуноферментного анализа обеспечило 100% чувствительность серологической диагностики первичного, вторичного и раннего скрытого сифилиса с некоторым снижением этого показателя в группе пациентов с поздним скрытым сифилисом. На этом фоне определенным ограничением использования рекомбинантного белка Tr0965 оказалась его неабсолютная специфичность, в использованном экспериментальном контексте связанная с относительно высокими значениями ОП(492) при тестировании сывороток здоровых доноров и в дальнейшем подлежащая уточнению на более обширной выборке с установлением скорректированного «порога отсечения». Тем не менее, полученные результаты хорошо согласуются с недавно опубликованными данными Long с соавт. [6], также указывающими на высокую диагностическую значимость рекомбинантного белка Tr0965 *T. pallidum* при всех формах

сифилитической инфекции, а по результатам настоящего исследования особенно выраженную при выявлении первичного и раннего скрытого сифилиса.

Заключение

Результаты проведенного исследования характеризуют рекомбинантный белок Tr0965 как новый антиген для совершенствования трепонемных тестов серологической диагностики сифилиса, в совокупности с другими антигенами *T. pallidum* призванный обеспечить высокую чувствительность проводимых диагностических исследований, в том числе для диагностики ранних форм этого заболевания.

Источник финансирования

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России на 2015 г. и плановый период 2016 и 2017 гг. по Государственному контракту 114/БУ-2015-051 от 16.01.2015 г.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие иной финансовой поддержки / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brinkman MB, McKeivitt M, McLoughlin M, et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):888–891. doi: 10.1128/JCM.44.3.888-891.2006.
2. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005;16(1):45–51. doi: 10.1155/2005/597580.
3. Carlson JA, Dabiri G, Cribier B, Sell S. The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. *Am J Dermatopathol.* 2011;33(5):433–460. doi: 10.1097/DAD.0b013e3181e8b587.
4. Соколовский Е., Фриго Н., Ротанов С., и др. Восточно-европейская система сексуального и репродуктивного здоровья. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы // *Вестник дерматологии и венерологии.* — 2008. — №5. — С. 87–96. [Sokolovskii E, Frigo N, Rotanov S, et al. EE SRH Network. Guidelines for the laboratory diagnosis of syphilis in East-European countries. *Vestn Dermatol Venerol.* 2008;(5):87–96. (In Russ).]
5. Smith BC, Simpson Y, Morshed MG, et al. New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):105–111. doi: 10.1128/JCM.01390-12.
6. Long FQ, Zhang JP, Shang GD, et al. Seroreactivity and immunogenicity of Tr0965, a hypothetical membrane protein of *Treponema pallidum*. *Chin Med J (Engl).* 2012;125(11):1920–1924.
7. Castro R, Prieto ES, Santo I, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(1):250–253. doi: 10.1128/jcm.41.1.250-253.2003.
8. Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins.* 2006;64(3):643–651. doi: 10.1002/prot.21018.
9. Zhang RL, Zhang JP, Wang QQ. Recombinant *Treponema pallidum* protein Tr0965 activates endothelial cells and increases the permeability of endothelial cell monolayer. *PLoS One.* 2014;9(12):e115134. doi: 10.1371/journal.pone.0115134.
10. Хайруллин Р.Ф., Ротанов С.В., Фриго Н.В., Белоусова А.В. Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum* // *Вестник дерматологии и венерологии.* — 2012. — №5. — С. 56–64. [Khairullin R, Rotanov S, Frigo N, Belousova A. Bioinformatic analysis of *T. pallidum* specific antigens. *Vestn Dermatol Venerol.* 2012;(5):56–64. (In Russ).]
11. McGill MA, Edmondson DG, Carroll JA, et al. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. *Infect Immun.* 2010;78(6):2631–2643. doi: 10.1128/IAI.00173-10.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Рунина Анастасия Владимировна, б/с, научный сотрудник отдела лабораторной диагностики инфекций, передающихся половым путем, и дерматозов ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
 Адрес: 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6, тел.: +7 (499) 785-20-40, e-mail: bel4788@gmail.com

Старовойтова Анастасия Сергеевна, б/с, студентка факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Адрес: 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, тел.: +7 (499) 785-20-40, e-mail: starovoitova.anastasiya@mail.ru

Дерябин Дмитрий Геннадьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом лабораторной диагностики инфекций, передающихся половым путем, и дерматозов ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России

Адрес: 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6, тел.: +7 (499) 785-20-40, e-mail: dgderyabin@yandex.ru

Кубанов Алексей Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России

Адрес: 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6, тел.: (499) 785-20-40, e-mail: info@cnikvi.ru

DOI:10.15690/vramn614

Ю.В. Рылова¹, Л.Б. Буравкова^{1,2}, Б.Д. Животовский^{2,3}

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Российская Федерация

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

³ Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

Воздействие цисплатина на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека при различном уровне кислорода

Цель исследования: оценить повреждающее воздействие цисплатина на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) жировой ткани, находящиеся в фазе активной пролиферации и в состоянии монослоя, при стандартном (20%) и сниженном до 1 и 5% уровне кислорода в среде культивирования. **Методы.** Оценку влияния цисплатина на ММСК проводили после двух пассажей на культурах в состоянии монослоя и в активной фазе роста. Профиль поверхностных маркеров ММСК определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Жизнеспособность ММСК после инкубации с цисплатином оценивали по количеству апоптотических и некротических клеток с помощью набора ANNEXIN V-FITC — PI (Immunotech, Франция). Стандартные условия культивирования (~20% O₂) создавали в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония), 5% O₂ — при помощи мультигазового инкубатора (Sanyo, Япония), 1% O₂ — с использованием герметичной камеры (Stemcell Technologies, США). **Результаты.** Инкубация ММСК в состоянии монослоя с цисплатином в концентрации 10 мкг/мл в течение 72 ч вызывала гибель практически половины клеток. Во всех условиях культивирования увеличивалась доля PI⁺- и PI⁺/Ann⁺-клеток. Более кратковременные экспозиции с цисплатином (24 и 48 ч) не оказывали выраженного повреждающего эффекта. Воздействие цисплатина на ММСК в активной фазе роста в течение 48 ч сопровождалось накоплением количества Ann⁺- и PI⁺/Ann⁺-клеток. При этом наименьшее повреждающее воздействие цисплатина оказывал на клетки, культивируемые в условиях гипоксии (1% O₂). **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют, что ММСК в состоянии монослоя погибают преимущественно путем некроза, тогда как для культур ММСК в фазе роста в ответ на воздействие было характерно накопление клеток, погибающих путем апоптоза вне зависимости от уровня содержания кислорода в среде.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гипоксия, цисплатин.

(Для цитирования: Рылова Ю.В., Буравкова Л.Б., Животовский Б.Д. Воздействие цисплатина на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека при различном уровне кислорода. Вестник РАМН. 2016;71(2):114–120. doi: 10.15690/vramn614)

114

Yu.V. Rylova¹, L.B. Buravkova^{1,2}, B.D. Zhivotovky^{2,3}

¹ Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

³ Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

The Effects of Cisplatin on Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Different Oxygen Levels

Objective: To evaluate the damaging effects of cisplatin on MMSCs from adipose tissue in a phase of active proliferation and the state of the monolayer, this was exposed at standard (20%) and reduced to 1% and 5% level of oxygen. **Methods:** The effect of cisplatin was detected on monolayer cultures in the active growth phase after 2 passages. Profile surface markers of MMSC was determined by flow cytometry. MMSCs viability after incubation with cisplatin was detected by the number of apoptotic and necrotic cells using ANNEXIN V-FITC — PI Kit (Immunotech, France). Standard culture conditions (~20% O₂) were created in a CO₂ incubator (Sanyo, Japan), 5% O₂ — using multigas incubator (Sanyo, Japan), 1% O₂ — using an airtight chamber (Stemcell Technologies, USA). **Results:** Incubation of MMSC monolayer with cisplatin at a concentration of 10 µg/ml for 72 hours leads to death of half of the cells in the culture. Cisplatin increased the fracture of PI⁺-cell, and PI⁺/Ann⁺-cells under all culture conditions. The short-term exposure with cisplatin (24 and 48 hours) did not cause the damaging effect. Effects of cisplatin on the MMSC in the growth phase for 48 hours led to accumulation of Ann⁺-cells and PI⁺/Ann⁺-cells under all culture conditions. However, minimal noci-influence of cisplatin was observed in a culture under hypoxic conditions (1% O₂). **Conclusion:** These data suggest that MMSC monolayer dies primarily through necrosis, whereas MMSCs in the growth phase in response to cisplatin treatment dies by apoptosis, regardless the oxygen tension.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, hypoxia, cisplatin.

(For citation: Rylova YuV, Buravkova LB, Zhivotovky BD. The Effects of Cisplatin on Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Different Oxygen Levels. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2016;71(2):114–120. doi: 10.15690/vramn614)

Обоснование

В последнее время все больше внимания уделяют мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (ММСК) в связи с их важной ролью в терапии [1–3]. Исследования, посвященные оценке устойчивости ММСК к различным ДНК-повреждающим агентам, являются крайне актуальными, так как химиотерапия остается основным методом лечения для большинства типов рака. Цисплатин (СРt) (цис-диамин-дихлорплатина) — один из самых мощных химиотерапевтических агентов, используемых против широкого спектра злокачественных опухолей, в том числе головы и шеи, семенников, яичников, мочевого пузыря и легких [4]. Тем не менее его положительные эффекты ограничены из-за токсического действия на нетрансформированные здоровые ткани организма [5]. Исследования показали, что в ответ на химиотерапию ММСК костного мозга мигрируют из своей ниши, по-видимому, с целью поддержки регенерации тканей [6]. В более ранних работах исследователи сконцентрировали свое внимание на воздействии химиотерапевтических агентов на этот тип ММСК, показав их устойчивость к низким дозам повреждающих агентов [7–9]. Хотя основным депо ММСК является костный мозг, в настоящее время хорошо известно, что резидентные ММСК присутствуют во всех тканях организма; кроме того, небольшая популяция таких клеток может циркулировать в периферической крови [10]. Уже сейчас накоплено значительное количество исследований, указывающих на положительные эффекты введения ММСК не только из костного мозга, но и других источников, при остром повреждении почек, вызванном химиотерапией [11–14]. Механизмы, посредством которых ММСК способны снижать повреждения, активно изучаются. Большая часть исследований свидетельствует о паракринном механизме протективной функции ММСК [12, 13]. При этом стоит отметить, что в зоне повреждения существенно меняется микроокружение, в том числе содержание кислорода. Экспериментальные исследования свидетельствуют об изменении функциональных свойств ММСК в условиях гипоксии [15, 16].

Цель исследования: оценить *in vitro* повреждающее действие цисплатина на ММСК жировой ткани, находящиеся в фазе активной пролиферации и в состоянии монослоя, при стандартном (20%) и сниженном (до 1 и 5%) уровне кислорода в среде культивирования.

Методы

Дизайн исследования

В исследовании использовали ММСК из жировой ткани человека. Выделение проводили, используя методику, описанную в работе Л.Б. Буравковой и соавт. [17]. Ткань измельчали и обрабатывали 0,075% раствором коллагеназы IA в среде α -MEM в течение 35 мин при 37 °C. Затем суспензию центрифугировали 2 раза в течение 5 мин при 1000 оборотов/мин, осадок ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из среды α -MEM (MP Biomedicals, США) с добавлением 50 мкг/мл амфотерицина B (Sigma-Aldrich, США), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Клетки высевали в чашки Петри с плотностью 2–3 × 10³ ядросодержащих клеток на см². Смену среды проводили каждые 72 ч.

Оценку влияния СРt на ММСК проводили после двух пассажей на культурах, находящихся в состоянии монослоя, а также в активной стадии пролиферации. Для изучения воздействия в состоянии монослоя клетки пересеивали в чашки Петри диаметром 60 мм, плотностью 2–3 × 10³ кл/см² и культивировали в СО₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) до достижения 80–90% конфлюэнтного монослоя, затем вносили СРt в концентрации 10 мкг/мл и помещали в условия 20% О₂, 5% О₂ и 1% О₂ на 24, 48 и 72 ч. Для изучения влияния СРt на ММСК в активной фазе роста культуры клетки пассировали с той же плотностью и культивировали при 20% О₂, 5% О₂ и 1% О₂ в течение 48 ч, затем вносили СРt в концентрации 10 мкг/мл на 48 ч.

Условия исследования

Стандартные условия культивирования (~20% О₂) создавали в СО₂-инкубаторе (5% СО₂, 95% воздуха) (Sanyo, Япония), 5% О₂ — в мультигазовом инкубаторе (5% СО₂, 5% О₂, 90% N₂) (Sanyo, Япония), 1% О₂ — в герметичной камере (Stemcell Technologies, США), модифицированной датчиками давления, продувая газовой смесью (95% N₂, 5% СО₂) до установления концентрации кислорода 1%.

Критерии соответствия

Профиль поверхностных маркеров, характерный для ММСК, определяли с помощью моноклональных антител, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE) к антигенам CD31, CD54, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, по стандартной методике на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя. В качестве изотипического контроля к антителам использовали FITC- и PE-меченные IgG соответствующего класса.

Методы регистрации

Жизнеспособность ММСК после инкубации с СРt оценивали по количеству апоптотических и некротических клеток методом проточной цитофлуориметрии с помощью набора ANNEXIN V-FITC — PI (Immunotech, Франция) согласно инструкции производителя. Апоптотические клетки определялись за счет высокоаффинного связывания аннексина V, меченного FITC, с фосфолипидом фосфатидилсеринном, который на ранней стадии апоптоза перемещается на внешний слой мембраны клетки. Некротические клетки определяли за счет связывания йодида пропидия с ДНК при повреждении целостности мембран. Детектируемое смешанное окрашивание (AnnV⁺/PI⁺) анализируемых клеток свидетельствует о том, что клетка находится на поздней стадии апоптоза, так как йодид пропидия проникает через поврежденную мембрану клетки [18].

Клетки, осторожно ресуспендируя, помещали в охлажденный при 4 °C связывающий буфер из расчета не менее 100 тыс. клеток на 100 μ л буфера в каждой пробе и вносили по 5 μ л йодида пропидия и 1 μ л аннексина V-FITC, инкубировали в течение 15 мин при 4 °C, затем добавляли в каждую пробу по 400 μ л связывающего буфера, ресуспендировали и оценивали количество поврежденных клеток на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). Анализировали не менее 10 000 событий.

Статистический анализ

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., США). Для определения досто-

верности различий в случае негауссовых распределений использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости был принят за 5% (0,05). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего арифметического.

Результаты

Для идентификации выделенных и культивируемых в различных условиях клеток были использованы наиболее часто применяемые поверхностные маркеры ММСК. Цитофлуориметрическое исследование показало, что во всех исследуемых культурах доля клеток, стабильно экспрессирующих на поверхности такие антигены, как CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, составляла более 90%. Небольшое количество CD54⁺-клеток (~36%) связано с тем, что данная молекула (молекула межклеточной адгезии 1-го типа, ICAM-1) является индуцибельной, а для выраженной экспрессии ICAM-1 на поверхности необходима активация клеток цитокинами (IL 1β и IFN γ) [19]. Следовательно, в используемых клетках отсутствует провоспалительная активация. Кроме того, в культурах не детектировались клетки с поверхностным маркером CD31, характерным для эндотелиальных клеток, что свидетельствует о чистоте полученных адгезивных культур ММСК (рис.).

Инкубация ММСК в состоянии монослоя с СРt в концентрации 10 мкг/мл за первые 24 ч не вызывала увеличения доли как апоптотических, так и некротических клеток. В культурах, помещенных в условия 20% O₂, общая доля поврежденных клеток составила 5,1%, в условиях 5% O₂ — 4,8%, а при 1% O₂ — 6,1%, что существенным образом не отличалось от контроля (табл. 1). Более длительная инкубация в течение 48 ч увеличивала долю некротических PI⁺-клеток и клеток, имеющих двойное

окрашивание йодидом пропидия и аннексином V (Ann⁺/PI⁺-клетки). При этом доля апоптотических (Ann⁺-клеток также несколько увеличивалась, но не превышала 3% как при стандартных условиях культивирования (20% O₂), так и при снижении концентрации кислорода в среде до 5 и 1% (см. табл. 1). Общее количество поврежденных клеток было одинаковым и не зависело от содержания кислорода в среде культивирования, составляя 15% от общего числа клеток. В контрольных культурах условия гипоксии не оказывали повреждающего воздействия, количество живых клеток превышало 95%.

Инкубация с СРt в течение 72 ч вызывала гибель практически половины клеток в культуре как при 20% O₂, так и при 5 и 1% O₂ в среде. Доля PI⁺-клеток возрастала до 10,2±3,8, 13,6±5,5 и 24,8±1,6% при 1; 5 и 20% O₂, соответственно. Количество Ann⁺/PI⁺-клеток также значительно увеличивалось и составляло 24,6±1,6% при стандартных условиях, 34,6±2,3 и 9,7±0,7% — соответственно, при 1 и 5% O₂. При этом доля апоптотических Ann⁺-клеток в культурах ММСК в состоянии монослоя при воздействии СРt в течение 72 ч существенно не возрастала и варьировала от 3 до 5% как при стандартных условиях, так и в условиях гипоксии (см. табл. 1). Контрольные культуры без добавления СРt сохраняли высокий уровень жизнеспособности (более 95%).

Оценку воздействия на культуры ММСК в активной фазе роста проводили в течение 48 ч. Результаты показали, что в отличие от клеток в состоянии монослоя в пролиферирующих культурах при воздействии СРt доля апоптотических Ann⁺-клеток существенно возрастала и достигала 10,0±1,3% при 1% O₂, 10,8±1,7% при 5% O₂ и 12,7±0,6% при 20% O₂. Количество клеток с двойным окрашиванием (Ann⁺/PI⁺-клеток) составляло 18,3±6,6% при 1% O₂, 23,1±6,6% при 5% O₂ и 19,2±1,4% при 20% O₂, тогда как некротические PI⁺-клетки практически отсутствовали в культурах и при стандартных условиях,

116

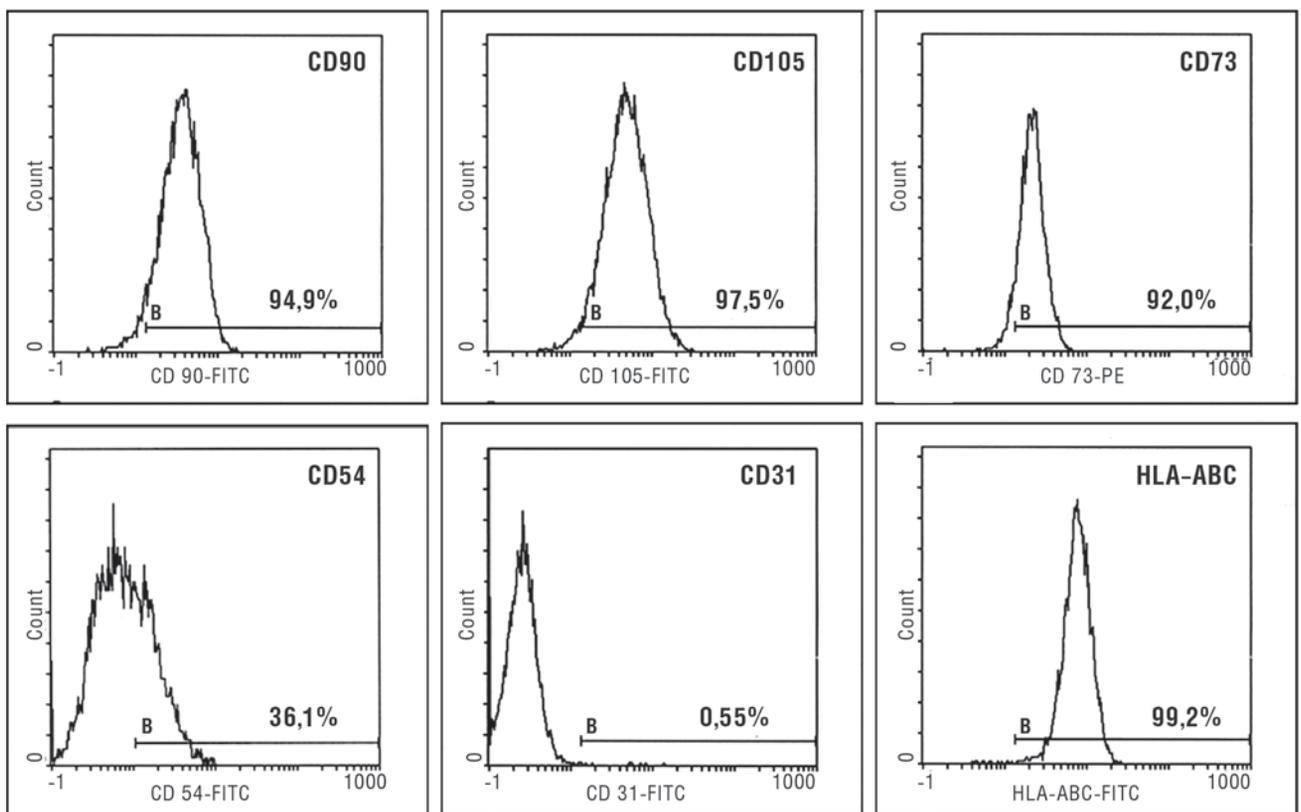


Рис. 1 Иммунофенотип мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани человека
Примечание. Представлены репрезентативные данные для клеток 2-го пассажа.

Таблица 1. Количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), погибающих в результате некроза и апоптоза при воздействии цисплатина (СРt) в дозе 10 мкг/мл в состоянии монослоя при разном содержании кислорода в среде культивирования в течение 24, 48 и 72 ч

Показатель	PI ⁺ , %	AnnV-PI ^{+/+} , %	Ann ⁺ , %	AnnV-PI ^{-/-} , %
<i>1% O₂</i>				
Контроль, 24 ч	1,0±0,5	1,6 ±0,6	1,4±1,2	96,1±1,9
СРt, 24 ч	3,0±0,5	2,1±0,5	0,9±0,2	93,9±0,9
Контроль, 48 ч	1,5±0,4	0,8±0,2	0,4±0,2	97,3±0,1
СРt, 48 ч	3,9±0,7	9,6±1,3*	2,2±0,5	84,4±1,2*
Контроль, 72 ч	1,9±0,4	1,4±0,4	1,5±0,6	95,2±0,8
СРt, 72 ч	10,2±3,8**	24,6±1,6**	5,8±0,8*	59,4±4,0*
<i>5% O₂</i>				
Контроль, 24 ч	1,1±0,3	0,4±0,1	1,0±0,3	97,5±0,2
СРt, 24 ч	2,6±0,6	1,4±0,3	0,8±0,0	95,2±0,9
Контроль, 48 ч	0,9±0,0	0,7±0,3	0,5±0,3	98,0±0,6
СРt, 48 ч	6,9±1,4*	5,8±0,4*	2,9±0,0*	84,4±1,3*
Контроль, 72 ч	1,4±0,4	0,5±0,2	0,6±0,2	97,5±0,7
СРt, 72 ч	13,6±5,5**	34,6±2,3**	4,8±0,4*	47,2±7,0**
<i>20% O₂</i>				
Контроль, 24 ч	2,2±0,5	1,0±0,3	0,4±0,3	96,4±0,4
СРt, 24 ч	2,2±0,7	1,6±0,5	1,3±0,4	94,9±0,5
Контроль, 48 ч	0,8±0,3	1,1±0,2	1,7±0,4	96,5±0,7
СРt, 48 ч	2,3±0,6	9,9±2,8*	3,1±0,8	84,8±3,1*
Контроль, 72 ч	1,0±0,0	0,8±0,2	1,2±0,5	97,0±0,7
СРt, 72 ч	24,8±1,6*	9,7±0,7*	3,2±0,2*	62,4±0,7*

Примечание. Здесь и в табл. 2: PI⁺ — ММСК, погибающие некрозом, Ann⁺/PI⁺ — ММСК на поздней стадии апоптоза, Ann⁺ — ММСК на ранней стадии апоптоза, AnnV-PI^{-/-} — живые ММСК. Представлены средние значения по 3 независимым экспериментам: *p*<0,05 по сравнению с контролем (*) и 20% O₂ (+).

и при гипоксии. При этом наименьшее повреждающее воздействие СРt оказал на клетки, культивируемые в условиях гипоксии (1% O₂): количество живых клеток в этих условиях после воздействия цитостатика составляло 71,0 ± 6,2%, тогда как в условиях 5 и 20% O₂ их оставалось 64,7 ± 5,7 и 66,7 ± 2,2%, соответственно (табл. 2).

Обсуждение

В последнее десятилетие во всем мире возрос интерес к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам взрослого организма. ММСК из жировой ткани и других источников уделяют много внимания из-за

Таблица 2. Количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, погибающих в результате некроза и апоптоза при воздействии СРt (10 мкг/мл) в фазе роста культуры при разном содержании кислорода в среде культивирования в течение 48 ч

Показатель	PI ⁺ , %	AnnV-PI ^{+/+} , %	Ann ⁺ , %	AnnV-PI ^{-/-} , %
<i>1% O₂</i>				
Контроль, 48 ч	1,1±0,4	1,9±0,2	0,8±0,2	96,2±0,2
СРt, 48 ч	0,7±0,1	18,3±6,6	10,0±1,3	71,0±6,2
<i>5% O₂</i>				
Контроль, 48 ч	1,2±0,2	1,2±0,3	0,7±0,4	96,9±0,8
СРt, 48 ч	1,3±0,5	23,1±6,6	10,8±1,7	64,7±5,7
<i>20% O₂</i>				
Контроль, 48 ч	1,2±0,5	2,3±0,8	1,0±0,6	95,5±0,9
СРt, 48 ч	1,4±0,2	19,2±1,4	12,7±0,6	66,7±2,2

возможного использования их не только в исследовательских, но и клинических целях. Многочисленные исследования в моделях на животных и перспективные клинические исследования показали, что ММСК взрослого организма успешно зарекомендовали себя в процессах репарации и регенерации костной, хрящевой ткани, тканей миокарда и могут применяться для лечения тканей и органов, поврежденных в результате химиотерапии [1–3, 13, 14].

В данном исследовании проведена оценка токсического воздействия алкилирующего агента СРt на ММСК жировой ткани в условиях различного содержания кислорода. Известно, что основными путями гибели клеток при воздействии СРt в зависимости от его концентрации являются апоптоз или некроз. Низкие концентрации этого агента (3 мкг/мл) в первую очередь вызывают апоптоз, а более высокие — преимущественно индуцируют некроз [13]. Однако результаты нашего исследования выявили различие в путях гибели клеток в зависимости от конfluэнтности культуры при использовании одинаковой дозы СРt. В культурах в состоянии монослоя после инкубации с цитостатиком детектировались преимущественно некротические клетки в отличие от культур в активной фазе роста, где окрашенные только йодидом пропидия клетки (PI⁺) не детектировались, а возрастало количество апоптотических Ann⁺-клеток.

Механизм цитотоксического действия препаратов на основе платины связан с формированием сшивок двухцепочечной молекулы ДНК, что приводит к ингибированию репликации и транскрипции. На повреждение ДНК клетки реагируют активацией внутриклеточных каскадов реакций, приводящих к репарации ДНК или к остановке клеточного цикла и апоптозу [4]. Белок p53, главный супрессор опухолевых клеток, являясь регулятором клеточного цикла и апоптоза, играет ключевую роль в чувствительности к СРt. Повреждение ДНК, вызванное цитостатиком, активирует экспрессию p53, который регулирует транскрипцию белка p21. Экспрессия p21, в свою очередь, ингибирует действие циклинзависимых киназ 1-го и 2-го типа (Cdk1 и Cdk2), вызывая тем самым остановку клеточного цикла. В том случае, если повреждения ДНК непоправимы, p53 запускает гибель клетки по пути апоптоза [4].

В ряде работ показано, что после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток большинство ММСК в костном мозге, тем не менее, имело происхождение реципиента [3, 8], и высказано предположение, что они не чувствительны к ДНК-повреждающим химиотерапевтическим агентам. Предположение подкрепляется тем фактом, что в исследованиях *in vitro* эти клетки также оказались устойчивыми к панели химиотерапевтических препаратов, особенно в клинической дозе, обычно используемой у больных при интенсивной химиотерапии [8, 9, 12, 20]. Так, в работе W. Liang и соавт. при использовании низких концентраций СРt (до 10 мкМ) в течение 72 ч отмечалась выраженная устойчивость ММСК костного мозга, тогда как увеличение дозы до 50 мкМ сопровождалось резким снижением их жизнеспособности: только около 10% клеток популяции оставались живыми. Использование 10 мкМ СРt сохраняло около 60% клеток культуры [20]. Чуть позже аналогичные данные были получены той же группой ученых и для ММСК жировой ткани человека [21]. При этом исследователи делают вывод, что ММСК человека имеют повышенный порог к индукции апоптоза ДНК-повреждающими агентами, такими как СРt, так как они

приводят к увеличению экспрессии белка p53, который, однако, не индуцирует апоптоз в клетках [9, 20]. Ученые предполагают, что спорный феномен, наблюдаемый в ММСК костного мозга и жировой ткани, может быть механизмом защиты, в частности, в стромальных клетках. Остановка клеточного цикла в результате экспрессии p53 может дать клеткам время, чтобы осуществить репарацию повреждений и поддержать свои характеристики [20].

В нашем исследовании подобный уровень жизнеспособности (~60% живых клеток) отмечен в монослойных культурах ММСК жировой ткани при использовании более высокой дозы СРt, которая соответствовала ~30 мкМ, и соотносится с данными группы W. Liang и соавт., так как в этих условиях так же не обнаружено увеличения доли апоптотических клеток.

Тем не менее в своей работе M. Seifrtova и соавт. оценивали воздействие высоких и низких доз СРt на растущей культуре ММСК пульпы зуба, 50% конfluэнтности, где показали, что 40 мкМ в течение 72 ч приводили к снижению жизнеспособности (~58% клеток оставались живыми). Меньшие концентрации (менее 20 мкМ) не оказывали сильного повреждающего воздействия. Воздействие 40 мкМ цисплатина в течение 72 ч вызывало увеличение доли апоптотических клеток до 18% в культуре ММСК пульпы зуба, что сопровождалось активацией экспрессии p53, p21 и накоплением доли клеток, находящихся в S- и G2/M-фазах клеточного цикла. Однако исследователи показали активацию митогенактивируемых протеинкиназ (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK), предполагая их участие в активации апоптоза в ММСК пульпы зуба в ответ на воздействие СРt. MAPK играют решающую роль в балансе клеточных ответов на различные факторы — апоптоз, выживание, пролиферацию и др. Три основные MAPK принимают активное участие в этих процессах. Активация каскадов с участием c-Jun-N-концевой киназы (JNK) и p38 запускает проапоптотические реакции, тогда как каскад, опосредованный ERK1/2, связан с пролиферацией клеток и антиапоптотическим процессом. Активация тех или иных MAPK является специфичной для типа клеток и зависит от сложной сети сигнальных путей внутри них [4].

Несмотря на то, что в состоянии монослоя количество живых ММСК после воздействия СРt не зависело от содержания кислорода в среде культивирования, некоторое протективное действие гипоксии (1% O₂) было отмечено в культурах ММСК в активной фазе роста. Участие гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF-1) в обеспечении жизнеспособности ММСК в условиях гипоксии в настоящее время подтверждено многими исследованиями [22, 23]. Гипоксия приводит к стабилизации HIF-1 и увеличению продукции VEGF и других ростовых факторов. При этом аутокринное воздействие VEGF активирует PI3K-путь, что вызывает фосфорилирование Akt и впоследствии способствует обеспечению более высокого уровня жизнеспособности [24]. Кроме того, растущий объем экспериментальных данных свидетельствует о том, что в некоторых типах злокачественных образований положительные эффекты СРt заметно уменьшались в связи с условиями гипоксии. Многие из HIF-1 индуцибельных молекул, таких как ростовые факторы, транспортеры (Glut-1, Mdr-1), антиапоптотический белок Bcl-2, прямо или опосредованно могут участвовать в развитии резистентности к химиотерапевтическим препаратам [25].

Заклучение

В результате проведенного исследования было выявлено отличие пути гибели ММСК жировой ткани в зависимости от конфликтности культуры при воздействии высокой дозы ДНК-повреждающего агента СРt. Культуры в состоянии монослоя погибали преимущественно путем некроза, тогда как для культур в фазе роста в ответ на воздействие было характерно накопление клеток, погибающих путем апоптоза вне зависимости от уровня содержания кислорода в среде. При этом в обоих типах культур общее количество поврежденных клеток не превышало 50%, что свидетельствует о наличии механизмов защиты, обеспечивающих достаточный уровень жизнеспособности этих клеток. Более подробное исследование механизмов, лежащих в основе устойчивости

ММСК к ДНК-повреждающим агентам с учетом возможных условий микроокружения *in vivo* имеет важное значение для дальнейшего применения этих клеток в регенеративной медицине.

Источники финансирования

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №14-04-00933.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Harvey RL, Chopp M. The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2003;14(1):143–151. doi:10.1016/s1047-9651(02)00058-x.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(13):8932–8937. doi:10.1073/pnas.132252399.
- Stamm C, Kleine HD, Westphal B, et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;52(3):152–158. doi:10.1055/s-2004-817981.
- Seifrtova M, Havelk R, Mielova J, et al. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *International Endodontic Journal*. 2011;45(5):401–412. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01990.x.
- Momekov G, Ferdinandov D, Bakalova A, et al. In vitro toxicological evaluation of a dinuclear platinum (II) complex with acetate ligands. *Arch Toxicol*. 2006;80(9):555–560. doi:10.1007/s00204-006-0078-0.
- Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, et al. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell*. 2008;14(3):263–273. doi:10.1016/j.ccr.2008.08.001.
- Chen MF, Lin CT, Chen WC, et al. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Rad Oncol Biol Phys*. 2006;66(1):244–253. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.03.062.
- Li J, Law HK, Lau YL, et al. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol*. 2004;127(3):326–334. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05200.x.
- Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, et al. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(12):2753–2765. doi:10.1634/stemcells.2006-0108.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001;264(1):51–62. doi:10.1002/ar.1128.
- Ahn JM, You SJ, Lee YM, et al. Hypoxia inducible factor activation protects the kidney from gentamicin-induced acute injury. *PLoS One*. 2012;7(11):e48952. doi:10.1371/journal.pone.0048952.
- Zarjou A, Kim J, Traylor AM, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells in cisplatin-induced renal injury require heme oxygenase-1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(1):254–262. doi:10.1152/AJPRENAL.00594.2010.
- Wang WW, Wang W, Jiang Y, et al. Human adipose derived stem cells modified by HIF-1 α accelerate the recovery of cisplatin induced acute renal injury in vitro. *Biotechnol Lett*. 2014;36(3):667–676. doi:10.1007/s10529-013-1389-x.
- Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(2):34. doi:10.1186/scrt194.
- Buravkova LB, Rylova YV, Andreeva ER, et al. Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1830:4418–25. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.029.
- Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*. 2007;6(6):745–757. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x.
- Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М.П. Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоасpirата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода // *Цитология*. – 2009. – Т. 51. – №1. – С. 5–11. [Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, et al. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under lower oxygen tension. *Cell tissue biol*. 2009;51(1):5–11. (In Russ.)] doi:10.1134/S1990519X09010039
- Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии: диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. 352 с. [Khaitov RM, Pinegin BV, Yarilin AA. *Rukovodstvo po klinicheskoi immunologii: diagnostika zabolevanii immunnnoi sistemy: rukovodstvo dlya vrachei*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. 352 p. (In Russ.)]
- Pober JS, Gimbrone MA Jr, Lapierre LA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*. 1986;137(6):1893–1896.
- Liang W, Lu C, Li J, et al. p73 α regulates the sensitivity of bone marrow mesenchymal stem cells to DNA damage agents. *Toxicology*. 2010;270(1):49–56. doi:10.1016/j.tox.2010.01.011.
- Liang W, Xia H, Li J, et al. Human adipose tissue derived mesenchymal stem cells are resistant to several chemotherapeutic agents. *Cytotechnology*. 2011;63(5):523–530. doi:10.1007/s10616-011-9374-5.
- Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2004;57(10):1009–1014.

23. Bhang SH, Cho SW, Lim JM. Locally delivered growth factor enhances the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs. *Stem Cells*. 2009;27(8):1976–1986. doi: 10.1002/stem.115.
24. Stubbs SL, Hsiao ST, Peshavariya HM, et al. Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose derived stem cells and conditions endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dev*. 2012;21(11):1887–1896. doi: 10.1089/scd.2011.0289.
25. Doktorova H, Hrabeta J, Khalil MA, et al. Hypoxia induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015;159(2):166–177. doi: 10.5507/bp.2015.025.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Рылова Юлия Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН»

Адрес: 123007, Москва, ул. Хорошевское шоссе, д. 76а, **тел.:** +7 (499) 195-65-44, **e-mail:** yuliaril@mail.ru

Буравкова Людмила Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по науке, заведующая лабораторией клеточной физиологии ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН»

Адрес: 123007, Москва, ул. Хорошевское шоссе, д. 76а, **тел.:** +7 (499) 195-22-43, **e-mail:** buravkova@imbp.ru

Животовский Борис Давидович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза, профессор кафедры фармацевтической химии, факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр., д. 27 корп. 1, **тел.:** +7 (495) 932 9830, **e-mail:** Boris.Zhivotovsky@ki.se

DOI: 10.15690/vramn654

Г.М. Волгарева, И.Н. Михайлова, Д.А. Головина

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Минздрава России,
Москва, Российская Федерация

Меланома и вирусы папилломы человека: есть ли перспектива для исследования?

Меланома — одна из наиболее агрессивных злокачественных опухолей человека. Заболеваемость меланомой и смертность от нее неуклонно растут. Ультрафиолетовое излучение — основная причина развития меланомы, однако это не единственный экологический фактор, вовлеченный в меланомогенез. Возможность вирусной природы меланомы обсуждается давно. Среди кандидатов на роль этиологических агентов меланомы можно рассматривать папилломавирусы, поскольку в эту группу входят сильные канцерогены, вызывающие рак шейки матки и некоторые другие формы злокачественных опухолей. В настоящем обзоре проанализированы данные литературы об ассоциации меланомы с вирусами папилломы человека (ВПЧ). Так, несколько исследовательских групп обнаружили папилломавирусы в образцах меланомы кожи и слизистых оболочек, при этом нередко выявлялись и вирусы типов высокого онкогенного риска. Была доказана этиологическая роль онкогенных ВПЧ в развитии инвазивных карцином на слизистых оболочках таких органов, как шейка матки, вульва, вагина, половой член, анус, ротовая полость. Вместе с тем в подавляющем большинстве работ при обнаружении в образце меланомы вирусной ДНК проверка экспрессии генома вируса не проводилась. Это обстоятельство именно в случае меланомы является крайне существенным, т.к. папилломавирусы регулярно обнаруживаются на нормальной коже и слизистых оболочках человека, что делает реальной возможность контаминации изучаемого образца опухоли вирусной ДНК in vivo. Имеются ограниченные данные об ухудшении прогноза заболевания при папилломавирусном статусе меланомы, но систематического наблюдения за статистически значимыми группами больных, различающимися по данному статусу опухоли, не проводилось. Способность онкогенов Е6 и Е7 ВПЧ высокого онкогенного риска трансформировать нормальные меланоциты человека была показана в экспериментах in vitro. Таким образом, можно предполагать наличие ассоциации меланомы с онкогенными ВПЧ. Клиническая значимость этой проблемы в условиях неуклонного роста показателей заболеваемости и смертности от меланомы в России и мире в целом представляется нам бесспорной, а вопрос об ассоциации меланомы с ВПЧ — заслуживающим дальнейшего изучения.

Ключевые слова: меланома, вирусы папилломы человека, онкогены, меланоциты.

(Для цитирования: Волгарева Г.М., Михайлова И.Н., Головина Д.А. Меланома и вирусы папилломы человека: есть ли перспектива для исследования? *Вестник РАМН*. 2016;71(2):121–127. doi: 10.15690/vramn654)

121

G.M. Volgareva, I.N. Mikhaylova, D.A. Golovina

N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

Melanoma and Human Papillomaviruses: Is There an Outlook for Study?

Melanoma is one of the most aggressive human malignant tumors. Its incidence and mortality are growing steadily. Ultraviolet irradiation is the main risk factor for melanoma involved in melanomagenesis. The probability of viral etiology of melanoma has been discussed. Human papillomaviruses (HPV) have been mentioned among candidates for its etiologic agents because some HPV types are the powerful carcinogens causing cervical cancer and other cancers. The review analyses the literature data on the association of melanoma with HPV. Several groups found HPV in skin melanomas as well as in mucosa; viruses of high oncogenic risk were detected in some cases. For some organs the etiological role of high-risk HPV as inducers of invasive carcinomas is confirmed. These organs require special mention: cervix uteri, vulva, vagina, penis, anal region, and oral cavity. However in the majority of the studies in which viral DNA-positive melanomas were found, testing for viral genome expression was not done while this is the fact of primary importance. HPV are found in normal skin and mucous membranes thus creating justifiable threat of tumor specimen contamination with viral DNA in vivo. There are limited data on aggravation of the disease prognosis in papillomavirus-positive melanomas. However, any systematic observation of a sizeable patient group distinguished by that tumor type has not been performed yet. Viral E6 and E7 oncogenes of high-risk papillomaviruses were shown to be able to transform normal human melanocytes in vitro experiments. Thus, we can assume the presence of the association of melanoma with oncogenic HPV. The clinical significance of this problem is indisputable under the conditions of the steady increase in melanoma incidence and mortality rates in Russia and abroad. The problem requires further study.

Key words: melanoma, human papillomaviruses, oncogene, melanocyte.

(For citation: Volgareva GM, Mikhaylova IN, Golovina DA. Melanoma and Human Papillomaviruses: Is There an Outlook for Study? *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(2):121–127. doi: 10.15690/vramn654)

Актуальность

Меланома — злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов, пигментных клеток, продуцирующих меланины. Меланома является одной из наиболее агрессивных опухолей человека. Она может возникнуть в любом из органов, в которых присутствуют меланоциты, чаще всего на коже, однако злокачественной трансформации могут подвергнуться также меланоциты глаза, слизистых оболочек органов дыхания, пищеварительной и мочеполовой системы.

Распространенность в Российской Федерации

В структуре онкологической заболеваемости населения России меланома кожи составила в 2012 г. среди женщин 1,2%, среди мужчин — 1,9%. Абсолютное число впервые в жизни установленных диагнозов «Меланома кожи» выросло с 2481 до 3335 в период с 2002 по 2012 г. Среди всех злокачественных новообразований меланома кожи характеризуется самыми высокими темпами ежегодного прироста заболеваемости — 2,75%. В целом же за этот период заболеваемость меланомой кожи возросла на 32,38% (для сравнения: частота заболеваемости раком трахеи, бронхов и легкого в 2002–2012 гг. в России снизилась на 6,38%). Что касается смертности, то на фоне значимого снижения стандартизованного коэффициента для всех онкологических заболеваний в целом, имевшего место в период с 2002 по 2012 г. (для мужчин — на 10,5%, для женщин — на 6,1%), статистический показатель смертности от меланомы кожи вырос за указанный период на 20,8% среди мужчин и на 10,8% среди женщин [1].

Неблагоприятные тенденции по заболеваемости меланомой и смертности от этой патологии, характерные для России, совпадают с общемировыми [2].

Факторы риска

Установленными факторами риска при меланоме являются:

- ультрафиолетовое излучение, как естественное, так и искусственное (от оборудования для загара);
- фенотип (конкретнее, так называемый фототип кожи): меланома чаще возникает у лиц со светлой кожей, голубыми глазами, веснушками;
- наличие в анамнезе солнечных ожогов;
- синдром диспластического невуса;
- наследственность: наличие в семье больных меланомой;
- пигментная ксеродерма;
- фактор множественности невусов (более 50);
- возраст старше 50 лет;
- мужской пол.

Ведущим фактором риска признано ультрафиолетовое излучение [3].

Вместе с тем ряд авторов среди не проясненных до конца проблем, касающихся биологии этой опухоли, выделяют именно роль факторов окружающей среды [4]. Сообщения о редких случаях таких локализаций опухоли, где воздействие ультрафиолетового излучения исключено, в частности меланомы шейки матки [5–7], вульвы [8, 9], вагины [10], полового члена [10], прямой кишки и перианальной области [11], ротовой полости [12, 13], дают повод усомниться, что ультрафиолет является единственным внешним фактором, вовлеченным в этиологию этого новообразования. Результаты исследования, проведенного В. Ragnarsson-Olding, прямо указывают на существование каких-то неизвестных причин, ответственных за возникновение меланомы, сопоставимых по мощности с ультрафиолетовым облучением [14]. При оценке ча-

стоты выявления меланомы разных локализаций были учтены размеры площади соответствующих поверхностей. С поправкой на данный параметр обнаружено, что считающиеся крайне редкими для первичной меланомы локализации в действительности таковыми не являются: например, меланома вульвы возникает так же часто, как и меланома кожи лица, интенсивно облучаемой ультрафиолетом, а подногтевая меланома — в 9 раз чаще, чем опухоли на хронически облучаемых участках тела.

На ассоциацию с инфекционным агентом может указывать повышение частоты возникновения той или иной опухоли у лиц с нарушениями иммунитета. В когортном исследовании, охватившем 28 855 реципиентов, перенесших пересадку почки, частоту разных форм онкологических заболеваний С. Vajdic и соавт. [15] сравнивали со случаями новообразований у этих же пациентов до трансплантации. Заболеваемость меланомой у наблюдаемых лиц значимо (почти в 2,5 раза) возрастала после операции по пересадке органа. Для сравнения: заболеваемость раком шейки матки (РШМ) среди женщин, входивших в изучаемую когорту, возросла в такой же степени.

Однако, F. Bastiaannet и соавт. [16] не получили подобного подтверждения в своей работе. Крайне низкую заболеваемость меланомой после трансплантации почки (1 случай на 1125 пациентов) авторы объясняют назначением этим лицам иммуносупрессорных препаратов невысокой активности. Другим объяснением может служить недостаточный для обнаружения вирусассоциированных опухолей срок наблюдения за больными после трансплантации почки (~7,3 года).

Возможность участия вирусов в генезе меланомы исследуется на протяжении нескольких десятилетий. В частности, нами было проведено изучение гуморального иммунного ответа к трансмембранному белку эндогенного ретровируса человека (herv-k) у больных меланомой [17]. Протестировав 44 сыворотки от больных меланомой на разных стадиях заболевания и 20 — от здоровых лиц, приблизительно в 16% случаев мы обнаружили позитивность материала у больных, причем все серопозитивные случаи наблюдались в группах с метастазированием или с прогрессированием основного заболевания; у здоровых лиц вирусспецифических антител не обнаружено.

Известна успешная попытка создания экспериментальной модели *in vivo* вирусиндуцированной меланомы глаза у кошки [18]. Находки, сделанные при изучении ассоциаций меланомы с вирусами, обобщались в обзорах S. Singh и соавт. и U. Hengge [19, 20].

Интерес к папилломавирусам как этиологическому фактору меланомы был инициирован пионерской работой немецкого профессора Х. Цурхаузена, удостоенного позднее Нобелевской премии за исследования вирусов этой группы. Коллектив ученых под его руководством в одном образце меланомы кожи обнаружил вирусы папилломы человека (ВПЧ) двух типов — 17а и 38 [21]. Вскоре в эпидемиологическом исследовании, выполненном методом случай–контроль, F. Hartveit и В.О. Maehle показали наличие общего фактора риска для дисплазии эпителия шейки матки и меланомы кожи: в группе пациенток с дисплазиями (n=805) риск развития меланомы оказался в 6 раз выше, чем среди контрольных лиц; в группе женщин с меланомой (n=71) дисплазии в эпителии шейки матки обнаруживались в 9 раз чаще, чем в популяции в целом [22]. В 1998 г. впервые были опубликованы данные об обнаружении в образце меланомы кожи вируса папилломы человека высокого онкогенного риска 16-го типа убедительность сообщения усиливало то, что его авторы не только показали присутствие в опухолевых клетках ДНК вируса методом

гибридизации *in situ*, но и подтвердили экспрессию генома ВПЧ методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [23].

Итак, результаты первых работ показали, что вопрос, вынесенный в название настоящего обзора, небеспредметен.

Цель настоящего обзора — анализ полученных к настоящему времени данных литературы, касающихся возможности ассоциации меланомы с ВПЧ, и оценка перспективности дальнейших исследований в этом направлении. Актуальность такого анализа обусловлена как отмеченной выше неблагоприятной тенденцией к росту заболеваемости меланомой и смертности от нее, так и значительно углубленными к настоящему моменту представлениями о механизмах папилломавирусного канцерогенеза и молекулярных особенностях ВПЧ-положительных опухолей и, наконец, созданием вакцин для профилактики ВПЧ-индуцированных форм рака, в первую очередь РШМ [24–26].

Меланома, развиваясь из нейроэктодермальных клеток, меланоцитов, не является производным эпителия, тогда как, согласно современным представлениям о ВПЧ, эти вирусы являются строго эпителиотропными [25]. Однако и эпителиальные клетки, и меланоциты — это дериваты эктодермы, и, кроме того, современные представления о биологии ВПЧ формировались постепенно и корректировались с учетом новых находок, что допускает возможность дальнейшего внесения изменений. Заслуживает внимания и то, что органы, в слизистых оболочках которых может развиваться меланома (шейка матки, вульва, вагина, половой член, анус, ротовая полость), входят в перечень органов, для которых доказана этиологическая роль ВПЧ типов высокого риска в возникновении в них инвазивных карцином [25].

О научной классификации вирусов папилломы человека

Вирусы папиллом, объединяемые в семейство *Papillomaviridae*, — чрезвычайно разнообразная группа небольших ДНК-содержащих видоспецифичных вирусов. Они обнаружены у подавляющего большинства видов млекопитающих, а также у некоторых птиц и рептилий. Количество известных науке папилломавирусов быстро увеличивается: так, в 2004 г. сообщалось о 118 типах, геном которых был полностью охарактеризован, а в 2010 г. — уже о 189 типах (рис. 1) [27, 28]. Семейство *Papillomaviridae* включает 29 родов, обозначаемых буквами греческого алфавита. В основу таксономии этих вирусов положен генетический принцип, а именно степень несоответствия нуклеотидной последовательности в наиболее консервативной, т.е. наименее различающейся у разных представителей этой группы, области их генома — гене *L1*. Новые типы, подтипы и варианты папилломавирусов описываются в случае, когда последовательность гена *L1* у вновь выделенного вируса отличается от уже известных на 10% нуклеотидов (тип), на 2–10% (подтип) или менее чем на 2% (вариант) [27].

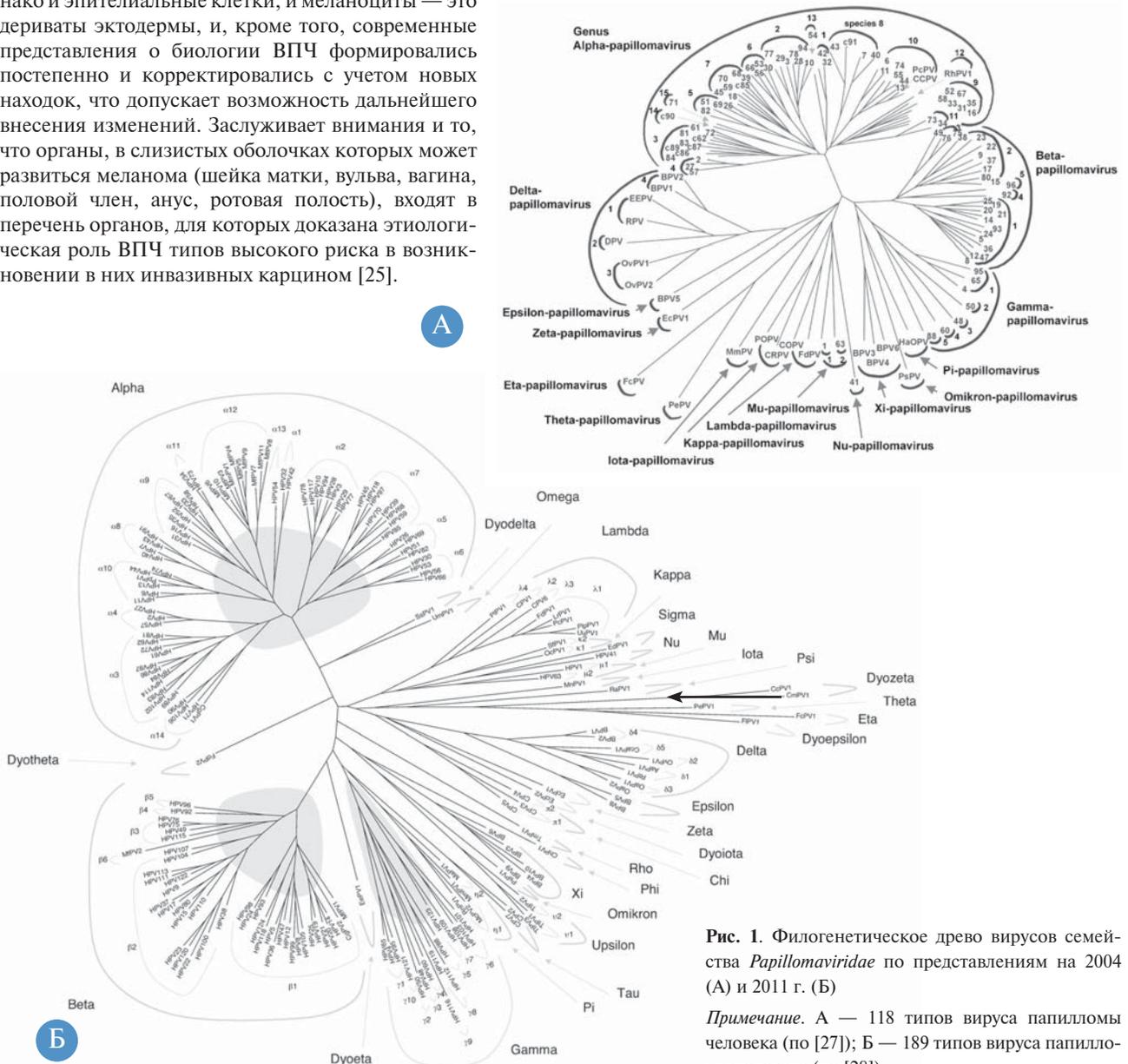


Рис. 1. Филогенетическое древо вирусов семейства *Papillomaviridae* по представлениям на 2004 (А) и 2011 г. (Б)

Примечание. А — 118 типов вируса папилломы человека (по [27]); Б — 189 типов вируса папилломы человека (по [28]).

Среди *Papillomaviridae* наиболее детально изучаются ВПЧ. Количество известных ВПЧ достигло 120 [28]. ВПЧ образуют 5 родов — α , β , γ , μ , ν . ВПЧ, относящиеся к роду α , инфицируют преимущественно слизистые оболочки ротовой полости и аногенитальной сферы, а также эпителий наружных половых органов. Все известные на сегодня канцерогенные ВПЧ относятся именно к роду α . ВПЧ четырех остальных родов обычно обнаруживают на коже, а также на слизистых оболочках, не относящихся к половым органам.

Геномная ДНК всех папилломавирусов содержит 3 области:

- длинную регуляторную область (Long Control Region, LCR, или, иначе, Upstream Regulatory Region, URR) с последовательностями, ответственными за контроль репликации и транскрипции вируса;
- раннюю (Early, E) область, включающую открытые рамки считывания *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* и *E7*, необходимые вирусу для осуществления «ранних», не связанных с продукцией зрелых вирусных частиц функций, таких как репликация и транскрипция вирусного генома, а также придание инфицированной клетке черт злокачественности (у ВПЧ тех типов, которые обладают канцерогенным потенциалом);
- позднюю (Late, L) область, кодирующую структурные белки L1 и L2 вирусного капсида, определяющие структуру зрелой вирусной частицы.

Этиопатогенез

Наибольшее клиническое значение имеют ВПЧ двух типов высокого онкогенного риска — ВПЧ16 и ВПЧ18: они ответственны за возникновение, соответственно, ~50 и 20% случаев РШМ по всему миру [29]. Схема строения генома ВПЧ16 представлена на рис. 2 [30].

Под действием ВПЧ определенных типов в случае РШМ индукции предраковых изменений эпителия, так называемых дисплазий, а также инвазивных карцином обычно предшествует длительная инфекция этими вирусами. Установлено, что канцерогенный потенциал ВПЧ коррелирует с накоплением мутаций (которое происходило на протяжении миллионов лет совместной эволюции человека и вируса) в ранней области вирусного генома, прежде всего в генах *E6* и *E7*, получивших поэтому название вирусных онкогенов [31, 32]. Активность белковых продуктов генов *E6* и *E7* у ВПЧ разных типов

существенно различается, что и обусловило разделение ВПЧ на типы низкого и высокого онкогенного риска. Небольшие вирусные онкобелки *E6* и *E7* ВПЧ типов высокого риска могут взаимодействовать с десятками важнейших клеточных белков, нарушая их нормальное функционирование. Принято выделять способность *E7* связываться с белком ретинобластомы pRb [33], а также способность *E6* взаимодействовать с белком p53 [34]. При этом в инфицированной клетке нарушаются такие процессы, как контролируемое продвижение по митотическому циклу, апоптоз, репарация; повышается мобильность этой клетки, резко увеличивается нестабильность ее генома.

ВПЧ типов высокого риска являются этиологическими агентами РШМ, а также рака влагалища, вульвы, полового члена, перианальной области, ротовой полости. Канцерогенами для человека признаны ВПЧ двенадцати типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59; еще для нескольких типов получены ограниченные свидетельства канцерогенности. Перечень форм рака, в возникновении которых доказано участие ВПЧ, и список типов вирусов высокого риска постепенно пополняются и уточняются [25, 35, 36].

Наконец, ВПЧ5 и ВПЧ8 (оба из рода β) предположительно являются канцерогенами для кожного эпителия: они ассоциированы с таким редким заболеванием, как бородавчатая эпидермодисплазия [36].

Клинические проявления

Для клинической характеристики в этой связи важно следующее. Все формы рака, в возникновении которых доказана роль ВПЧ, этиологически гетерогенны: только определенная часть карцином ротовой полости, вульвы и др. возникает с участием ВПЧ, другая же часть опухолей той же локализации — ВПЧ-отрицательна. В каждом из этих органов, включая шейку матки, ВПЧ-положительный рак отличается от ВПЧ-отрицательной формы по молекулярно-биологическим, гистологическим и клиническим признакам [37, 38].

Содержание понятия «вирус как этиологический фактор развития опухоли» подразумевает комплекс фактов, таких как регулярное обнаружение вирусной ДНК в ядрах опухолевых клеток (для ДНК-содержащих вирусов); способность клонированных вирусных генов в системах *in vitro* индуцировать злокачественную трансформацию клеток, включая клетки человека; регулярная экспрессия вирусных генов в опухолевых клетках; существование в природе сходных вирусов, способных индуцировать опухоли у экспериментальных животных; подтверждение связи между опухолевым процессом и наличием вирусного генетического материала в опухолевых клетках эпидемиологическими данными [25].

Уместно упомянуть, что эти критерии основаны на фактах, установленных на текущий момент; известны попытки данный перечень расширить. Так, М. Gillison и К. Shah полагают, что ВПЧ-ассоциированные формы рака должны быть по своей природе преимущественно плоскоклеточными (данный тезис фактически уже опровергнут, т.к. установлено, что онкогенные ВПЧ вызывают не только плоскоклеточный, но и аденогенный РШМ); должны возникать там, где заражение вирусом может происходить при прямом контакте; там, где ВПЧ могут вызывать доброкачественные повреждения (дисплазии); у лиц с ВПЧ-ассоциированными формами рака в крови должны присутствовать антитела к белкам *E6* и *E7* ВПЧ. Формы рака, вызванные онкогенными ВПЧ, по мнению авторов, должны иметь факторы риска, связанные с

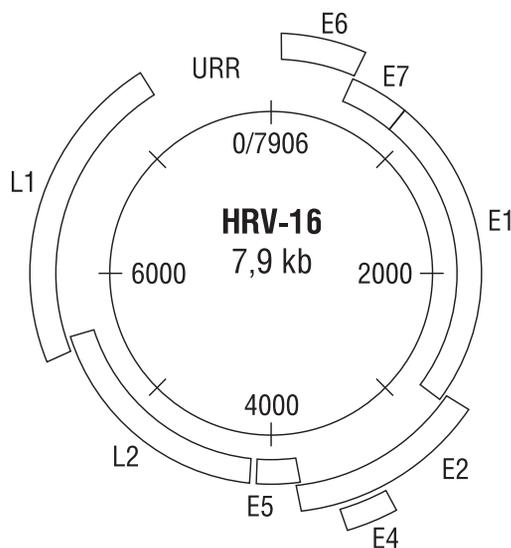


Рис. 2. Структура генома ВПЧ16 (по [18])

Примечание. Пояснения представлены в тексте.

сексуальным поведением: такие формы рака должны с большей частотой, чем ожидаемая (среднепопуляционная), возникать у лиц с дефектами иммунитета, а также у тех, у кого раньше была выявлена ВПЧ-ассоциированная опухоль [37].

Имеющиеся данные литературы мы рассматриваем с учетом этих критериев.

Диагностика

Детекция ВПЧ в меланоме обычно сводится к выявлению вирусной ДНК в ПЦР. Реже с той же целью применяют гибридизацию *in situ* [8, 23] или иммуногистохимический метод обнаружения белков E6 и E7 [39, 40]. В табл. 1 суммированы результаты этих исследований.

Данные, обобщенные в табл. 1, отличает неоднородность. В большинстве из этих работ хотя бы в части изученных образцов выявлялись ВПЧ, однако типы вируса значительно варьировали; ВПЧ высокого риска были выявлены в некоторых образцах меланомы в 8 из 13 исследований.

Поскольку ВПЧ часто выявляются на нормальной коже человека, а также на слизистых оболочках, интерпретация приведенных данных осложняется, ибо реальны контаминация этими вирусами образца меланомы *in vivo* и, как следствие, ложноположительный результат ПЦР. Вопрос о том, что может служить отрицательным контролем в подобной работе, разные авторы решают по-разному. Несколько исследовательских групп в качестве такого контроля использовали адекватный биопсийный материал от здоровых доноров [39, 41–43], другие — адекватные условно-нормальные ткани от самих больных меланомой [44–46]. В некоторых работах, в которых образцы опухоли оказались ВПЧ-положительными, такой контроль отсутствовал [21, 47].

Особую весомость приобретают в этих условиях морфологические данные, свидетельствующие о присутствии вируса в ядрах клеток меланомы [39, 40], обнаружение колокализации маркера меланоцитов НМВ45 и нуклеи-

новых кислот ВПЧ в этих клетках [43, 48], а также подтверждение транскрипции генома вируса в ДНК ВПЧ16-положительном образце меланомы [23]. Представляется уместным в этой связи рекомендовать для проведения подобных работ комплексный подход, который позволяет в образце опухоли определять вирусную ДНК (в ПЦР) и мРНК, соответствующую онкогенам E6 и E7 в положительных образцах (в ОТ-ПЦР), а также иммуногистохимически визуализировать вирусные онкобелки (вариант подобного комплекса мы описали ранее [49]).

Результаты попыток обнаружить ВПЧ в образцах меланомы слизистых оболочек представлены в табл. 2.

В части изученных образцов вульвы, перианальной области, ротовой и носовой полостей были найдены ВПЧ высокого риска, способность которых вызывать в этих органах инвазивные карциномы уже доказана. Обращает на себя внимание отсутствие публикаций о попытках детекции ВПЧ в меланоме шейки матки.

Экспериментальный канцерогенез

Был исследован эффект от введения клонированных онкогенов ВПЧ высокого риска в нормальные пигментные клетки *in vitro* [50]. С помощью ретровирусного вектора в меланоциты человека были внесены гены E6 и E7 ВПЧ16. Произошла иммортализация этих клеток: они продолжали активно пролиферировать тогда, когда клетки исходной культуры перестали размножаться. Для пролиферации трансфектанты нуждались, однако, в промоторе тетрадеканойлфорбол-13 ацетате (ТРА), они не росли в полужидкой среде и не давали опухолей при прививке бестимусным мышам. Эти клетки содержали значительно больше меланина, чем исходный материал, а также несколько отличались от него по антигенной характеристике. Таким образом, экспериментальное введение в нормальные меланоциты человека онкогенов E6 и E7 ВПЧ высокого риска повлияло на ряд фенотипических признаков клеток-трансфектантов и, в частности, сообщило им черты бессмертности.

Таблица 1. Результаты детекции вирусов папилломы человека (ВПЧ) в меланоме

Общее число работ, в которых проводилась детекция ВПЧ в образцах меланомы	Общее число работ, в которых были обнаружены ВПЧ (число работ, где были обнаружены онкогенные ВПЧ)	Обнаруженные типы ВПЧ*	Ссылки
13	12 (8)	3, 5, 6, 17, 16 , 18 , 20, 22, 24, 33 , 38, Z95969, AJ00151	8, 10, 21, 23, 39–47

Примечание. * — типы ВПЧ высокого онкогенного риска выделены жирным шрифтом.

Таблица 2. Результаты детекции вирусов папилломы человека (ВПЧ) в меланоме слизистых оболочек

Общее число работ (в скобках), в которых проводилась детекция ВПЧ в образцах первичной меланомы следующих органов	Общее число работ, в которых обнаружена ДНК ВПЧ (число работ, где были обнаружены онкогенные ВПЧ)	Всего работ, в которых подтверждена экспрессия генома ВПЧ	Обнаруженные типы ВПЧ*	Ссылки
Вульва (4)	2 (1)	-	3, 38, 16	8, 10, 44, 45
Влагалище (2)	1 (0)	-	3, 38	10, 45
Анус, прямая кишка (1)	1 (1)	-	16 , 33	10
Половой член (1)	0	-	-	-
Ротовая полость (2)	1 (1)	-	16 , 18 , 31 , 33	10, 40
Носовая полость (1)	1 (1)	-	16 , 33	10

Примечание. * — типы ВПЧ высокого онкогенного риска выделены жирным шрифтом.

ВПЧ-статус меланомы и особенности клинического течения заболевания

О возможных неблагоприятных клинических последствиях ВПЧ-положительности меланомы сообщили Dgeau и соавт. [39]. Исследовав образцы меланомы кожи от 12 больных, ВПЧ они обнаружили в 7 (58%) случаях. В дальнейшем все эти пациенты скончались от быстрого прогрессирования заболевания, тогда как из пяти больных, чьи опухолевые образцы оказались ВПЧ-отрицательными, летальный исход зафиксирован у одного. О различиях в пролиферативном потенциале ВПЧ-положительной и отрицательной меланомы свидетельствуют и результаты предпринятой этими авторами попытки культивировать опухоли *in vitro*: ни из одной вирусотрицательной меланомы получить клеточную культуру не удалось, тогда как клетки 5 из 7 ВПЧ-положительных биопсий в этих условиях успешно размножались. Результаты этих авторов, полученные на ограниченном контингенте больных меланомой, в дальнейшем не верифицировались.

Заключение

Совокупность полученных на сегодня данных позволяет предполагать наличие ассоциации меланомы с

онкогенными вирусами папилломы человека. Вместе с тем небольшие количества изученных в этих работах опухолевых образцов и неоднородность результатов — основание считать данную проблему все еще ждущей окончательного решения. Внимание, уделяемое возможной ассоциации меланомы с онкогенными вирусами папилломы человека, явно недостаточное. Клиническая значимость этой проблемы в условиях роста показателей заболеваемости и смертности от меланомы в России и мире в целом бесспорна. Некоторые объективные трудности, которые встречаются исследователи, работающие в данной области, можно преодолеть, используя комплексный подход, а именно проводя детекцию вирусного начала в образцах меланомы на трех уровнях — вирусной ДНК, мРНК вирусных онкогенов, а также онкобелков папилломавирусов. Вопрос об ассоциации меланомы с вирусами папилломы человека заслуживает дальнейшего изучения.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2012 г. (Заболеваемость и смертность) / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. — М.: МНИИОИ им. П.А. Герцена; 2014. 250 с. [Kaprin AD, Starinskii VV, Petrova GV, editors. *Zlo-kachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2012 g. (Zabolevaemost' i smertnost')*. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena; 2014. 250 p. (In Russ).]
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9–29. doi: 10.3322/caac.21208.
3. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 2005;41(1):45–60. doi: 10.1016/j.ejca.2004.10.016.
4. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 2012;26(11):1131–1155. doi: 10.1101/gad.191999.112.
5. Myriokefalitaki E, Babel B, Smith M, Ahmed AS. Primary malignant melanoma of uterine cervix FIGO IIa1: A case report with 40 months ongoing survival and literature review. *Gynecol Oncol Case Rep.* 2013;5:52–54. doi: 10.1016/j.gynor.2013.04.004.
6. Parada D, Pena KB, Riu F. Coexisting malignant melanoma and blue nevus of the uterine cervix: an unusual combination. *Case Rep Pathol.* 2012;2012:986542. doi: 10.1155/2012/986542.
7. Calderon-Salazar L, Cantu de Leon D, Perez Montiel D, et al. Primary malignant melanoma of the uterine cervix treated with ultraradical surgery: a case report. *ISRN Obstet Gynecol.* 2011;2011:683020. doi: 10.5402/2011/683020.
8. Parara S, de Bree E, Takos D, et al. Melanoma of the vulva: a pigmented lesion is also significant in a non-sun-exposed area. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;280(5):831–834. doi: 10.1007/s00404-009-1011-6.
9. De Simone P, Silipo V, Buccini P, et al. Vulvar melanoma: a report of 10 cases and review of the literature. *Melanoma Res.* 2008;18(2):127–133. doi: 10.1097/CMR.0b013e3282f94636.
10. Dahlgren L, Schedvins K, Kanter-Lewensohn L, et al. Human papilloma virus (HPV) is rarely detected in malignant melanomas of sun sheltered mucosal membranes. *Acta Oncol.* 2005;44(7):694–699. doi: 10.1080/02841860500247461.
11. Bello DM, Smyth E, Perez D, et al. Anal versus rectal melanoma: does site of origin predict outcome? *Dis Colon Rectum.* 2013;56(2):150–157. doi: 10.1097/DCR.0b013e31827901dd.
12. Krishna Prasad L, Srinivasa Chakravarthi P, Naga Neelima Devi K, et al. Malignant melanoma of lingual gingiva with ipsilateral submandibular lymph node metastasis: a case report. *J Maxillofac Oral Surg.* 2009;8(3):287–289. doi: 10.1007/s12663-009-0070-3.
13. Sharma N. Primary oral malignant melanoma: two case reports and review of literature. *Case Rep Dent.* 2012;2012:975358. doi: 10.1155/2012/975358.
14. Ragnarsson-Olding BK. Spatial density of primary malignant melanoma in sun-shielded body sites: A potential guide to melanoma genesis. *Acta Oncol.* 2011;50(3):323–328. doi: 10.3109/0284186X.2010.535846.
15. Vajdic CM, McDonald SP, McCredie MRE, et al. Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA.* 2006;296(23):2823–2831. doi: 10.1001/jama.296.23.2823.
16. Bastiaannet E, Homan-van der Heide JJ, Ploeg RJ, Hoekstra HJ. No increase of melanoma after kidney transplantation in the northern part of The Netherlands. *Melanoma Res.* 2007;17(6):349–353. doi: 10.1097/cmr.0b013e3282f0c880.
17. Сенюта Н.Б., Михайлова И.Н., Токарева З.И., и др. Изучение гуморального иммунного ответа к трансмембранному (ТМ) белку эндогенного ретровируса человека (herv-k) у больных меланомой // *Русский журнал «СПИД, рак и общественное здоровье»*. — 2006. — Т.10. — №2. — С. 33. [Senyuta NB, Mikhailova IN, Tokareva ZI, et al. Izuchenie gumoral'nogo immunnogo otveta k transmembranному (TM) belku endogenного retrovirusа cheloveka (herv-k) u bol'nykh melanomoi. *Russian journal AIDS, cancer, and public health.* 2006;10(2):33. (In Russ).]
18. Albert DM, Shaddock JA, Craft JL, Niederkorn JY. Feline uveal melanoma model induced with feline sarcoma virus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;20(5):606–624.
19. Singh S, Kaye S, Gore ME, et al. The role of human endogenous retroviruses in melanoma. *Br J Dermatol.* 2009;161(6):1225–1231. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09415.x.
20. Henge UR. Role of viruses in the development of squamous cell cancer and melanoma. *Adv Exp Med Biol.* 2008;624:179–186. doi: 10.1007/978-0-387-77574-6_14.
21. Scheurlen W, Gissmann L, Gross G, zur Hausen H. Molecular cloning of two new HPV types (HPV 37 and HPV 38) from a keratoacanthoma and a malignant melanoma. *Int J Cancer.* 1986;37(4):505–510. doi: 10.1002/ijc.2910370406.
22. Hartveit F, Maehle BO. A link between malignant melanoma and cervical intra-epithelial neoplasia? A preliminary report. *Acta Derm Venereol.* 1988;68(2):140–143.

23. Takamiyagi A, Asato T, Nakashima Y, Nonaka S. Association of human papillomavirus type 16 with malignant melanoma. *Am J Dermatopathol.* 1998;20(1):69–73. doi: 10.1097/00000372-199802000-00014.
24. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):690–698. doi: 10.1093/jnci/92.9.690.
25. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses. Lyon; 2007. Vol. 90. 689 p.
26. zur Hausen H. Papillomaviruses – to vaccination and beyond. *Biochemistry (Mosc).* 2008;73(5):498–503. doi: 10.1134/s0006297908050027.
27. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17–27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033.
28. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70–79. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002.
29. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007;121(3):621–632. doi: 10.1002/ijc.22527.
30. Lace MJ, Anson JR, Klusmann JP, et al. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) genomes integrated in head and neck cancers and in HPV-16-immortalized human keratinocyte clones express chimeric virus-cell mRNAs similar to those found in cervical cancers. *J Virol.* 2011;85(4):1645–1654. doi: 10.1128/JVI.02093-10.
31. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol.* 2011;19(1):33–39. doi: 10.1016/j.tim.2010.10.002.
32. White EA, Sowa ME, Tan MJ, et al. Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(5):260–267. doi: 10.1073/pnas.1116776109.
33. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989;243(4893): 934–937. doi: 10.1126/science.2537532.
34. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990;248(4951):76–79. doi: 10.1126/science.2157286.
35. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses. Lyon; 1995. Vol. 64. 6 p.
36. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. Part B. Biological agents. Lyon; 2011. Vol. 100. 502 p.
37. Gillison ML, Shah KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;2003(31):57–65. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003484.
38. Morrison C, Catania F, Wakely P, Jr., Nuovo GJ. Highly differentiated keratinizing squamous cell cancer of the cervix: a rare, locally aggressive tumor not associated with human papillomavirus or squamous intraepithelial lesions. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(10):1310–1315. doi: 10.1097/00000478-200110000-00013.
39. Dreau D, Culberson C, Wyatt S, Holder WD, Jr. Human papilloma virus in melanoma biopsy specimens and its relation to melanoma progression. *Ann Surg.* 2000;231(5):664–671. doi: 10.1097/00000658-200005000-00006.
40. Amani NA, Abani MH, Fata MM. Clinicopathological study of melanoma with reference to its possible viral etiology. *Journal of Pathology Research.* 2014;3(2):63–67.
41. Astori G, Lavergne D, Benton C, et al. Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J Invest Dermatol.* 1998;110(5):752–755. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00191.x.
42. Roussaki-Schulze AV, Kouskoukis C, Rammos C, et al. Identification of human papillomavirus DNA in melanoma biopsy specimens of Greek population. *Int J Clin Pharmacol Res.* 2005;25(3):145–150.
43. La Placa M, Ambretti S, Bonvicini F, et al. Presence of high-risk mucosal human papillomavirus genotypes in primary melanoma and in acquired dysplastic melanocytic naevi. *Br J Dermatol.* 2005;152(5):909–914. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06344.x.
44. Rohwedder A, Philips B, Malfetano J, et al. Vulvar malignant melanoma associated with human papillomavirus DNA: report of two cases and review of literature. *Am J Dermatopathol.* 2002;24(3):230–240. doi: 10.1097/00000372-200206000-00008.
45. Rohwedder A, Slominski A, Wolff M, et al. Epidermodysplasia verruciformis and cutaneous human papillomavirus DNA, but not genital human papillomavirus DNAs, are frequently detected in vulvar and vaginal melanoma. *Am J Dermatopathol.* 2007;29(1):13–17. doi: 10.1097/01.dad.0000245202.59762.09.
46. Ruer JB, Pepin L, Gheit T, et al. Detection of alpha- and beta-human papillomavirus (HPV) in cutaneous melanoma: a matched and controlled study using specific multiplex PCR combined with DNA microarray primer extension. *Exp Dermatol.* 2009;18(10):857–862. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00866.x.
47. Miracco C, Palumbo N, Lavergne D, et al. Malignant melanomas: search for human papillomaviruses. *Arch Dermatol.* 2001;137(6):826–827.
48. Ambretti S, Venturoli S, Mirasoli M, et al. Assessment of the presence of mucosal human papillomaviruses in malignant melanomas using combined fluorescent in situ hybridization and chemiluminescent immunohistochemistry. *Br J Dermatol.* 2007;156(1):38–44. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07541.x.
49. Головина Д.А., Трофимова О.Б., Ермилова В.Д., и др. Комплекс молекулярно-генетических и иммуногистохимических методов для выявления вирусов папиллом человека в раковом эпителии мочевого пузыря // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2014. — Т.157. — №1. — С. 81–84. [Golovina DA, Trofimova OB, Ermilova VD, et al. Complex of molecular genetic and immunohistochemical methods for detection of human papillomavirus in the bladder cancer epithelium. *Bull Exp Biol Med.* 2014;157(1):70-73.] doi: 10.1007/s10517-014-2494-0
50. Le Poole IC, van den Berg FM, van den Wijngaard RM, et al. Generation of a human melanocyte cell line by introduction of HPV16 E6 and E7 genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1997;33(1):42–49. doi: 10.1007/s11626-997-0021-6.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Волгарева Галина Михайловна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, **тел.:** +7 (499) 324-13-35,

e-mail: galina.volgareva@yandex.ru; galina.volgareva@ronc.ru

Михайлова Ирина Николаевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения биотерапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, **тел.:** +7 (499) 324-90-34, **e-mail:** irmikhaylova@gmail.com

Головина Дарья Андреевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник экспресс-лаборатории ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, **e-mail:** dagolovina@pisem.net

Е.Ю. Брыксина¹, В.С. Брыксин², А.В. Почивалов²

¹ Ростовский государственный медицинский университет,
Ростов-на-Дону, Российская Федерация

² Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко,
Воронеж, Российская Федерация

Частота развития, патоморфоз и исходы бронхолегочной дисплазии, ассоциированной с микроаспирацией желудочного содержимого

На сегодняшний день по-прежнему остается малоизученной степень влияния функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся микроаспирацией желудочного содержимого (МАЖС), на частоту развития, особенности течения и исходы бронхолегочной дисплазии (БЛД), что делает актуальным настоящее исследование. **Цель исследования:** определение характера влияния МАЖС на развитие и течение БЛД. **Методы:** обследовано 373 новорожденных ребенка, находившихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ) в неонатальном периоде. В трахеобронхиальном аспирате (ТБА) определялся маркер МАЖС – пепсин, активность которого измерялась по величине экстинкции, с последующим анализом количества случаев и характера течения развившейся БЛД у пациентов на фоне МАЖС и без нее. В процессе катamnестического наблюдения на протяжении трех лет устанавливались исходы БЛД и особенности коморбидной патологии. **Результаты:** выявлено, что у детей с МАЖС частота развития БЛД была выше и нарастала пропорционально увеличению активности пепсина в ТБА и снижению срока гестации. Нарастание значений экстинкции в ТБА сопровождалось увеличением продолжительности ИВЛ и последующей кислородотерапии, а также тяжести течения БЛД. К концу 3 года жизни у 55,2% детей, страдавших БЛД без МАЖС, наступило клиническое выздоровление, тогда как у пациентов с БЛД на фоне МАЖС данный исход имел место только у 0,9%. **Заключение:** МАЖС имеет высокий уровень клинической значимости в этиологии, патогенезе и патоморфозе БЛД, а предложенный метод ранней верификации МАЖС и алгоритм комплексной терапии позволяют снизить ее выраженность и улучшить прогноз неонатальной адаптации.

Ключевые слова: микроаспирация, трахеобронхиальный аспират, экстинкция, пепсин, бронхолегочная дисплазия.

(Для цитирования: Брыксина Е.Ю., Брыксин В.С., Почивалов А.В. Частота развития, патоморфоз и исходы бронхолегочной дисплазии, ассоциированной с микроаспирацией желудочного содержимого. *Вестник РАМН*. 2016;71(2):128–140. doi: 10.15690/vramn613)

E.Y. Bryksina¹, V.S. Bryksin², A.V. Pochivalov³

¹ Rostov state medical university of Ministry of Health of the Russian Federation,
Rostov-on-Don, Russian Federation

² Voronezh state medical university of N.N. Burdenko, of Ministry of Health of the Russian Federation,
Voronezh, Russian Federation

Incidence, pathomorphism and outcomes of the bronchopulmonary dysplasia associated with microaspiration of gastric contents

Today the influence of the digestive tract functional violations followed by microaspiration of gastric contents (MAGC) on the incidence, features and outcomes of bronchopulmonary dysplasia (BPD) remains little studied. Focusing on this aspect makes the research actual. **Objective:** determination of the nature of influence of MAGC on the progress and course of BPD. **Methods:** 373 newborns exposed to artificial pulmonary ventilation (APV) in the neonatal period were examined. In a tracheobronchial aspirate (TBA) the marker of MAGC – pepsin – was determined. Its activity was measured by extinction value with subsequent analysis of the incidence and nature of the course of bronchopulmonary dysplasia (BPD) in patients against MAGC and without it. During the three years follow-up period outcomes of BPD and features of combined pathology were established. **Results:** it was revealed that in children suffered from MAGC the incidence of BPD was higher and grew in proportion to the increase of pepsin activity in TBA and the reduction of gestational age. The extinction increase in TBA values was followed by the increase in duration of APV and the subsequent oxygen therapy, and also the severity of BPD clinical course. By the end of 3 years clinical recovery was detected in 55,2% of children suffering from BPD without MAGC whereas in patients with BPD against MAGC this outcome occurred only in 0,9% of cases. **Conclusion:** MAGC is clinically significant for the etiology, pathogenesis and pathomorphism of BPD. The proposed method of early detection of MAGC and algorithm of complex therapy can reduce its severity and improve the forecast accuracy of neonatal adaptation.

Key words: microaspiration, tracheobronchial aspirate, extinction, pepsin, bronchopulmonary dysplasia.

(For citation: Bryksina EY, Bryksin VS, Pochivalov AV. Development Frequency, Pathomorphism and Outcomes of the Bronchopulmonary Dysplasia Associated with Microaspiration of Gastric Contents. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(2):128–140. doi: 10.15690/vramn613)

Обоснование

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) занимает особое место в структуре заболеваемости детей раннего возраста. Хронический характер течения БЛД приводит к трансформации данной нозологической формы в повторные эпизоды обструктивного бронхита (J.20), хронический бронхит (J.41), бронхиальную астму (J.45), а соответственно, к снижению качества жизни и инвалидизации в дальнейшем. Согласно данным ряда исследователей, у 16–20% детей, страдающих БЛД, сохраняются патологические изменения со стороны легких в первые 1–4 года жизни, а у 4% детей течение БЛД приводит к инвалидности [1–4].

В настоящее время заслуженно мало внимания уделяется изучению взаимосвязи микроаспирации желудочного содержимого (МАЗС) на фоне функциональных нарушений гастроинтестинальной системы и БЛД. В современной литературе гастроэзофагеальная регургитация рассматривается как физиологическое явление у большинства новорожденных детей [5], однако существует ряд патологических состояний, при которых регургитация желудочного содержимого систематически происходит выше дистального отдела пищевода с последующей аспирацией. В настоящее время нет четких, объективных, универсальных критериев дифференциальной диагностики между гастроэзофагеальной регургитацией с МАЗС и физиологической младенческой регургитацией, применимых у детей различного гестационного возраста. Это, в частности, обусловлено диагностическими трудностями, связанными с невозможностью практического применения стандартных методов верификации гастроэзофагеальной регургитации у детей, рожденных с массой тела менее 1500 г, а также наличием несоответствия данным эндоскопического исследования пищевода показателям 24-часовой рН-метрии [6, 7]. Как следствие, имеет место назначение терапии, несоответствующей истинной тяжести состояния, что приводит к хронической гастроэзофагеальной регургитации с МАЗС, протеолитическим повреждением с последующим легочным фиброзом, снижению качества жизни, а в ряде случаев к инвалидности.

Выделение пепсина в трахеобронхиальном аспирате (ТБА) является объективным маркером МАЗС на фоне патологической гастроэзофагеальной регургитации. Пепсин является протеолитическим ферментом в активной форме и может оказывать непосредственное повреждающее действие на легкие при МАЗС. Гематогенный механизм проникновения пепсина в бронхолегочную систему исключен в связи с отсутствием его циркуляции в плазме крови. Неактивные предшественники пепсина — пепсиногены I и II, учитывая возможность их циркуляции в кровяном русле, могут выделяться в биологических жидкостях, в том числе в ТБА, но диагностического значения не имеют, поскольку не обладают протеолитическим действием и не могут преобразоваться в пепсин без участия соляной кислоты, а последняя может оказаться в трахеобронхиальном дереве только в результате аспирации желудочного содержимого [8, 9].

Микроаспирация желудочного содержимого у новорожденных детей, находящихся на искусственной вентиляции легких, связанная с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта центрального, периферического гипоксического и инфекционного генеза [10], усугубляет повреждение легких гипероксией, баро- и волюмовоздействием, а также течением инфекционного процесса [11–13]. Кислое желудочное содержимое, протеолитические ферменты вызывают воспа-

лительную реакцию в дыхательных путях с повышением содержания интерлейкина 8, полиморфноядерных лейкоцитов, выходом и дегрануляцией нейтрофилов, а также оказывают непосредственное повреждающее действие на слизистую оболочку дыхательных путей. Повышается проницаемость сосудов микроциркуляторного русла легких с развитием некардиогенного интерстициального или альвеолярного отека легких [9, 12, 14].

Несмотря на значительные достижения современной медицины в изучении этиологии, патогенеза, диагностики, лечения и профилактики БЛД, ряд проблем требует более детального анализа:

- недостаточно изучена степень влияния функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта на частоту развития, особенности течения и исходов БЛД;
- нет четкого, универсального алгоритма диагностики и лечебной тактики у детей с БЛД, развившейся на фоне МАЗС;
- отсутствуют универсальные методы ранней верификации гастроэзофагеальной регургитации с МАЗС, применимые у новорожденных вне зависимости от гестационного возраста, массы тела и клинического статуса;
- нет четких алгоритмов ранней коррекции МАЗС у детей в неонатальном периоде, и показаний к проведению антирефлюксной позиционной и диетологической терапии у новорожденных;
- в ситуации, когда медикаментозная и/или диетологическая коррекция функциональных нарушений верхних отделов желудочно-кишечного тракта все же имеет место, выбор терапевтических мероприятий субъективен;
- недостаточно изучено влияние терапии метилксантинами на выраженность функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта и МАЗС.

Цель работы: определение характера влияния микроаспирации желудочного содержимого на развитие и течение бронхолегочной дисплазии.

Методы

Дизайн исследования

Проведено квазирандомизированное контролируемое исследование.

Критерии соответствия

Критерии включения в исследование: новорожденные дети, находящиеся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ). Критерии исключения из исследования: наличие врожденных пороков развития, положительный неонатальный скрининг на муковисцидоз, гемодинамически значимый открытый артериальный проток (проведение оперативной коррекции), некротический энтероколит IВ, III стадий.

Условия исследования

Исследование проведено на базе Воронежской областной детской клинической больницы № 1 (ВОДКБ № 1), Центральной научно-исследовательской лаборатории Воронежского государственного медицинского университета имени Н.Н. Бурденко.

Продолжительность исследования

Исследование проводилось с января 2009 по декабрь 2014 г.

Исходы исследования

Основной исход исследования — определение степени влияния МАЖС на частоту развития и особенности течения БЛД. Дополнительный исход исследования — применение антирефлюксных мероприятий, ограничение суточной дозы применяемого метилксантина позволяют снизить выраженность МАЖС и частоту развития БЛД.

Анализ в подгруппах

В зависимости от степени выраженности МАЖС дети в неонатальном периоде были разделены на 4 группы.

Первую группу составили 44 ребенка (11,8%) с экстинкцией в ТБА от 0,3 до 0,8, что свидетельствовало о легкой степени МАЖС. В данную группу вошел 21 ребенок, рожденный преждевременно (подгруппа 1А) в 35–37 нед, и 23 доношенных ребенка (подгруппа 1В).

Вторая группа была представлена 185 детьми (49,6%) с экстинкцией в ТБА от 0,8 до 1,2 — средняя степень МАЖС. Дети второй группы подразделялись на 108 недоношенных (подгруппа 2А) со сроками гестации при рождении 29–31 нед (52 ребенка), 32–34 нед (56 детей) и 77 доношенных детей (подгруппа 2В).

Третья группа включала 47 младенцев (12,6%), родившихся преждевременно со сроком гестации менее 29 нед, имеющих выраженную гастроэзофагеальную регургитацию с высокой степенью активности пепсина в ТБА и экстинкцией от 1,2 до 1,7.

Группу сравнения составили дети с минимальными значениями экстинкции в ТБА — менее 0,3, являющиеся диагностически и прогностически незначимыми — 97 детей (26,0%). Из них 19 (подгруппа А) были рождены преждевременно в сроке гестации менее 29 нед, 31 (подгруппа В) с гестационным возрастом 29–34 нед, 22 (подгруппа С) с гестационным возрастом 35–37 нед и 25 (подгруппа D) были доношенными.

Дизайн проведенного исследования представлен на рис. 1.

Методы регистрации исходов

Верификация МАЖС проводилась посредством применения разработанного способа выделения пепсина в ТБА (патент № 2480753). Выделение пепсина осуществлялось методом гель-фильтрации на сефадексах, а активность фермента определяли по Ансону и Мирскому в модификации М.П. Черникова по величине экстинкции (десятичный логарифм отношения интенсивности световых потоков до и после прохождения ими светопоглощающего слоя, прямо пропорциональна активности пепсина) — унифицированный метод, основанный на способности пепсина расщеплять белковую молекулу гемоглобина с освобождением тирозина и триптофана, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой.

ТБА собирали через интубационную трубку в ходе санации верхних дыхательных путей новорожденного через 2 ч после кормления. В эндотрахеальную трубку вводили теплый (33–35°C) физиологический раствор из расчета

130

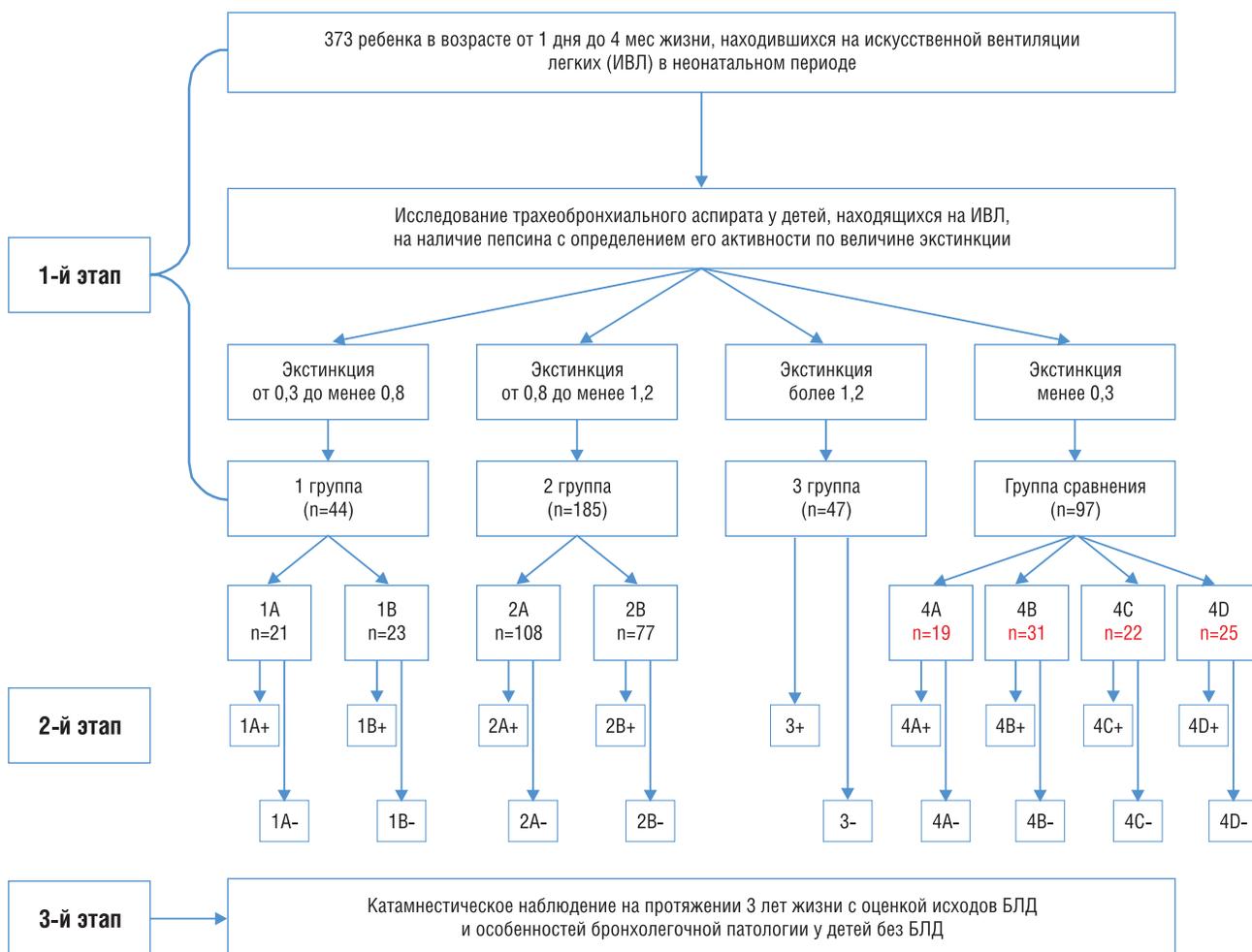


Рис. 1. Дизайн клинического исследования особенностей течения бронхолегочной дисплазии (БЛД) у детей с микроаспирацией желудочного содержимого.

Примечание. 1А, 2А, 4А, 4В, 4С — недоношенные дети; 1В, 2В, 4D — доношенные дети; 1А+, 1В+, 2А+, 2В+, 3+, 4А+, 4В+, 4С+, 4D+ — дети с БЛД; 1А-, 1В-, 2А-, 2В-, 3-, 4А-, 4В-, 4С-, 4D- — дети без БЛД.

0,5 мл/кг веса ребенка. Затем аспирировали трахеобронхиальное содержимое с помощью гибкого аспирационного катетера соответствующего номера в пластиковый стерильный контейнер. Сбор ТБА проводился только у детей, находящихся на ИВЛ. У длительно вентилирующихся детей активность пепсина в ТБА определялась в динамике. В целом, процедура сбора ТБА проходила в первый месяц жизни на 1, 3, 10, 14, 21-й дни от момента госпитализации, в зависимости от продолжительности ИВЛ. Средний возраст детей, соответствовавший вышеуказанным дням сбора ТБА, приведен в табл. 1.

Для выделения пепсина использовали сефадекс G-50 suprefine производства фирмы Pharmacia (Швеция). Колонку объемом 20 мл заполняли сефадексом и уравнивали 0,9% раствором хлорида натрия. Калибровку хроматографической колонки проводили витамином В12 (молекулярная масса 1260 Дальтон, Да), инсулином (молекулярная масса 5700 Да) и тиреотропным гормоном (молекулярная масса 28 000 Да). По результатам строили калибровочный график зависимости объема выхода вещества из колонки к общему объему колонки (V_e/V_o). Согласно полученным данным рассчитывали молекулярную массу вышедшего из колонки вещества.

Исследование проводилось с помощью спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Санкт-Петербург). Экстинкцию, прямо пропорциональную активности пепсина, определяли при длине волны 280 нм. Аспират в количестве 1 мл вносили в колонку и проводили элюцию 0,9% раствором хлорида натрия. Собирали фракции по 1 мл. В настоящем исследовании изучали фракции с объемом выхода от 0,2 до 1,5 V_e/V_o . Активность пепсина была обнаружена во фракциях с объемом выхода от 0,5 до 0,7 V_e/V_o , что соответствовало молекулярной массе фермента, варьирующей в пределах 34 000–35 000 Да. Полученные экстинкции варьировали в пределах 0,196–2,361. Нашими исследованиями установлено, что диагностически значимой, свидетельствующей о наличии МАЖС является экстинкция выше 0,3. Значения экстинкции менее 0,3 были обусловлены присутствием в ТБА белковых веществ с более низкой молекулярной массой и являлись фоновыми.

Верификация патологической гастроэзофагеальной регургитации у детей первых месяцев жизни осуществлялась клинически, на основании критериев Римского III Консенсуса, 2006, при наличии более двух эпизодов регургитации в сутки, которые возникали через час и позднее после кормления и носили обильный характер [5]. Дополнительным методом диагностики гастроэзофагеальной и дуоденогастральной регургитации являлось ультразвуковое исследование кардиального и пилорического отделов желудка.

Ультразвуковое исследование желудка проводилось аппаратом Voluson 730 (General Electrics, США) с использованием датчиков с частотой 3,5–5,5 МГц. Ультразвуковое исследование желудка проводилось до кормления, во время кормления и через 2 ч после кормления. Ультразвуковые критерии гастроэзофагеальной регургитации

Таблица 1. Средний возраст детей 1-й группы, соответствующий дням сбора трахеобронхиального аспирата (ТБА)

Дни сбора ТБА	Дни жизни
1-й	2–4
3-й	4–6
10-й	11–13
14-й	15–17
21-й	22–24

включали увеличение просвета кардиального сфинктера, затекание пищи из желудка в пищевод. Визуализировался канал пищевода в виде тубулярной структуры, ограниченной гиперэхогенными линейными сигналами (стенками). Ширина канала обычно не превышала 4 мм (1–3 мм). В ряде случаев отмечалась замедленная эвакуация содержимого из желудка. Ультразвуковым критерием дуоденогастральной регургитации являлся ретроградный ток содержимого из двенадцатиперстной кишки в желудок в виде струи с гиперэхогенными включениями.

Критерии постановки диагнозов

Диагноз БЛД устанавливался на основании клинических и рентгенологических критериев. Клинические критерии включали ИВЛ на первой неделе жизни и/или респираторную терапию с постоянным положительным давлением в дыхательных путях через носовые катетеры (Nose Continuous Positive Airway Pressure, NCPAP); терапию кислородом более 21% в возрасте 28 дней и старше (кислородозависимость); дыхательную недостаточность, бронхообструктивный синдром в возрасте 28 дней и старше; зависимость от кислорода, развивающуюся при проведении кислородотерапии (ИВЛ, NCPAP). Рентгенологические критерии включали интерстициальный отек, чередующийся с участками повышенной прозрачности легочной ткани, фиброз, лентообразные уплотнения.

Диагноз классической формы БЛД недоношенных устанавливался преждевременно рожденным детям с респираторным дистресс-синдромом новорожденных (РДСН), получавшим респираторную терапию с «жесткими» режимами ИВЛ ($FiO_2 > 40\%$, PIP). Рентгенологически у данной группы пациентов выявлялись буллы, гиперинфляция, пневмофиброз.

Диагноз новой формы БЛД недоношенных устанавливался детям с гестационным возрастом <32 нед, получавшим сурфактантную заместительную терапию и находившимся на ИВЛ с шадящими параметрами вентиляции. На рентгенограмме грудной клетки присутствовало гомогенное затемнение грудной клетки без гиперинфляции, фиброза или с минимальной степенью их выраженности. В основе данной формы БЛД лежит не фиброз с воспалением, а задержка/приостановление развития капиллярной сети легких и альвеол, что ведет к редукции капиллярного кровотока в легких и уменьшению количества альвеол [1].

Диагноз БЛД доношенных устанавливался доношенным детям.

Тяжесть течения БЛД определялась согласно анамнестическим критериям, на этапе катамнестического наблюдения степень тяжести БЛД пересматривалась ежегодно и оценивалась на основании клинических критериев [15].

Диагноз обострения БЛД на этапе катамнестического наблюдения устанавливался при ухудшении состояния больного, что проявлялось усилением симптомов бронхиальной обструкции, развитием острой дыхательной недостаточности, у тяжелых больных — на фоне хронической, как правило, при присоединении острого респираторного заболевания. Отмечалось снижение $SatO_2$, ухудшение рентгенологических данных (при сопоставлении с предшествующими рентгенограммами). Показаниями к рентгенологическому исследованию органов грудной клетки являлись подозрение на пневмонию, подозрение на наличие осложнений (ателектаз, пневмоторакс, острый РДС), неэффективность терапии при обострении БЛД.

Диагнозы исходов БЛД устанавливались в соответствии с новой отечественной рабочей Классификацией

бронхолегочных заболеваний у детей (2009) [15], а также Международными рекомендациями по бронхиальной астме у детей PRACTALL (Practical Allergology) Pediatric Asthma Group [16].

Критерии диагнозов перинатальных поражений центральной нервной системы в неонатальном периоде и их исходов к концу скорректированного первого года жизни, а также критерии диагноза ретинопатии недоношенных соответствовали классификации, утвержденной Российской ассоциацией специалистов перинатальной медицины.

На амбулаторном этапе в целях определения характера исходов БЛД и постановки диагноза бронхиальной астмы с верификацией бронхообструктивного синдрома и бронхиальной гиперреактивности проводилась бронхофонография с применением прибора бронхофонографического, диагностического, автоматизированного «ПАТТЕРН-01» (Москва), который совместно с персональной электронно-вычислительной машиной обеспечивает регистрацию звуковых колебаний в частотном диапазоне 200–12 600 Гц временного развития дыхательного цикла при различных нозологических формах. Регистрировались показатели акустической работы дыхания в низко-, средне- и высокочастотном диапазоне. Критерием нарушения проходимости на уровне верхних дыхательных путей являлось увеличение акустической работы дыхания в низкочастотном диапазоне. Нарушение проходимости в нижних дыхательных путях регистрировалось при увеличении акустической работы дыхания в средне- и высокочастотном диапазоне [17].

Этическая экспертиза

Исследование было одобрено независимым этическим комитетом Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко. У всех родителей или официальных опекунов обследованных детей было получено добровольное информированное согласие на проведение диагностических и лечебных манипуляций, а также использование полученных клинических и анамнестических данных в целях проведения исследования.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился при помощи пакета программ Statistica 7.0. Статистически достоверными считались различия между сравниваемыми показателями при $p < 0,05$. Форма распределения изучаемых данных определялась с помощью критерия нормальности Колмогорова–Смирнова. Измерение зависимости переменных осуществлялось посредством линейной корреляции Пирсона (r). Для выявления различия между средними двух независимых нормально распределенных выборок использовался t -критерий Стьюдента. В случае когда две сравниваемые группы, основанные на одной и той же совокупности наблюдений, тестировались дважды (зависимые выборки), применялся t -критерий для зависимых выборок с исключением той части внутригрупповой вариации (дисперсии), которая обусловлена индивидуальными различиями субъектов.

С целью выявления структуры взаимосвязи между переменными был проведен факторный анализ. Выделение наиболее значимых факторов осуществлялось на основании критерия каменистой осыпи (критерий Кэттеля) с определением участка на графике, характеризующегося максимальным замедлением убывания собственных значений (дисперсий, выделяемых факторами) слева направо. Предполагалось, что справа от этого участка находилась только «факториальная осыпь». Вычислялись корреляции между переменными и факторами — факторные нагрузки, на основании которых строились диаграммы рассеяния.

Результаты

Участники исследования

В исследование было включено 373 ребенка: 238 мальчиков и 135 девочек в возрасте от 1 дня до 4 мес жизни, находившихся на ИВЛ в неонатальном периоде. В нозологическую структуру раннего неонатального периода у включенных в исследование детей входили РДСН (Р.22), врожденная пневмония (Р.23), меконияльная аспирация (Р.24), бактериальный сепсис новорожденного (Р.36), внутриутробная инфекция неуточненной этиологии (Р.39), маловесность для гестационного возраста (Р.05), недоношенность (Р.07). В исследуемой совокупности детей МАЖС была выявлена в 74,0% случаев. Определялась частота развития БЛД у исследуемой категории пациентов в зависимости от выраженности МАЖС с последующим катамнестическим наблюдением пациентов, сформировавших БЛД в течение 3 лет.

Первый этап выхаживания проходил в отделении детской реанимации и интенсивной терапии ВОДКБ № 1. На втором этапе дети находились в отделении патологии недоношенных № 4 и отделении патологии новорожденных № 3 ВОДКБ № 1. Катамнестическое наблюдение на третьем этапе осуществлялось консультативно на базе отделения консультативной поликлиники ВОДКБ № 1. При обострениях БЛД, требовавших стационарного лечения, дети госпитализировались в отделение патологии раннего детского возраста ВОДКБ № 1.

Основные результаты исследования

Активность пепсина в ТБА нарастала по мере снижения гестационного возраста на момент рождения с максимальными показателями у детей, рожденных в сроке гестации менее 29 нед (экстинкция 1,2–1,7).

В подгруппах 1А, 1В и 2В отмечено волнообразное изменение активности пепсина в ТБА с нарастанием значений экстинкции, а следовательно, и выраженности микроаспирации к 12–17-му дню жизни с последующим снижением к 22–24-му дню жизни. В подгруппе 2А и 3 группе МАЖС имела прогрессирующий характер с максимальными значениями экстинкции к 22–24-му дню жизни (табл. 2).

Таблица 2. Динамика значений экстинкции у пациентов с микроаспирацией желудочного содержимого в неонатальном периоде

Подгруппы	Дни жизни				
	2–4	4–6	11–13	15–17	22–24
1А (n=21)	0,394±0,027	0,419±0,015	0,539±0,024	0,516±0,014	0,431±0,015
1В (n=23)	0,325±0,018	0,361±0,012	0,483±0,031	0,451±0,011	0,427±0,009
2А (n=108)	0,931±0,044	0,985±0,014	1,036±0,028	1,117±0,015	1,133±0,012
2В (n=77)	0,852±0,027	0,893±0,016	0,932±0,012	0,995±0,028	0,942±0,007
3-я группа (n=47)	1,263±0,027	1,275±0,031	1,517±0,046	1,592±0,018	1,647±0,022

Особенности функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта и взаимосвязь с церебральной ишемией, внутрижелудочковыми кровоизлияниями, перивентрикулярной лейкомаляцией

Наше исследование показало, что у всех обследованных детей с характерными выраженными нарушениями процессов постнатальной адаптации, получавших респираторную поддержку, имели место дисфункции желудочно-кишечного тракта, развившиеся в ранний неонатальный период, сохраняющиеся на протяжении первых месяцев жизни и представленные гастроэзофагеальной, дуоденогастральной регургитацией, дискинезией желудочно-кишечного тракта по гипо- или гипермоторному типу, парезом кишечника, запором. Распределение функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта по группам за период наблюдения на 1-м и 2-м этапах выхаживания представлено в табл. 3.

Проведенный корреляционный анализ выявил наличие взаимосвязи различной степени выраженности между

характером функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта и неврологической семиотикой в исследуемой совокупности детей. Выявлена сильная прямая корреляция моторно-эвакуаторных дисфункций верхних отделов желудочно-кишечного тракта и церебральной ишемии. В целом, имело место нарастание интенсивности взаимосвязи церебральной ишемии, внутрижелудочковых кровоизлияний, перивентрикулярной лейкомаляции и дисфункций желудочно-кишечного тракта по мере снижения гестационного возраста, что обусловлено увеличением тяжести гипоксического, ишемического, геморрагического поражения центральной нервной системы с более выраженной дисрегуляцией функциональной активности гастроинтестинального тракта (табл. 4–6).

Частота, тяжесть и структура БЛД

Из 276 детей с МАЖС (основных 1, 2 и 3-й групп) 115 (41,7%) страдали БЛД, тогда как из 97 детей группы сравнения только 29 пациентов (29,9%) имели данную патологию.

Таблица 3. Функциональные нарушения гастроинтестинальной системы у исследуемых групп детей

Функциональные нарушения	1 группа (n=44)		2 группа (n=185)		3 группа (n=47)	Группа сравнения (n=97)
	Подгруппа 1А (n=21)	Подгруппа 1В (n=23)	Подгруппа 2А (n=108)	Подгруппа 2В (n=77)		
	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)
Гастроэзофагеальная регургитация	21 (100,0)	23 (100,0)	77 (100,0)	108 (100,0)	47 (100,0)	51 (49,5)
Дуоденогастральная регургитация	4 (19,0)	2 (8,7)	8 (10,4)	42 (38,9)	32 (68,1)	20 (19,4)
Снижение перистальтической активности кишечника	7 (33,3)	5 (21,7)	24 (31,2)	74 (68,5)	43 (91,5)	47 (45,6)
Повышение перистальтической активности кишечника	5 (23,8)	8 (34,8)	18 (23,4)	20 (18,5)	4 (8,5)	22 (21,3)
Запор	18 (85,7)	9 (39,1)	32 (41,6)	93 (86,1)	41 (87,2)	63 (61,1)

Таблица 4. Корреляция функциональных нарушений гастроинтестинального тракта и церебральной ишемии в исследуемой совокупности детей

Функциональные нарушения	1 группа (n=44)		2 группа (n=185)		3 группа (n=44), p<0,002	Группа сравнения (n=97), p<0,004
	1А (n=21), p<0,0028	1В (n=23), p<0,003	2 А (n=108), p<0,002	2В (n=77), p<0,005		
Гастроэзофагеальная регургитация	r=0,61	r=0,63	r=0,69	r=0,67	r=0,70	r=0,54
Дуоденогастральная регургитация	r=0,58	r=0,57	r=0,64	r=0,61	r=0,68	r=0,51
Снижение перистальтической активности кишечника	r=0,59	r=0,61	r=0,68	r=0,64	r=0,69	r=0,62
Запор	r=0,60	r=0,50	r=0,63	r=0,55	r=0,70	r=0,59

Таблица 5. Корреляция функциональных нарушений гастроинтестинального тракта и внутрижелудочковых кровоизлияний в исследуемой совокупности детей

Функциональные нарушения	1 группа (n=44)	2 группа (n=185)	3 группа (n=44), p<0,002	Группа сравнения (n=97), p<0,004
	1А (n=21), p<0,0028	2 А (n=108), p<0,002		
Гастроэзофагеальная регургитация	r=0,49	r=0,51	r=0,59	r=0,52
Дуоденогастральная регургитация	r=0,48	r=0,50	r=0,52	r=0,45
Снижение перистальтической активности кишечника	r=0,25	r=0,31	r=0,39	r=0,32
Запор	r=0,23	r=0,24	r=0,36	r=0,25

Таблица 6. Корреляция функциональных нарушений гастроинтестинального тракта и перивентрикулярной лейкомаляции в исследуемой совокупности детей

Функциональные нарушения	2 группа (n=185)	3 группа (n=44), $p<0,002$	Группа сравнения (n=97), $p<0,004$
	2 А (n=108), $p<0,002$		
Гастроэзофагеальная регургитация	$r=0,33$	$r=0,59$	$r=0,42$
Дуоденогастральная регургитация	$r=0,29$	$r=0,52$	$r=0,39$
Снижение перистальтической активности кишечника	$r=0,32$	$r=0,39$	$r=0,39$
Запор	$r=0,31$	$r=0,36$	$r=0,33$



Рис. 2. Сравнительная характеристика количества случаев и тяжести течения бронхолегочной дисплазии (БЛД) на фоне микроаспирации желудочного содержимого и без нее.

У детей любого гестационного возраста с МАЖС частота развития БЛД статистически значимо превышала соответствующие показатели в группе сравнения ($p=0,004$) и нарастала по мере снижения срока гестации ($p=0,00026$). При нарастании выраженности МАЖС и снижении гестационного возраста отмечено увеличение количества случаев среднетяжелого ($p=0,003$) и тяжелого ($p=0,007$) течения БЛД.

Отмечено, что у детей, рожденных в одинаковые сроки гестации, но с различными значениями экстинкции в ТБА, более тяжелое течение БЛД имело место при большей активности пепсина ($p=0,0035$) (рис. 2).

Нарастание значений экстинкции (активности пепсина) в ТБА сопровождалось увеличением продолжительности ИВЛ ($p=0,0028$) и последующей кислородотерапии ($p=0,00047$), а также тяжести течения БЛД (табл. 7).

Сравнительный анализ структуры БЛД выявил нарастание доли классической БЛД недоношенных и БЛД доношенных у детей с МАЖС. Следует отметить, что из 8,7% доношенных детей, страдающих БЛД в основных группах исследования, 5,8% имели мекониальную аспирацию (доношенные дети, страдающие БЛД в группе сравнения, имели мекониальную аспирацию во всех случаях). Отмечено, что глубоконедоношенные дети с МАЖС развивали

новую форму БЛД в достоверно ($p<0,05$) меньшем количестве случаев в сравнении с пациентами аналогичного гестационного возраста без МАЖС (рис. 3).

Особенности рентгенологической семиотики, течения и исходов БЛД

Как показал сравнительный анализ обзорных рентгенограмм органов грудной клетки, БЛД у детей с МАЖС характеризовалась более выраженными интерстициальными изменениями — фиброзом, кадиомегалией и тимо-мегалией (табл. 8).

Легочный фиброз, изменения артерий малого круга кровообращения, включающие гипертрофию гладкомышечной оболочки артериальной стенки, распространение миоцитов в дистальные отделы сосудов, пролиферацию интимы, сопровождающиеся уменьшением емкости сосудистого русла легких, приводили к развитию легочной гипертензии, косвенные признаки которой имели место у большинства детей с БЛД доношенных и классической БЛД недоношенных на фоне МАЖС.

Течение БЛД имело регрессирующий характер во всех группах с более выраженным угасанием патологического

Таблица 7. Зависимость длительности искусственной вентиляции легких (ИВЛ) и последующей кислородотерапии от уровня экстинкции в исследуемой совокупности детей с бронхолегочной дисплазией (БЛД) на фоне микроаспирации желудочного содержимого (оценка в контексте тяжести течения развившейся БЛД)

Показатель	Легкое течение БЛД (n=32)	Среднетяжелое течение БЛД (n=69)	Тяжелое течение БЛД (n=14)
	Экстинкция (M±n) 0,712±0,385	Экстинкция (M±n) 1,014±0,403	Экстинкция (M±n) 1,492±0,237
Продолжительность ИВЛ, дни (M±n)	19,62±7,35	29,41±9,17	40,26±11,53
Продолжительность последующей кислородотерапии, дни (M±n)	39,26±12,41	65,38±11,64	94,26±12,57

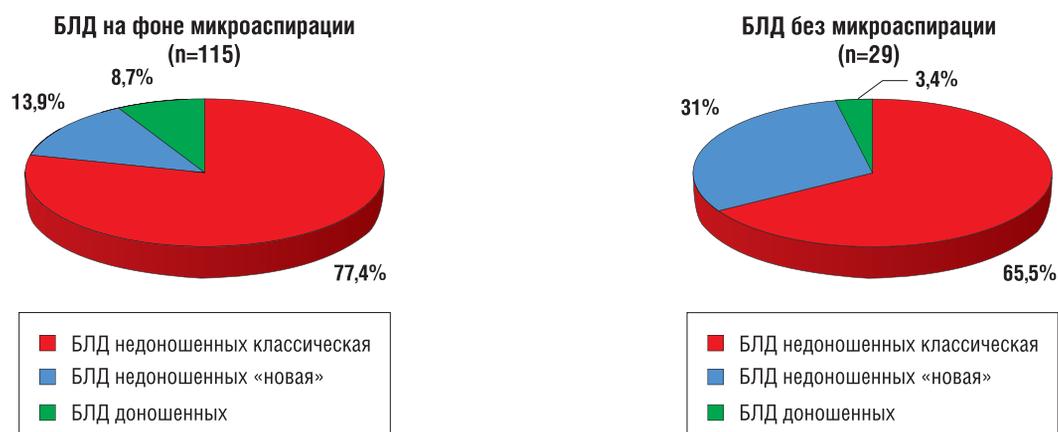


Рис. 3. Структура бронхолегочной дисплазии (БЛД)

Примечание. Различия между показателями основных групп и группы сравнения достоверны ($p < 0,005$).

Таблица 8. Сравнительная рентгенологическая семиотика бронхолегочной дисплазии (БЛД) у детей с/без микроаспирации желудочного содержимого (МАЖС)

Изменения на рентгенограмме	БЛД на фоне МАЖС (n=115)			БЛД без МАЖС (n=29)		
	Классическая БЛД недоношенных (n=80)	Новая БЛД недоношенных (n=16)	БЛД доношенных (n=10)	БЛД доношенных (n=1)	Классическая БЛД недоношенных (n=19)	Новая БЛД недоношенных (n=9)
	Абс.(%)	Абс.(%)	Абс.(%)	Абс.(%)	Абс.(%)	Абс.(%)
Интерстициальные изменения	69 (86,3)	0	10 (100)	1 (100)	12 (63,2)	0
Гиперинфляция	64 (80,0)	16 (100)	10 (100)	1 (100)	5 (26,3)	5 (55,6)
Участки повышенной прозрачности	78 (97,5)	16 (100)	10 (100)	1 (100)	5 (26,3)	8 (88,9)
Буллы	9 (11,3)	0	1 (10,0)	0	0	0
Фокусы пневмофиброза:						
локальные	47 (58,8)	0	8 (80,0)	0	5 (26,3)	0
диффузные	12 (15,0)	0	2 (20,0)	0	0	0
Транспульмональные тяжи	32 (40)	0	5 (50,0)	0	0	0
Ателектазы	33 (41,3)	1 (6,3)	5 (50,0)	0	2 (10,5)	0
Обеднение сосудистого рисунка на периферии легочных полей	60 (75,0)	2 (12,5)	10 (100)	0	3 (15,8)	0
Расширение корней легких	64 (80,0)	0	10 (100)	1 (100)	2 (10,5)	0
Кардиомегалия	26 (32,5)	0	3 (30,0)	0	2 (10,5)	0
Тимомегалия	35 (43,8)	6 (37,5)	4 (40,0)	0	4 (21,1)	1 (11,1)
Плевральный выпот	5 (6,3)	0	2 (20,0)	0	0	0

135

Таблица 9. Возрастные особенности характера течения бронхолегочной дисплазии (БЛД) в исследуемой совокупности детей

Характер течения БЛД	БЛД на фоне МАЖС (n=115)			БЛД без МАЖС (n=29)		
	0–1 год	1–2 года	2–3 года	0–1 год	1–2 года	2–3 года
Количество обострений, М±n	5,1±1,9	4,0±2,1	2,9±1,3	3,9±1,1	2,7±1,3	1,2±0,4
Количество госпитализаций, М±n	4,8±1,1	3,1±1,4	2,9±1,3	2,9±1,3	1,8±0,7	1,2±0,4

Примечание. МАЖС — микроаспирация желудочного содержимого.

Таблица 10. Возрастная динамика тяжести течения бронхолегочной дисплазии (БЛД) в исследуемой совокупности детей

Характер течения БЛД	БЛД на фоне МАЖС (n=115)			БЛД без МАЖС (n=29)		
	0–1 год	1–2 года	2–3 года	0–1 год	1–2 года	2–3 года
Легкое, %	11,6	25,0	35,9	21,7	27,8	29,9
Среднетяжелое, %	25,0	13,4	5,4	8,3	2,1	-
Тяжелое, %	5,1	3,3	0,4	-	-	-

Примечание. МАЖС — микроаспирация желудочного содержимого.

Таблица 11. Распределение тяжести течения бронхолегочной дисплазии (БЛД) в зависимости от наличия или отсутствия цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса простого герпеса (ВПГ) у детей с микроаспирацией желудочного содержимого

Степень тяжести БЛД	ЦМВ (абс.)	ВПГ (абс.)	
		0	1
Легкая	0*	10	12
Среднетяжелая		19	14
Тяжелая		1	3
Легкая	1*	14	17
Среднетяжелая		29	15
Тяжелая		1	9

Примечание. * — отсутствие признака (0), наличие признака (1).

процесса и статистически значимым преобладанием количества случаев клинического выздоровления в группе сравнения (табл. 9, 10).

Изучение характера тяжести течения БЛД в аспекте взаимосвязи с наличием или отсутствием инфекции, вызванной цитомегаловирусом (ЦМВ) и вирусом простого герпеса (ВПГ), а также их сочетанием, выявило достоверно ($p < 0,05$) большее количество случаев тяжелого течения БЛД при сочетании ЦМВ и ВПГ (табл. 11).

Катамнестическое наблюдение на протяжении первых 3 лет жизни установило, что в группе детей с МАЖС такие исходы БЛД, как бронхиальная астма, повторные эпизоды обструктивного бронхита, хронический бронхит, локальный пневмофиброз, имели место в 27,8; 31,3; 13,9; 48,7% случаев, соответственно; клиническое выздоровление отмечено у 0,9% пациентов. В группе сравнения распределение исходов БЛД было обратным, и у основного количества пациентов (55,2%) к концу 3-го года жизни было отмечено клиническое выздоровление; бронхиальная астма, повторные эпизоды обструктивного бронхита, локальный пневмофиброз встречались в достоверно ($p < 0,005$) меньшем проценте случаев — 17,2; 24,1; 10,3%, соответственно; ни один из пациентов не имел хронического бронхита.

Особенности исходов БЛД в зависимости от характера выделяемой микрофлоры заключаются в нарастании частоты выявления *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, ЦМВ, ВПГ у детей, развивших бронхиальную астму (БА), причем сочетание ЦМВ и ВПГ у детей с бронхиальной астмой встречалось достоверно ($p < 0,05$) чаще в сравнении с детьми с повторными эпизодами обструктивного бронхита.

Изучение коморбидной патологии в первые месяцы жизни у пациентов с МАЖС установило наличие гипертензионно-гидроцефального синдрома (37%), внутрижелудочковых кровоизлияний (57,6%), перивентрикулярной лейкомаляции (6,5%). У пациентов, не имевших микроаспирации, эти показатели были достоверно ($p < 0,05$) меньше и составили 32; 47,4; 3,1%, соответственно. Катамнестическая оценка коморбидной патологии к концу 3-го года жизни у детей с БЛД на фоне МАЖС выявила задержку физического развития (66,1%), психомоторного развития (64,3%), детский церебральный паралич (15,7%) и анемию (52,2%), что статистически значимо ($p < 0,05$) превышает показатели у детей с БЛД без МАЖС, составившие 41,4; 48,3; 6,9; 41,4% соответственно.

В ходе настоящего исследования было установлено, что количество случаев ретинопатии у детей, страдающих БЛД, на фоне МАЖС достоверно ($p < 0,05$) превышало

соответствующие показатели у пациентов с БЛД в группе сравнения с преобладанием ретинопатии II степени (46,9%) и наличием случаев ретинопатии III степени (18,3%). Ретинопатия I степени в основных группах исследования встречалась у 16,5% детей, страдающих БЛД. Группа сравнения характеризовалась статистически значимым ($p < 0,005$) преобладанием ретинопатии I степени (34,5%) и отсутствием случаев заболевания III степени, ретинопатия II степени имела место у 17,2% детей, страдающих БЛД.

Отдельно был проведен сравнительный анализ характера исходов у детей, имевших МАЖС и без нее, но не страдающих БЛД. Количество случаев обструктивных бронхитов, бронхиальной астмы к трем годам жизни достоверно ($p < 0,005$) преобладало у детей с МАЖС: так, частота бронхиальной астмы у данной категории пациентов в 2,5 раза превышала соответствующий показатель в группе детей без МАЖС, а частота повторных эпизодов обструктивного бронхита — в 1,6 раза; пневмонии у детей, имевших МАЖС в неонатальном периоде, протекали с явлениями бронхообструкции. Следует отметить, что у детей без БЛД случаев хронического бронхита к 3 годам жизни не зафиксировано (табл. 12).

Дополнительные результаты исследования

Антирефлюксная терапия в зависимости от особенностей прогностических критериев развития БЛД

При прогнозе легкого и среднетяжелого течения БЛД (экстинкция от 0,3 до менее 1,2) осуществляли следующие мероприятия:

- 1) контроль остаточного содержимого желудка с постепенным расширением объема энтерального питания на 8–10 мл/кг в сут за 1–2 дня у недоношенных детей и на 15–20 мл/кг в сут у доношенных детей;
- 2) головной конец кровати приподнят на 30°;
- 3) применение антирефлюксных смесей.

При прогнозе тяжелого течения БЛД (экстинкция от 1,2 до 1,7) осуществляли следующие мероприятия:

- 1) контроль остаточного содержимого желудка с расширением объема энтерального питания на 8–10 мл/кг в сут за 3–4 дня у недоношенных детей и на 15–20 мл/кг в сут у доношенных детей только при уменьшении выраженности микроаспирации, о чем свидетельствовало уменьшение экстинкции до 1,2 и ниже;
- 2) при сохранении выраженной микроаспирации — сохранение трофического энтерального питания с преимущественным введением питательных веществ парентерально;
- 3) головной конец кровати приподнят на 30°;
- 4) применение антирефлюксных смесей.

В процессе настоящего исследования была оценена эффективность применения антирефлюксных смесей

Таблица 12. Сравнительный анализ исходов у детей без бронхолегочной дисплазии (БЛД)

Исход	Дети с МАЖС (n=161)	Дети без МАЖС (n=68)
	Абс. (%)	Абс. (%)
Повторные эпизоды обструктивного бронхита	41 (25,5)	11 (16,2)
Бронхиальная астма	24 (14,9)	4 (5,9)
Клиническое выздоровление	96 (59,6)	52 (76,5)

Примечание. * — отсутствие признака (0), наличие признака (1). МАЖС — микроаспирация желудочного содержимого.

Таблица 13. Средние значения экстинкции в зависимости от срока гестации и вида энтерального питания в первый месяц жизни

Смесь	Срок гестации, нед			
	≥38	37–35	34–29	<29
	Экстинкция (M±n)			
Антирефлюксная(n=21)	(n=14) 0,617±0,024	(n=4) 0,412±0,008	(n=3) 0,956±0,005	-
Антирефлюксная + стандартная адаптированная (или грудное молоко) (n=107)	(n=32) 0,655±0,018	(n=7) 0,437±0,011	(n=57) 0,962±0,025	(n=11) 1,285±0,027
Стандартная адаптированная (n=148)	(n=54) 0,716±0,035	(n=10) 0,504±0,036	(n=48) 1,029±0,017	(n=36) 1,533±0,014

посредством анализа динамики активности пепсина в ТБА, а также кратности и объема срыгиваний. Антирефлюксную смесь получали 128 детей (46 доношенных детей и 82 ребенка, рожденных преждевременно) с верифицированной МАЖС в неонатальном периоде. Длительность применения антирефлюксной смеси в стационаре составила от 1,5 до 4 мес, на амбулаторном этапе — до 6 мес. Из общего количества детей, получавших антирефлюксную смесь, 39 пациентов к 1,5 мес жизни перешли на нее полностью, 27 из них продолжали получать данную смесь после выписки из стационара в полном объеме.

Нами проведен сравнительный анализ средних показателей экстинкции у детей, получавших антирефлюксные и стандартные адаптированные смеси. Согласно полученным результатам, наибольшую активность пепсина в ТБА при всех степенях гестации имели дети, получающие стандартную адаптированную смесь.

Различия в значениях экстинкции у пациентов, находящихся полностью на антирефлюксной смеси, и у пациентов, получающих антирефлюксную смесь в составе энтерального питания стандартной адаптированной смесью, были наиболее выраженными у доношенных детей, по мере снижения срока гестации отмечалось уменьшение значимости различий в значениях экстинкции.

Следует отметить, что при всех видах антирефлюксных смесей и подходах к энтеральному питанию (антирефлюксная смесь или антирефлюксная смесь в комплексе со стандартной адаптированной смесью) значения экстинкции были достоверно ($p<0,005$) меньше

в сравнении с пациентами, получающими энтерально исключительно стандартную адаптированную смесь. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значимом клиническом эффекте применения антирефлюксных смесей в составе энтерального питания у детей, получающих респираторную терапию в неонатальном периоде (табл. 13).

Согласно результатам исследования, оценка тяжести течения БЛД у детей, получавших в составе энтерального питания антирефлюксную смесь, продемонстрировала более благоприятное ее течение с выраженным регрессом клинических проявлений и меньшим числом обострений, требовавших госпитализации, что согласуется с более низкими значениями экстинкции в ТБА (рис. 4).

Так, из пациентов, в состав энтерального питания которых была включена антирефлюксная смесь, БА легкого течения имела место у 16,5%, тяжелого — у 2,6%. У детей, питавшихся стандартной адаптированной смесью, БА легкого течения присутствовала в 11,3% случаев, тяжелого — в 9,6% ($p<0,05$ при сравнении с показателями пациентов, получавших антирефлюксную смесь). Достоверного различия в количестве случаев среднетяжелой БА между указанными категориями пациентов выявлено не было.

Таким образом, обнаружена сильная статистически зависимость между активностью пепсина в ТБА и частотой развития, а также тяжестью течения БЛД, что клинически демонстрирует высокий уровень значимости МАЖС в этиопатогенезе и патоморфозе БЛД и требует комплексного подхода к диагностике и лечению с коррекцией коморбидных состояний.

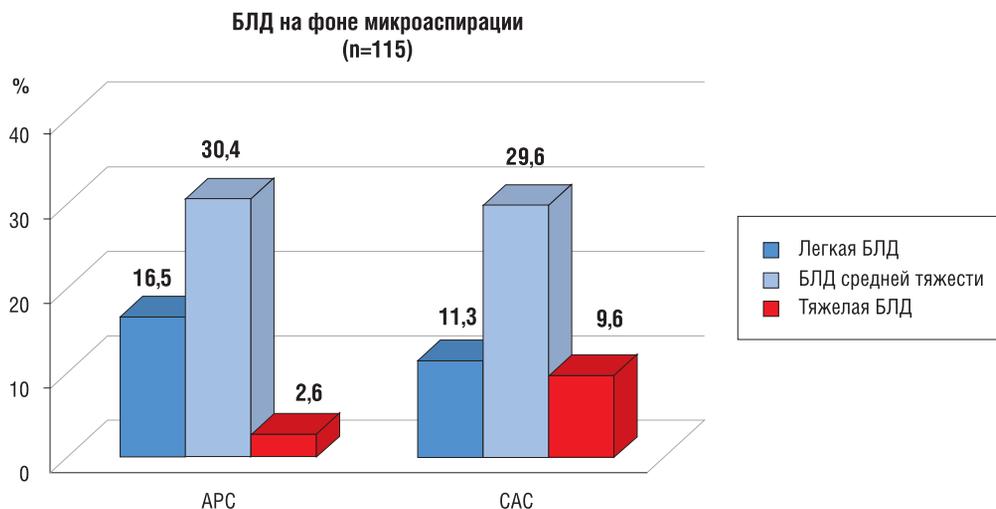


Рис. 4. Количество случаев и тяжесть течения бронхолегочной дисплазии (БЛД) в зависимости от вида энтерального питания в неонатальном периоде.

Примечание. АРС – антирефлюксная смесь, САС – стандартная адаптированная смесь.



Рис. 5. Сравнительный анализ количества случаев микроаспирации желудочного содержимого у детей, получавших Эуфиллин и кофеин.

Влияние метилксантинов на выраженность МАЖС

Считается целесообразным назначение для профилактики и лечения БЛД метилксантинов, в частности Эуфиллина, который обладает бронходилатирующим действием, стимулирует дыхательный центр, улучшает сократительную функцию диафрагмы, снижает сосудистое сопротивление и мягко стимулирует диурез. Однако, помимо положительного действия Эуфиллина, имеют место побочные эффекты, одним из которых является релаксация нижнего пищеводного сфинктера и потенцирование гастроэзофагеальной регургитации [18].

Из 373 включенных в исследование детей Эуфиллин (соединение теофиллина с этилендиамином) в неонатальном периоде получали 176, кофеин (Кофеин-бензоат натрия) — 197. Суточная доза Эуфиллина составляла от 1,5 до 5 мг/кг в сут, внутривенно, доза насыщения кофеина — 20 мг/кг в сут, поддерживающая доза — 5 мг/кг в сут, внутривенно, каждые 24 ч согласно рекомендациям Российской ассоциации специалистов перинатальной медицины.

Применение Эуфиллина и Кофеина-бензоата натрия являлись off-label-назначениями. Решение о назначении Эуфиллина и Кофеина-бензоата натрия принималось консилиумом. У всех родителей или официальных опекунов обследованных детей было получено добровольное информированное согласие на применение этих препаратов. Дизайн исследования, включая данную его часть, были одобрены этическим комитетом.

Как показал анализ частоты случаев МАЖС в зависимости от применяемого метилксантина, диагностически значимая экстинкция определялась достоверно ($p < 0,0002$) чаще у пациентов, получавших Эуфиллин (рис. 5).

Помимо количества случаев МАЖС, в процессе анализа полученных результатов проведена оценка максимальных значений экстинкции у детей с МАЖС, получающих Эуфиллин и кофеин. Выявлена более выраженная

Таблица 14. Максимальные значения экстинкции в зависимости от применяемого системного метилксантина

Показатель	Эуфиллин (n=152)	Кофеин (n=124)
Экстинкция в 1-й группе	(n=28) 0,497±0,029	(n=16) 0,326±0,036
Экстинкция во 2-й группе	(n=101) 1,118±0,025	(n=84) 0,931±0,017
Экстинкция в 3-й группе	(n=23) 1,542±0,033	(n=24) 1,408±0,021

МАЖС у пациентов, получавших Эуфиллин при всех сроках гестации (табл. 14).

Анализ динамики значений экстинкции в зависимости от средних суточных доз Эуфиллина в составе комплексной терапии детей выявил нарастание активности пепсина в ТБА по мере увеличения дозы препарата ($p=0,05$, $p=0,037$, $p=0,002$ — в 1, 2 и 3-й группах, соответственно). При этом для доношенных детей и детей, рожденных в сроке гестации 37–35 нед, доза Эуфиллина, сопровождающаяся нарастанием активности пепсина, составила 3,5 мг/кг в сут и выше, тогда как пациенты, рожденные в более ранние сроки гестации, имели значимое нарастание экстинкции уже при дозе 2,5 мг/кг в сут.

Обсуждение

Наше исследование установило, что выраженность МАЖС находится в обратно пропорциональной зависимости от гестационного возраста ($p=0,00027$) и прямо пропорциональной зависимости от тяжести неврологической патологии ($p=0,00035$). Так, активность пепсина в ТБА нарастает по мере снижения гестационного возраста с максимальными показателями у детей с гестационным возрастом менее 29 нед. У детей с гестационным возрастом 34 нед и менее МАЖС имеет прогрессирующий характер с максимальными значениями экстинкции на 22–24-й дни жизни. Полученные данные согласуются с результатами проведенных ранее исследований [10], выявивших нарастание дисфункций верхних отделов желудочно-кишечного тракта на 3–4-й нед жизни у детей, рожденных преждевременно, в частности, в связи с созреванием нижнего пищеводного сфинктера на фоне нарушения его функциональной активности.

Выявлено, что у детей различного гестационного возраста с МАЖС частота развития БЛД (41,7%) статистически значимо превышает соответствующие показатели в группе сравнения (29,9%) ($p=0,004$) и нарастает по мере снижения срока гестации ($p=0,00026$). В структуре БЛД у детей с МАЖС БЛД доношенных, классическая и новая БЛД недоношенных встречаются в 8,7; 77,4; 13,9% случаев, тогда как у пациентов группы сравнения данные показатели составляют 3,4; 65,5; 31%, соответственно. При нарастании выраженности МАЖС и снижении гестационного возраста имеет место увеличение количества случаев среднетяжелого ($p=0,003$) и тяжелого ($p=0,007$) течения БЛД. У детей, рожденных в одинаковые сроки гестации, но с различными значениями экстинкции в ТБА, показателю большей активности пепсина ($p=0,0035$) соответствовало более тяжелое течение БЛД.

Анализ рентгенологической семиотики показал, что БЛД на фоне МАЖС характеризуется более выраженными интерстициальными изменениями с ранним фиброзом легких, кадиомегалией и тимомегалией.

При оценке коморбидной патологии отмечено, что у пациентов с МАЖС, по сравнению с детьми без МАЖС, в первые месяцы жизни достоверно ($p < 0,001$) чаще имеют место внутрижелудочковые кровоизлияния (57,6%), перивентрикулярная лейкомаляция (6,5%), а к первому году жизни — задержка физического (66,1%), психомоторного развития (64,3%) и количество случаев детского церебрального паралича (15,7%), преобладает ретинопатия II степени (45,9%), и имеют место случаи ретинопатии III степени (15,6%).

В исходе БЛД у детей с МАЖС бронхиальная астма, повторные эпизоды обструктивного бронхита, хронический

бронхит, локальный пневмофиброз встречаются достоверно ($p < 0,05$) чаще по сравнению с детьми без МАЖС.

Терапия метилксантинами, в частности Эуфиллином, может являться фактором, способствующим развитию гастроэзофагеальной регургитации и увеличивающим ее выраженность.

Учитывая результаты исследования, следует отметить, что включение в состав диагностического алгоритма у новорожденных детей, получающих респираторную терапию, методики определения пепсина в ТБА делает возможным верификацию МАЖС на ранних этапах, а применение в составе комплексного лечения антирефлюксной позиционной и нутритивной коррекции позволяет уменьшить выраженность МАЖС, снизить риск развития и уменьшить тяжесть течения БЛД.

Заключение

Таким образом, выявлена сильная статистически зависимость между активностью пепсина в ТБА и частотой развития, а также тяжестью течения БЛД, что клинически демонстрирует высокий уровень значимости МАЖС в этиопатогенезе и патоморфозе БЛД. Сочетанная бронхолегочная, желудочно-кишечная и неврологическая патология взаимодействуют друг с другом по типу взаимного отягощения, что делает необходимым

комплексный подход в решении патогенетических, клинических, диагностических и лечебно-реабилитационных вопросов.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

Частично результаты исследования были опубликованы ранее в виде тезисов: Брыксина Е.Ю. Частота развития и особенности течения бронхолегочной дисплазии у детей с микроаспирацией желудочного содержимого. В кн: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МЕДИЦИНЫ XXI ВЕКА: сборник статей Международной научно-практической конференции. 4 марта 2014 г./отв. ред. А.А. Сукиасян. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2014. – 54 с. Доступно по ссылке: <http://aeterna-ufa.ru/sbornik/AVMXXIV.pdf>

Выражение признательности

Авторы выражают признательность сотрудникам ВОДКБ № 1, а также сотрудникам Центральной научно-исследовательской лаборатории Воронежского государственного медицинского университета имени Н.Н. Бурденко за помощь в проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овсянников Д.Ю. Бронхолегочная дисплазия: естественное развитие, исходы, контроль // *Педиатрия*. – 2011. – Т. 90. – №1. – С. 128–133. [Ovsyannikov DYu. Bronkholegichnaya displaziya: estestvennoe razvitie, iskhody, kontrol'. *Pediatriya*. 2011;90(1):128–133. (In Russ).]
2. Давыдова И.В., Намазова-Баранова Л.С., Яцык Г.В., и др. Профилактические стратегии на этапах формирования и течения бронхолегочной дисплазии // *Педиатрическая фармакология*. – 2014. – Т. 11. – №2. – С. 34–39. [Davydova IV, Namazova-Baranova LS, Yatsyk GV, et al. Preventive strategies in the stages of formation and course of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2014;11(2):34–39. (In Russ).] doi: 10.15690/pf.v11i2.955.
3. Байбарина Е.Н., Дегтярев Д.Н. Перинатальная медицина: от теории к практике // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. – 2013. – Т. 58. – № 5. – С. 4–7. [Baibarina EN, Degtyarev DN. Perinatal medicine: from theory to practice. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii*. 2013;58(5):4–7. (In Russ).]
4. Jain D, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia: clinical perspective. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2014;100(3):134–144. doi: 10.1002/bdra.23229.
5. Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*. 2006;130(5):1377–1390. doi: 10.1053/j.gastro.2006.03.008.
6. De Rose DU, Cresi F, Romano V, et al. Can MII – pH values predict the duration of treatment for GERD in preterm infants? *Early Human Development*. 2014;90(9):501–505. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2014.07.003.
7. Salvatore S, Hauser B, Vandemaele K, et al. Gastroesophageal reflux disease in infants: how much is predictable with questionnaires, pH-metry, endoscopy and histology? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40(2):210–215. doi: 10.1097/00005176-200502000-00024.
8. Krishnan U, Mitchell DJ, Messina I, et al. Assay of tracheal pepsin as a marker of reflux aspiration. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002;35(3):303–308. doi: 10.1097/00005176-200209000-00012.
9. Davidson BA, Knight PR, Wang Z. Surfactant alterations in acute inflammatory lung injury from aspiration of acid and gastric particulates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(4):699–708. doi: 10.1152/ajplung.00229.2004.
10. Беляева И.А., Бомбардинова Е.П., Тарзян Э.О. Дисфункции пищеварения у недоношенных детей // *Вопросы современной педиатрии*. – 2012. – Т. 11. – №6. – С. 75–79. [Belyaeva IA, Bombardirova EP, Tarzyan EO. Digestive disorders in prematurely born children. *Voprosy sovremennoi pediatrii*. 2012;11(6):75–79. (In Russ).] doi: 10.15690/vsp.v11i6.495.
11. Akinola E, Rosenkrantz TS, Pappagallo M, et al. Gastroesophageal reflux in infants < 32 weeks gestational age at birth: lack of relationship to chronic lung disease. *Am J Perinatol*. 2004;21(2):57–62. doi: 10.1055/s-2004-820512.
12. Nelson SP, Chen EH, Syniar GM, et al. Prevalence of symptoms of gastroesophageal reflux during infancy. A pediatric practice based survey. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2000;154(2):150–154. doi: 10.1001/archpedi.154.2.150.
13. Sadowska-Krawczenko I, Korbal P, Czerwonka-Szaflarska M. Influence of selected neonatal diseases on the incidence of gastroesophageal reflux in preterm neonates. *Med Wieku Rozwoj*. 2005;9(3 Pt.1):317–324.
14. Krishnan R, Nemzek J, Napolitano LM, et al. Aspiration-Induced lung injury. *Crit Care Med*. 2011;39(4):818–826. doi: 10.1097/CCM.0b013e31820a856b.
15. Классификация клинических форм бронхолегочных заболеваний у детей. – М.: *Российское респираторное общество*; 2009. 18 с. [Klassifikatsiya klinicheskikh form bronkholegichnykh zabolevanii u detei. Moscow: Rossiiskoe respiratornoe obshchestvo; 2009. 18 p. (In Russ).]

16. Taramarcaz P, Gibson P. Intranasal corticosteroids for asthma control in people with coexisting asthma and rhinitis. *Cochrane Database Syst Review*. 2003;4:CD003570. doi: 10.1002/14651858.CD003570.
17. Егорова В.Б. Диагностическое значение компьютерной бронхофонографии при заболеваниях органов дыхания у новорожденных: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М.; 2006. 22 с. [Egorova VB. *Diagnosticheskoe znachenie komp'yuternoj bronkhofonografii pri zabolevaniyakh organov dykhaniya u novorozhdennykh*. [dissertation] Moscow; 2006. 22 p. (In Russ).]
18. Steer PA, Henderson-Smart DJ. Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. *Cochrane Database of Syst Rev*. 2002;2:CD000273. doi: 10.1002/14651858.CD000273.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Брыксина Евгения Юрьевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицины № 4 Ростовского государственного медицинского университета
Адрес: 344068, Ростов-на-Дону, ул. Бодрая, д. 90, **тел.:** +7 (86347)3-13-48, **e-mail:** ey.bryksina81@list.ru

Брыксин Владислав Серафимович, кафедра пропедевтики детских болезней и педиатрии Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко
Адрес: 394030, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10, **тел.:** +7 (4732) 65-65-62, **e-mail:** bryxin77@inbox.ru

Почивалов Александр Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики детских болезней и педиатрии Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко
Адрес: 394030, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10, **тел.:** +7 (4732) 65-65-62, **e-mail:** detbol-vgma@mail.ru

И.А. Стародубцева, Л.В. Васильева, А.В. Никитин

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко,
Воронеж, Российская Федерация

Анализ эффективности применения ингибитора интерлейкина 1 в комплексном лечении вторичного остеоартроза с учетом динамики клинико-функциональных показателей

Обоснование. Вторичный остеоартроз (ОА) оказывает неблагоприятное влияние на течение основного заболевания, может усиливать клинические проявления суставного синдрома. Раннее выявление коморбидного заболевания и начало лечения наряду с терапией основной патологии имеют первостепенное значение для сохранения адекватной функциональной активности пациентов. **Цель исследования:** проанализировать эффективность применения ингибитора интерлейкина 1 в комплексном лечении вторичного ОА при ревматоидном артрите (РА). **Методы:** 248 больных вторичным ОА при РА были разделены на 4 группы: больные I группы (n=62) получали ингибитор интерлейкина 1 (50 мг × 2 раза/день) в сочетании с лазерной терапией на фоне приема метотрексата (10–20 мг/нед); во II группе пациенты (n=60) принимали ингибитор интерлейкина 1 в комплексе с метотрексатом, в III (n=62) — лазерную терапию на фоне базисного лечения, в IV (n=64) — метотрексат. Анализ эффективности лечения оценивали по динамике боли через 3 и 6 мес с помощью визуальной аналоговой шкалы (ВАШ), специальных методик HAQ и KOOS. **Результаты.** У больных I группы наблюдалось статистически достоверное снижение боли по ВАШ при движении через 3 и 6 мес на 28,53 (43,6%) и 31,3 (48%) мм, соответственно, достигнув значений 36,87±1,56* и 33,11±1,11* (p<0,05). Результаты работы показали статистически достоверное преимущество динамики HAQ в I и II группах по сравнению с группами III и IV (p=0,03). Наиболее выраженные статистически значимые (p=0,02) результаты по динамике индекса KOOS отмечены в I и II группах больных через 6 мес комплексного лечения, включавшего диациреин. **Заключение.** Включение ингибитора интерлейкина 1 в комплексное лечение вторичного ОА у больных РА способствует клиническому улучшению по ВАШ (p=0,03), индексу KOOS, отражающему функциональное состояние коленного сустава, и повышает качество жизни по данным опросника HAQ (p=0,03) через 6 мес терапии.

Ключевые слова: вторичный остеоартроз, ревматоидный артрит, ВАШ, HAQ, KOOS, ингибитор интерлейкина 1.

(Для цитирования: Стародубцева ИА, Васильева ЛВ., Никитин АВ. Анализ эффективности применения ингибитора интерлейкина 1 в комплексном лечении вторичного остеоартроза с учетом динамики клинико-функциональных показателей. Вестник РАМН. 2016;71(1):141–147. doi: 10.15690/vramn580)

I.A. Starodubtseva, L.V. Vasilieva, A.V. Nikitin

NN Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation

The Analysis of Efficacy of The Application of Interleukin-1 Inhibitor in the Complex Therapy of Secondary Osteoarthritis Taking Into Account the Dynamics of Clinical and Functional Indicators

Background: Secondary osteoarthritis (OA) adversely affects the underlying disease and can enhance clinical manifestations of articular syndrome. Early detection of comorbid pathology and early treatment with the therapy of underlying condition is of primary importance to preserve adequate functional activity in patients. **The Aim is to analyze the efficacy of the application of interleukin -1 inhibitor in the complex treatment of secondary OA in addition to rheumatoid arthritis (RA). Materials and methods:** 248 patients with secondary OA and RA were divided in 4 groups: patients of group I (n=62) took interleukin -1 inhibitor (50mg × 2 times per day) in combination with laser therapy on the basis of methotrexate (10–20 mg per week), group II (n=60) received interleukin -1 inhibitor in complex with methotrexate, in group III (n=62) — laser therapy with methotrexate and in group 4 – methotrexate. We estimated the treatment efficacy in 3 and 6 months according to the dynamics of pain on VAS, indexes HAQ and KOOS. **Results:** according to VAS group 1 showed statistical significant reduction in pain on movement in 3 and 6 months of 28,53 mm (43,6%) and 31,3 mm (48%) respectively, to values of 36,87±1,56* and 33,11±1,11* (p<0,05). The results showed the statistically significant advantage of HAQ dynamics in groups I and II in comparison with groups III, IV (p=0,03). The most prominent statistically significant (p=0,02) results according to the dynamics of index KOOS were noted in groups of patients who took diacerein (I and II) 6 months after the complex treatment. **Conclusions:** the inclusion of interleukin -1 inhibitor in the complex treatment of secondary OA in patients with RA contributes to clinical improvement according to VAS (p=0,03), index KOOS that reflects functional condition of the knee and increases the quality of life by index HAQ (p=0,03) after 6 months therapy.

Key words: secondary osteoarthritis, rheumatoid arthritis, VAS, HAQ, KOOS, inhibitor of interleukin-1.

(For citation: Starodubtseva IA, Vasilieva LV., Nikitin AV. The Analysis of Efficacy of the Use of Inhibitor Interleukin-1 in the Complex Therapy of Secondary Osteoarthritis Taking Into Account the Dynamics of Clinical and Functional Indicators. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2016;71(2):141–147. doi: 10.15690/vramn580)

Обоснование

Остеоартроз (ОА) — заболевание костно-мышечной системы с вовлечением подвижных суставов, характеризующееся клеточным стрессом и деградацией внеклеточного матрикса, инициированных микро- и макротравматизацией, что активирует неадекватный репаративный ответ, включая провоспалительные механизмы врожденного иммунитета. Первоначально болезнь манифестирует на молекулярном уровне (нарушение метаболизма суставных тканей) с последующими анатомическими и/или физиологическими расстройствами (разрушение хряща, ремоделирование костной ткани, формирование остеофитов, воспаление сустава и утрата нормальной функции сустава), которые в конечном итоге могут завершиться формированием заболевания (OARSI, Международное научное общество по изучению остеоартроза, 2013) [1].

В большинстве случаев, когда причина ОА неизвестна, идентифицируют первичный или идиопатический вариант болезни. Повреждения кости или сустава во время занятий спортом, а также совместная нагрузка на сустав с течением времени (например, в обычной повседневной жизни) могут привести к ОА. Кроме того, ОА бывает обусловлен другими медицинскими заболеваниями, включая ревматоидный артрит (РА). И, наконец, люди рождаются с некоторыми деформациями костей, что может также привести к развитию ОА [2].

В последнее время именно воспалительные ревматологические заболевания, наиболее распространенным из которых является РА, выступают в качестве факторов риска развития коморбидной патологии. Анализ коморбидности основан на выявлении основного заболевания («индексная болезнь») в комплексе с любой дополнительной патологией, имеющей единые патогенетические механизмы, либо представляющей осложнение терапии основного заболевания [3, 4]. Так, например, Американская ассоциация здоровья и потери трудоспособности в основе вторичного состояния рассматривает наличие заболевания или травмы [5].

В патогенезе РА и ОА большое значение имеют провоспалительные цитокины, в частности интерлейкин (ИЛ) 1, 6 и фактор некроза опухоли α , уровень которых взаимосвязан со степенью тяжести ревматологических заболеваний. При этом их роль в потенцировании развития воспаления настолько велика, что в клиническую практику достаточно прочно вошли препараты, направленные на снижение уровня цитокинов в сыворотке крови.

Таким образом, провоспалительные цитокины, включая ИЛ 1, оказывают негативное влияние на катаболизм хряща, субхондральной кости, что необходимо учитывать при выборе терапевтического подхода к лечению вторичного ОА [6].

Среди ингибиторов ИЛ 1 выделяют препарат диациреин — ацетилированную форму реина, действие которой направлено на уменьшение образования окиси азота (NO) и индуцибельной изоформы NO-синтазы (iNOS) [7–9].

Вследствие широкой распространенности ОА в современной российской популяции, а также высокой частоты инвалидизации Российским научным медицинским обществом терапевтов на основании Консенсуса экспертов РФ опубликованы клинические рекомендации «Ведение больных с остеоартритом и коморбидностью в общей врачебной практике». Согласно утвержденному документу, в лечении больных ОА рекомендовано использовать симптоматические препараты замедленного действия в качестве длительной базисной терапии. По результатам

клинического исследования А.В. Наумова, среди препаратов этой группы одним из наиболее эффективных и безопасных в комплексной терапии хронической боли при ОА при противопоказаниях к традиционным нестероидным противовоспалительным препаратам из-за наличия коморбидных заболеваний является диациреин [10–12].

Лазерная терапия — наиболее распространенный метод локальной терапии, улучшает не только микроциркуляцию и периферическое кровообращение, но и обладает противовоспалительным, регенераторным, иммунокорректирующим и спазмолитическим эффектом [13–16]. Данный метод широко используется в дополнение к лекарственной терапии [17].

Цель исследования: оценить клиническое течение вторичного остеоартроза, проанализировать эффективность применения ингибитора ИЛ 1 в комплексном лечении вторичного ОА у больных РА.

Методы

Дизайн исследования

В открытое контролируемое исследование включили 248 пациентов с РА, имеющих вторичный ОА, в возрасте от 38 до 65 лет (средний возраст \pm стандартное отклонение $47,04 \pm 9,72$ года), имеющих I и II степень активности заболевания по индексу DAS28 (Disease Activity Score).

Диагноз РА устанавливали на основании критериев Американской ревматологической ассоциации (ARA; 1987 г.) при наличии у пациента ≥ 4 из них (по Arnett F.C. и соавт., 1988 [18] и ACR/EULAR, 2010 [19]).

Женщины составили 87,5% ($n=217$), мужчины — 12,5% ($n=31$).

Все больные вторичным ОА при РА ($n=248$) были рандомизированы на 4 группы: в группе I ($n=62$) пациенты получали ингибитор ИЛ 1, метотрексат (MT) и лазерную терапию; в группе II ($n=60$) — ингибитор ИЛ 1 и MT; пациенты III группы ($n=62$) на стационарном этапе прошли курс лазерной терапии на фоне приема MT; пациенты IV группы ($n=64$; группа контроля) находились на базисной терапии (MT).

Опрос проводился при непосредственном контакте: пациенты заполняли анкеты с вопросами без посторонней помощи. Боль оценивали по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) в покое, в движении и при пальпации, качество жизни — по опроснику оценки здоровья (Health Assessment Questionnaire, HAQ), функциональное состояние коленного сустава — по шкале оценки функционального состояния коленного сустава после перенесенной травмы и остеоартроза (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score, KOOS). Значения HAQ от 0 до 0,5 балла соответствуют показателям популяционного контроля (респонденты соответствующего пола и возраста).

Критерии соответствия

Критерии включения в исследование: лично подписанное информированное согласие, I–II степень активности основного заболевания (РА) по DAS28, наличие вторичного ОА.

Критерии исключения из исследования больных согласованы с рекомендациями Комитета по фармаконадзору и оценке рисков Европейского медицинского агентства [20]:

- возраст старше 65 лет в группах больных, получавших ингибитор ИЛ 1 в комплексном лечении;

- противопоказания к назначению метотрексата, диациреина в эффективных терапевтических дозах;
- тяжелые активные инфекции (туберкулез, активный вирусный гепатит);
- III степень активности основного заболевания по DAS28;
- заболевания печени;
- воспалительные заболевания кишечника;
- хирургическое лечение РА до и на протяжении исследования;
- наличие злокачественных новообразований, в том числе в анамнезе, за 5 последних лет или предраковые состояния;
- злоупотребление алкоголем;
- психические заболевания, в том числе деменция, и нарушение восприятия информации;
- невозможность наблюдения за больным в течение 2 лет.

Условия проведения

Исследование проводилось на базе ревматологического отделения БУЗ ВО «Воронежская городская клиническая больница № 20» и кафедры пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения России.

Продолжительность исследования

Оценку клинического состояния пациентов, их функциональный статус и качество жизни проводили непосредственно при поступлении пациентов на стационарное лечение в ревматологическое отделение и амбулаторно в период с 2011 по 2014 г. Результаты эффективности лечения анализировали через 3 и 6 мес от начала терапии.

Описание медицинского вмешательства

Терапия основного заболевания проводилась в соответствии с рекомендациями по лечению РА Ассоциации ревматологов России и Европейской антиревматической лиги [21, 22] с учетом стратегии «лечение до достижения цели» (treat to target) [23].

Ингибитор ИЛ 1 (диациреин) принимали по 50 мг (1 капсула) 2 раза в день на фоне базисной терапии метотрексатом в дозе 10–20 мг в нед.

Диациреин входит в рекомендации Европейской антиревматической лиги по лечению ОА (EULAR, 2003) и в клинические рекомендации консенсуса экспертов Российской Федерации «Ведение больных с остеоартритом и коморбидностью в общей врачебной практике» [11, 12, 24].

В период стационарного лечения (2 нед) пациенты I и III групп в дополнение к медикаментозному лечению прошли курс лазерной терапии. Использована стандартная методика, включавшая лазерное облучение коленных суставов последовательно по полям. Процедура проводилась на полупроводниковом лазерном оптическом аппарате «Мустанг 2000» (НИЦ «Матрикс», Россия): длина волны — 0,89 мкм, частота импульсов — 80–1500 Гц, импульсная мощность — 5 Вт, длительность экспозиции на поле — 1–2 мин. Для надвенозного лазерного облучения использовали аппарат лазерной терапии «Матрикс ВЛОК», оснащенный излучающей головкой КЛ-ВЛОК, с мощностью красного лазерного излучения 1,5–2 мВт, длиной волны 0,63 мкм. При этом применялась контактная стабильная методика через кожный покров в области локтевой ямки строго перпендикулярно крупному кровеносному сосуду. Суммарное время излучения — 15 мин.

Исходы исследования

Основной исход исследования

Эффективность лечения оценивали при помощи функциональных индексов и опросника качества жизни: боль по ВАШ в покое, в движении и при пальпации, KOOS, HAQ.

Дополнительные исходы исследования

Контроль безопасности применения ингибитора ИЛ 1 в комплексном лечении.

Анализ в подгруппах

Методы регистрации исходов

У больных, вошедших в наше исследование, определяли:

- выраженность боли в суставах по ВАШ в мм;
- оценку функции коленного сустава по шкале KOOS;
- функциональный индекс HAQ (наиболее чувствительный индекс для оценки эффективности терапии РА).

Анализ качества жизни больных РА проводили по шкале HAQ:

- $\Delta\text{HAQ} < 0,22$ балла — отсутствие эффекта терапии;
- $\text{HAQ} < 0,22$ балла — минимальные клинически значимые изменения;
- $0,22 \leq \Delta\text{HAQ} < 0,36$ (20% улучшение по критериям Американской коллегии ревматологов) — умеренное клиническое улучшение;
- $0,36 < \Delta\text{HAQ} < 0,80$ (50% эффект терапии) — значительный эффект терапии;
- $\Delta\text{HAQ} \geq 0,80$ балла (70% улучшение по критериям Американской коллегии ревматологов) — выраженное клиническое улучшение.

Этическая экспертиза

Протокол обследования лиц группы контроля и больных РА был утвержден Этическим комитетом ГБОУ ВПО «ВГМУ» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Все пациенты получали карту дополнительной информации с указанием названия проводимого исследования, личных данных исследователя и телефона, по которому можно связаться при появлении вопросов или возникновении неотложной ситуации.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Методы статистического анализа данных

Анализ результатов проводили с применением статистического пакета Statistica 10 (StatSoft Inc., США) с последующим представлением результатов (средние \pm стандартная ошибка). Исходно данные обрабатывались с помощью традиционных методов описательной статистики с расчетом средних величин, стандартного отклонения, стандартной ошибки. Проверку соответствия полученных выборок нормальному закону распределения и их анализ проводили с помощью графического метода построения гистограмм, критериев Колмогорова–Смирнова и Лиллиефорса, а также определения асимметрии, эксцесса и их стандартных ошибок [25, 26]. В качестве методов статистического анализа для выявления различий между средними значениями, полученными с помощью аппарата описательной статистики, были использованы одномерный и многомерный дисперсионный анализы как методы, наиболее адекватные с математической точки зрения; при этом также вычисляли величины нижнего и верхнего квартилей, межквартильного размаха, процентильные коридоры. При соответствии закона распределе-

ния нормальному закону использовали дисперсионный анализ (ANOVA и MANOVA) с поправкой Даннетта и критерий Шеффе как более строгий. В случае отклонения от нормального закона распределения применяли методы непараметрического анализа: критерий Вилкоксона, дисперсионный анализ Спирмена. Для сравнения частот значений использовался угловой критерий Фишера. Графически полученные результаты представлены как столбчатые диаграммы с указанием доверительных 95% интервалов.

Результаты

Объекты (участники) исследования

Вторую степень активности заболевания по индексу DAS28 имели 244 из 248 больных РА (98,6%), первую — 4 (1,4%). У 193 пациентов (78%) был серопозитивный по ревматоидному фактору вариант течения РА, соотношение положительных антител к циклическому цитрулинированному пептиду (АЦЦП+) к отрицательным (АЦЦП-) составило 8:1. Большинство больных, включенных в исследование, были серопозитивны по ревматоидному фактору/АЦЦП: 78/83 по отношению к серонегативным 22/17%, соответственно. Больные РА, вошедшие в исследование, имели преимущественно II–III рентгенологические стадии по классификации Steinbrocker, при этом соотношение составило 144 (58%) и 67 (27%), соответственно. У 37 (15%) наблюдалась I стадия РА по данным рентгенографии.

Основные результаты исследования

Согласно данным табл. 1, можно наблюдать достоверное снижение боли по ВАШ при движении через 3 и 6 мес от начала лечения, что подтверждает эффективность базисной медикаментозной терапии, назначенной во всех сравниваемых группах в отношении интенсивности болевого синдрома, при этом максимальный эффект был достигнут к концу 6-го мес лечения. У больных I группы наблюдалось статистически достоверное снижение боли по ВАШ при движении через 3 и 6 мес на 28,53 (43,6%) и 31,3 (48%) мм, соответственно, достигнув значений 36,87±1,56 и 33,11±1,11 ($p=0,02$). Во II группе больных аналогичный

показатель уменьшился на 26,5 и 29,58 мм через 3 и 6 мес терапии. Не столь выраженное, но статистически достоверное снижение индекса боли по ВАШ при движении было отмечено в III и IV группах больных вторичным ОА при РА: уменьшение на 17,7 (27%) и 19,27 (29,2%) и на 12,8 (19%) и 16,7 (25%) мм, соответственно ($p=0,03$).

Таким образом, ВАШ продемонстрировала преимущества применения ингибитора ИЛ 1 на фоне базисного лечения в отношении снижения боли при движении. При этом не отмечено статистически достоверного приоритета в отношении использования лазерной терапии в комбинации с базисной терапией и ингибитором ИЛ 1 в I группе больных по сравнению с группой пациентов, не получавших лазерного лечения. Отмечено безусловное преимущество применения диацереина в комплексном лечении по сравнению с группами, получавшими только базисную терапию или в комплексе с курсом лазерной терапии. Зафиксирован достоверный эффект последствия лазерной терапии через 3 мес после лечения, что выражалось статистически достоверной разницей в уменьшении боли по ВАШ при движении в пользу пациентов III группы, которые получали низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ), по сравнению с больными IV группы. Однако через 6 мес от начала лечения статистически значимой разницы при сравнении показателей I и II, а также III и IV групп отмечено не было, что может свидетельствовать об ускользании эффекта лечения с применением НИЛИ (см. табл. 1).

При анализе показателей боли по ВАШ в покое и при пальпации через 3 и 6 мес наряду со статистически достоверной разницей ($p=0,02$) отмечена значительная положительная динамика через 3 мес лечения во всех сравниваемых группах по сравнению с исходными значениями (см. табл. 1). При этом наиболее выраженные изменения отмечены в группах, принимавших ингибитор ИЛ 1 в комплексном лечении, как в отношении динамики боли по ВАШ в покое, так и при пальпации. Статистически достоверной разницы в III и IV группах между показателями через 3 и 6 мес установлено не было.

Сравнительная оценка результатов через 6 мес лечения больных вторичным ОА при РА подтвердила преимущества использования ингибитора ИЛ 1 в комплексном

Таблица 1. Динамика боли по ВАШ в покое, в движении и при пальпации в сравниваемых группах больных вторичным остеоартрозом при ревматоидном артрите через 3 и 6 мес лечения

Группы сравнения		Визуальная аналоговая шкала (ВАШ)		
		В движении	В покое	При пальпации
I	До лечения	65,40±1,32	53,79±2,04	41,12±2,22
	Через 3 мес	36,87±1,56*	35,08±1,68*	27,90±2,02*
	Через 6 мес	34,11±1,11*	30,40±2,24*	26,85±1,83*
II	До лечения	67,91±1,17	52,33±2,04	39,75±1,87
	Через 3 мес	41,41±1,27*	37,75±1,66*	25,83±1,47*
	Через 6 мес	38,33±1,4*	33,25±1,76*	25,58±1,60*
III	До лечения	65,80±1,28	52,41±2,16	41,69±1,72
	Через 3 мес	48,06±1,11*	42,5±2,05*	29,91±1,56*
	Через 6 мес	46,53±1,73*	39,83±1,72*	28,38±1,28*
IV	До лечения	66,48±1,58	52,89±1,86	41,04±2,07
	Через 3 мес	53,67±1,49*	39,76±1,69*	30,15±1,8*
	Через 6 мес	49,76±1,31*	37,26±1,42*	29,14±1,56*

Примечание. *— $p<0,05$.

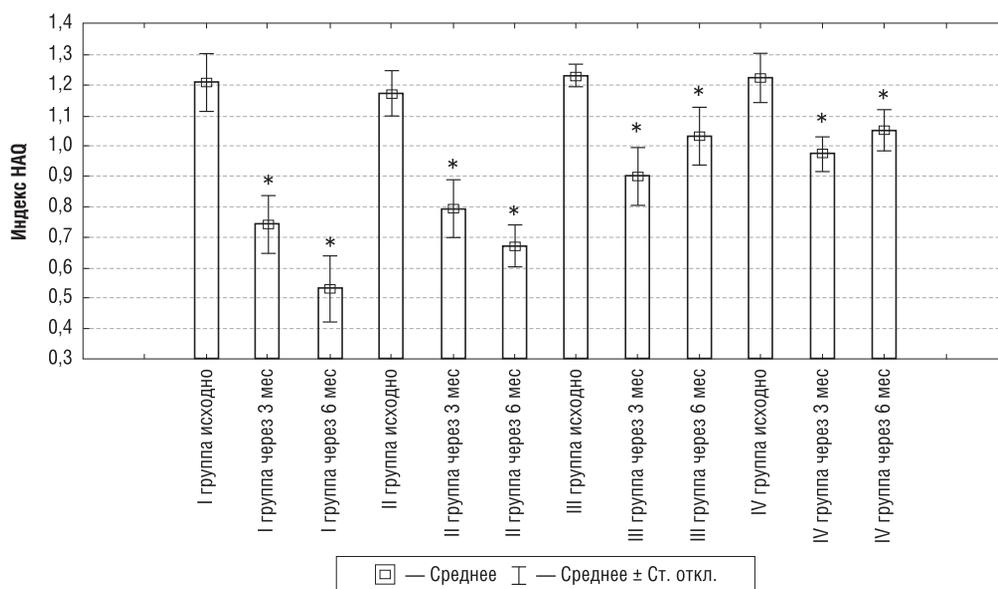


Рис. 1. Динамика индекса HAQ в сравниваемых группах больных ревматоидным артритом с вторичным остеоартрозом через 3 и 6 мес лечения

Примечание. * — $p=0,03$.

лечении, что выражено положительной динамикой показателя качества жизни HAQ (рис. 1).

В частности, отмечено статистически достоверное преимущество динамики HAQ в I и II группах больных по сравнению с пациентами III и IV групп ($p=0,03$). Таким образом, использование ингибитора ИЛ 1 в лечении вторичного ОА у больных РА на фоне комплексной терапии способствует улучшению качества жизни по данным опросника HAQ.

В результате оценки функции коленного сустава через 3 и 6 мес лечения по шкале KOOS отмечена статистически достоверная динамика во всех группах сравнения по отношению к исходным значениям ($*p=0,02$). В I группе больных через 3 и 6 мес средние значения достигли $85,0 \pm 0,80^*$ и $88,2 \pm 0,75^*$, во II — $84,2 \pm 0,57^*$ и $87,9 \pm 0,47^*$, в III — $80,2 \pm 0,74^*$ и $81,5 \pm 0,67^*$, в IV — $78,4 \pm 0,72^*$ и $80,9 \pm 0,68^*$. Исходные показатели в среднем составили $73,9 \pm 0,79$, $74,3 \pm 0,51$, $74,1 \pm 0,69$ и $74 \pm 0,57$, соответ-

ственно. Наиболее выраженные статистически значимые ($p=0,02$) преимущества отмечены через 6 мес лечения в I и II группах больных, получавших диацереин на фоне базисного лечения (рис. 2).

Включение ингибитора ИЛ 1 в комплексное лечение вторичного ОА у больных РА позволило уменьшить количество повторных амбулаторных обращений практически в 1,5 раза ($p=0,0007$) (табл. 2).

Дополнительные результаты исследования

Согласно полученным данным, прием диацереина сопровождался диареей у 12% больных вторичным ОА. Причем в 9% случаев появление нежелательной симптоматики было отмечено в первые 4 недели от начала приема препарата. Контроль гепатотоксических реакций, связанных с приемом диацереина, выявил подобные осложнения у 1,7% больных, после чего незамедлительно последовала отмена препарата.

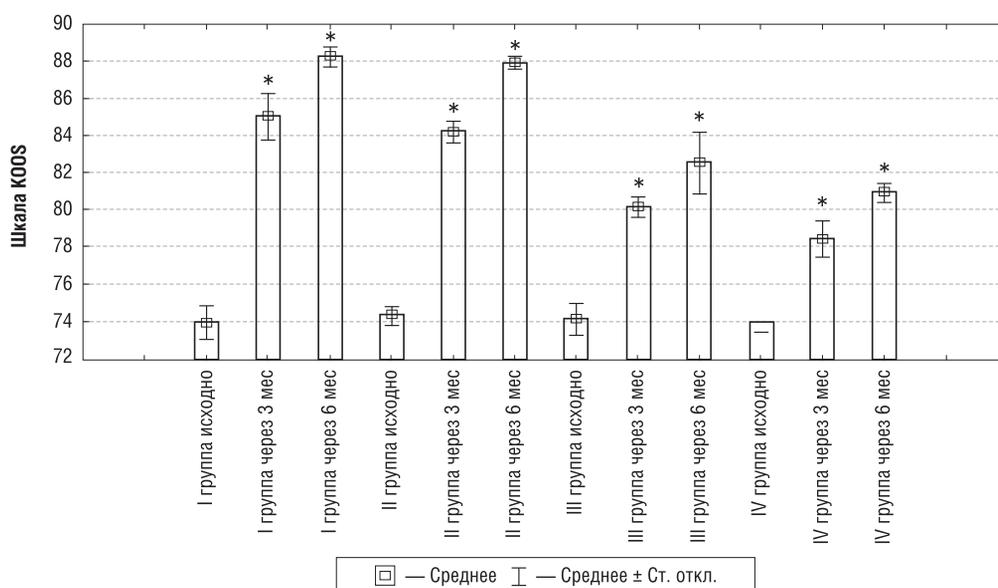


Рис. 2. Изменение параметров шкалы KOOS при оценке вторичного остеоартроза коленных суставов у больных ревматоидным артритом на фоне 3- и 6-месячного курса лечения

Примечание. * — $p=0,02$.

Таблица 2. Анализ частоты повторных обращений за медицинской помощью в отдаленном периоде

Число повторных амбулаторных обращений	I группа (n=47)	II группа (n=44)	III группа (n=43)	IV группа (n=46)
	0,56±0,18*	0,64±0,13*	0,91±0,14*	0,95±0,12*

Примечание. * — $p=0,0007$.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Включение ингибитора ИЛ 1 в комплексное лечение вторичного ОА позволило уменьшить болевой синдром по ВАШ в движении, в покое и при пальпации. Снижение боли в суставах сопровождалось улучшением функционального состояния коленного сустава по индексу KOOS и повышением качества жизни по HAQ. Наиболее значимые результаты получены через 6 мес терапии.

Обсуждение основного результата исследования

Появившийся в последние годы препарат диацереин уже доказал свою клиническую эффективность во многих многоцентровых исследованиях. В настоящее время диацереин является перспективным препаратом для лечения различных форм ОА.

Несколько клинических исследований доказывают преимущества применения диацереина по сравнению с плацебо и нестероидными противовоспалительными препаратами в отношении снижения боли и улучшения функционального состояния коленных и тазобедренных суставов [27]. Курсовой прием диацереина оказывает воздействие на цитокиновые звенья патогенеза у больных с патологией костно-мышечной системы, демонстрируя противовоспалительный и анальгетический эффекты [27].

Клиническая эффективность применения ингибитора ИЛ 1 в лечении ОА подтверждена многочисленными исследованиями зарубежных авторов. Анализ результатов терапии 2069 пациентов показал достоверное уменьшение боли по сравнению с плацебо у больных гонартрозом и коксартрозом, при этом у последних отмечено структурно-модифицирующее действие препарата [28].

Вместе с тем исследований, направленных на изучение возможностей применения препарата в лечении вторичного ОА, не проводилось. В работе М. Milenkovic и М. Djordjevic отмечен клинический эффект внутрисуставного использования гиалуроновой кислоты в лечении вторичного ОА на фоне РА [29]. Ввиду важной роли ИЛ 1 в патогенезе ОА и РА особый интерес представляет изучение влияния диацереина на клиническое течение вторичного ОА при РА в комплексной терапии.

Из методов лечения, дополняющих медикаментозное воздействие на заболевания костно-мышечной системы, одну из ведущих позиций занимает лазерная терапия, которая при отсутствии противопоказаний может проводиться в любых условиях. Неинвазивный и доступный способ воздействия с использованием НИЛИ применя-

ется как при хроническом течении заболевания, так и в период обострения. Отмечается также хорошая приверженность пациентов данному способу лечения. НИЛИ описывается как метод альтернативного лечения больных ОА и РА уже более 20 лет. Противоречивые данные, с позиции доказательной медицины, об эффективности лазерной терапии в лечении суставного синдрома ревматологических пациентов является основной причиной, по которой данный вид лечения не включен в зарубежные рекомендации.

Применение ингибитора ИЛ 1 в настоящем исследовании в лечении вторичного ОА у больных РА на фоне базисного лечения основного заболевания показало высокую клиническую эффективность: статистически достоверно уменьшилась боль по ВАШ ($p<0,001$). Кроме того, улучшилось качество жизни пациентов по данным опросника HAQ ($p<0,01$).

Наиболее выраженная положительная динамика установлена через 6 мес применения ингибитора ИЛ 1, отмечены статистически достоверные различия по сравнению с пациентами, находящимися только на базисной терапии, или при комбинации с НИЛИ. Хотя уже через 2 нед терапии отмечена тенденция к улучшению изучаемых показателей, отчетливая статистически значимая динамика наблюдалась только к концу третьего месяца лечения.

По результатам сравнительного анализа, применение ингибитора ИЛ 1 на фоне базисного лечения улучшает функциональное состояние коленного сустава (по данным опросника KOOS).

Заключение

Комплексная терапия вторичного ОА при РА с использованием ингибитора ИЛ 1 на протяжении 6 мес способствовала клиническому улучшению течения заболевания за счет уменьшения болевого синдрома по ВАШ, повышения функционального состояния коленного сустава и качества жизни по индексам KOOS и HAQ.

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости раннего выявления вторичного ОА у больных РА. Улучшение качества жизни таких пациентов может быть достигнуто путем применения нового терапевтического подхода с использованием ингибитора ИЛ 1 на фоне базисной терапии основного заболевания.

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, et al. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015;23(8):1233-1241. doi: 10.1016/j.joca.2015.03.036.
2. Rogers R, Shepstone L, Dieppe P. Is osteoarthritis a systemic disorder? *Arthr Rheum*. 2004;50:452-457. doi: 10.1002/art.20136.
3. Гордеев А.В., Галушко Е.А., Насонов Е.Л. Концепция мультиморбидности в ревматологической практике // *Научно-практическая ревматология*. — 2014. — №4. — С. 362-365. [Gordeev AV, Galushko EA, Nasonov EL. The concept of multimorbidity in rheumatologic practice. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014;52(4):362-365. (In Russ.)] doi: 10.14412/1995-4484-2014-362-365.

4. Radner H, Yoshida K, Smolen JS, et al. Multimorbidity and rheumatic conditions-enhancing the concept of comorbidity. *Nat Rev Rheumatology*. 2014;10(4):252–256. doi:10.1038/nrrheum.2013.212.
5. Kinne S, Patrick DL, Doyle DL. Prevalence of secondary conditions among people with disabilities. *Am J Publ Health*. 2004;94(3):443–445. doi: 10.2105/ajph.94.3.443.
6. Loo FAJVD, Joosten LAB, Van Lent PLEM, et al. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction: effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan induced arthritis. *Arthr Rheum*. 1995;38:164–172. doi: 10.1002/art.1780380204.
7. Tamura T, Shirai T, Kosaka N. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *Eur J Pharm*. 2002;448:81–87. doi: 10.1016/s0014-2999(02)01898-8.
8. Tamura T, Yokoyama T, Ohmori K. Effect of Diacerein on Indomethacin-induced gastric ulceration. *Pharmacol*. 2001;63:228–233. doi: 10.1159/000056138.
9. P127 A systematic meta-analysis trials with Diacerein in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2005;(13 suppl. 1):68. doi: 10.1016/s1063-4584(05)80472-8.
10. Наумов А.В. Эффективность и безопасность диацереина в терапии хронической боли при остеоартрите у пациентов с сердечно-сосудистой коморбидностью и противопоказаниями к НПВП // *Поликлиника*. — 2015. — №5(1). — С. 33–38. [Naumov AV. Effektivnost' i bezopasnost' diatsereina v terapii khronicheskoi boli pri osteoartrite u patsientov s serdechno-sosudistoi komorbidnost'yu i protivopokazaniyami k NPVP. *Poliklinika*. 2015;(5–1):33–38. (In Russ).]
11. Ведение больных остеоартритом и коморбидностью в общей врачебной практике. Клинические рекомендации консенсуса экспертов РФ / Сост. Наумов А.В., Алексеева Л.И., Верткин А.Л. — М., 2015. 36 с. [Vedenie bol'nykh osteoartritom i komorbidnost'yu v obshchei vrachebnoi praktike. *Klinicheskie rekomendatsii konsensusa ekspertov RF*. Ed by Naumov A.V., Alekseeva L.I., Vertkin A.L. Moscow; 2015. 36 p. (In Russ).]
12. Мартынов А.И., Наумов А.В., Верткин А.Л. и др. Ведение больных остеоартритом с коморбидностью в общей врачебной практике: мнение экспертов, основанное на доказательной медицине // *Лечащий врач*. — 2015. — №4. — С. 39–46. [Martynov AI, Naumov AV, Vertkin AL, et al. Vedenie bol'nykh osteoartritom s komorbidnost'yu v obshchei vrachebnoi praktike: mnenie ekspertov, osnovannoe na dokazatel'noi meditsine. *Lechashchii vrach*. 2015;4:39–46. (In Russ).]
13. Гейниц А.В., Москвин С.В., Ачилов А.А. Внутривенное лазерное облучение крови. — Тверь: Триада; 2008. 144 с. [Geinits AV, Moskvina SV, Achilov AA. *Vnutrivennoe lazernoe obluchenie krvi*. Tver: Triada; 2008. 144 p. (In Russ).]
14. Бодрова РА. Локальная терапия суставного синдрома. Патогенетический подход к назначению аппликационной терапии и физических факторов. Учебно-методическое пособие. — Казань; 2005. 36 с. [Bodrova RA. *Lokal'naya terapiya sustavnogo sindroma. Patogeneticheskii podkhod k naznacheniyu applikatsionnoi terapii i fizicheskikh faktorov. Uchebno-metodicheskoe posobie*. Kazan; 2005. 36 p. (In Russ).]
15. Буйлин В.А. Магнитолазерная терапия заболеваний суставов и позвоночника. — М.: *Авансед Солоюзинз*; 2011. 86 с. [Builin VA. *Magnitolazernaya terapiya zabolovaniy sustavov i pozvonochnika*. Moscow: Advansed Solyushinz; 2011. 86 p. (In Russ).]
16. Агаев Б.А., Гейниц А.В., Мамедов М.М. Руководство по эффективному использованию лазерных технологий в хирургии доброкачественной патологии печени и желчевыводящих путей. — Баку: *Китаб адеми*; 2010. 148 с. [Agaev BA, Geinits AV, Mamedov MM. *Rukovodstvo po effektivnomu ispol'zovaniyu lazernykh tekhnologii v khirurgii dobrokachestvennoi patologii pecheni i zhelchevyvodyashchikh putei*. Baku: Kitab alemi; 2010. 148 p. (In Russ).]
17. Brosseau L, Welch V, Wells G, et al. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *J Rheumatol*. 2000;27(8):1961–1969.
18. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1988;31(3):315–324.
19. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1580–1588. doi: 10.1136/ard.2010.138461.
20. Restrictions of the use of diacerein containing medicines. Restrictions intended to limit risks of severe diarrhea and effects on the liver. 2014. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Diacerein/European_Commission_final_decision/WC500173144.pdf (Accessed: 2014 Sept 15).
21. Ревматология. Клинические рекомендации / Под ред. Насонова Е.Л. — М.: *ГЭОТАР-Медиа*; 2010. 752 с. [Rheumatology. *Clinical guidelines*. Ed by Nasonova E.L. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. 752 p. (In Russ).]
22. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological diseases — modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2013;73(3):492–509. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204573.
23. Smolen J, Aletaha D, Bijlsma J, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendation of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(4):631–637. doi: 10.1136/ard.2009.123919.
24. Jordan KM, Arden NK, Doherty M, et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis. Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies, including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2003;62:1145–1155. doi: 10.1136/ard.2003.011742.
25. Орлов А.И. Прикладная статистика. Учебник для вузов. — М.: *Экзамен*; 2006. 672 с. [Orlov AI. *Prikladnaya statistika. Uchebnik dlya vuzov*. Moscow: Ekzamen; 2006. 672 p. (In Russ).]
26. Феллер В. Введение в теорию вероятностей и ее приложения. Пер. с англ. — М.: *Мир*; 1984. Т.1–2. 1280 с. [Feller V. *Vvedenie v teoriyu veroyatnostei i ee prilozheniya*. Transl. Moscow: Mir; 1984. Vol.1–2. 1280 p. (In Russ).]
27. Pavelka K, Trc T, Karpas K, et al. The efficacy and safety of Diacerein in the treatment of painful osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study with primary end points at two months after the end of a three month treatment period. *Arthr Rheum*. 2007;56:4055–4064. doi: 10.1002/art.23056.
28. Fidelix TS, Macedo CR, Maxwell LJ, et al. Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane database of systematic reviews*. 2014;2(2):CD005117. doi:10.1002/14651858.CD005117.pub3.
29. Milenkovic M, Djordjevic M. AB0991 Efficiency of the intra-articular application of hyaluronic acid in the treatment of secondary osteoarthritis of the knee in patients with rheumatoid arthritis and in patients with primary osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(3):695. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-eular.991.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Стародубцева Ирина Александровна, кандидат медицинских наук, докторант кафедры пропедевтики внутренних болезней ВГМУ им. Н.Н. Бурденко

Адрес: 394036, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10, e-mail: starodubtsevairina1@gmail.com

Васильева Людмила Валентиновна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой терапии ИДПО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко

Адрес: 394036, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10, e-mail: sia_1111@mail.ru

Никитин Анатолий Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней ВГМУ им. Н.Н. Бурденко

Адрес: 394036, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10, e-mail: sia_1111@mail.ru

DOI: 10.15690/vramn656

П.Н. Кравченко¹, Г.А. Жулай¹, А.В. Чуров¹, Е.К. Олейник¹, В.М. Олейник¹,
О.Ю. Барышева², Н.Н. Везикова², И.М. Марусенко²

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Российская Федерация

² Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Российская Федерация

Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом

Обоснование. Ревматоидный артрит (РА) представляет собой воспалительное аутоиммунное заболевание, связанное с нарушением Т-клеточной толерантности в организме. Контроль за активацией Т-клеток и развитием аутоиммунных реакций обеспечивают регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты (Treg), которые вызывают супрессию иммунного ответа. Вместе с тем в литературе нет единого мнения о содержании этих клеток в периферической крови у больных РА и о их роли в патогенезе заболевания. **Цель исследования.** Оценить количество регуляторных Т-клеток (Treg) периферической крови больных РА по экспрессии молекул CD4, CD25, CD127, FOXP3, а также уровень экспрессии двух функциональных молекул (CTLA-4 и CCR4) Treg-клетками больных РА. **Методы.** Исследовали образцы периферической крови больных РА (в возрасте 65,5 года [54; 68,3]) и здоровых доноров (в возрасте 58 лет [44; 66]). Содержание клеток и экспрессию молекул оценивали методом проточной цитометрии. **Результаты.** Изучены образцы крови 36 больных РА и 20 здоровых доноров. Число клеток с Treg-ассоциированными фенотипами CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/-} у больных РА было больше по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Также у больных РА отмечено повышенное число CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих FOXP3 ($p < 0,01$), что можно связать с увеличением популяции CD4⁺FOXP3⁺CD25⁻ лимфоцитов ($p < 0,05$), тогда как содержание CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺Treg-клеток при РА было на уровне контроля. У больных РА экспрессия CTLA-4 Treg-клетками не отличалась от контроля, в то время как уровень экспрессии хемокинового рецептора CCR4, обеспечивающего миграцию лимфоцитов в воспаленные и барьерные ткани, значительно возрастал ($p < 0,01$). **Заключение.** При РА наблюдается увеличение содержания Т-клеток с высокой экспрессией антигена CD25, который является маркером как активированных клеток, так и Treg-лимфоцитов. Однако содержание Treg-клеток у больных РА было на уровне контроля. Повышенная экспрессия хемокинового рецептора CCR4 на Т-клетках пациентов с РА позволяет предположить значительное усиление миграции CD4-лимфоцитов с периферии к местам воспаления, в частности в синовиальную жидкость суставов.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки, ревматоидный артрит, FOXP3, CD127, CCR4, CTLA-4.

(Для цитирования: Кравченко П.Н., Жулай Г.А., Чуров А.В., Олейник Е.К., Олейник В.М., Барышева О.Ю., Везикова Н.Н., Марусенко И.М. Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом. *Вестник РАМН.* 2016;71(2):148–153. doi: 10.15690/vramn656)

P.N. Kravchenko¹, G.A. Zhulai¹, A.V. Churov¹, E.K. Oleinik¹, V.M. Oleinik¹,
O.Yu. Barysheva², N.N. Vezikova², I.M. Marusenko²

¹ Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

² Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

Subpopulations of Regulatory T-lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory rheumatic disease associated with a dysfunction of the T cell-mediated tolerance and leading to the disability of working population. The regulatory CD4⁺ T cells play an important role in the regulation of autoimmunity and can suppress immune responses. With that, there is no consensus on the content of these lymphocytes and their role in the pathogenesis of RA. **Objective:** The aim of the study was to assess the content of peripheral blood regulatory T cells (Treg) according to the expression of membrane markers CD4, CD25, CD127 and intracellular FOXP3 marker, as well as the expression of two functional molecules (CTLA-4 and CCR4) in Treg cells of patients with RA. **Methods:** Peripheral blood samples of RA patients (median age 65,5 years [54;68,3]) and healthy controls (median age 58 years [44; 66]) were analyzed. Cell count and the expression level of molecules were assessed by flow cytometry. **Results:** Peripheral blood samples of 36 RA patients and 20 healthy donors were analyzed. The number of the cells with Treg-associated phenotypes CD4⁺CD25^{hi} and CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/-} was higher in RA patients in comparison with healthy donors. Increased levels of RA CD4⁺ T cells expressing FOXP3 were also observed. This may be due to increasing in the number of CD4⁺FOXP3⁺CD25⁻ lymphocytes, whereas the content of RA CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ Treg cells was at the level of the control. The expression of the functional molecule CTLA-4 in Treg cells of patients with RA was not different from the control, while the expression level of the chemokine receptor CCR4 which provides migration of lymphocytes at sites of inflammation and barrier tissues was significantly increased in RA patients. **Conclusion:** Increase in the levels of certain Treg-associated lymphocyte populations were detected in peripheral blood of RA patients. During the natural course of RA, alterations in the level of the chemokine receptor CCR4 might indicate the enhanced lymphocyte migration.

Key words: regulatory T cells, rheumatoid arthritis, FOXP3, CD127, CCR4, CTLA-4.

(For citation: Kravchenko PN, Zhulai GA, Churov AV, Oleinik EK, Oleinik VM, Barysheva OYu, Vezikova NN, Marusenko IM. Subpopulations of Regulatory T-lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(2):148–153. doi: 10.15690/vramn656)

Обоснование

Методы

Ревматоидный артрит (РА) относится к числу наиболее распространенных и тяжелых аутоиммунных заболеваний, связанных с нарушением иммунологической толерантности. Ключевую роль в развитии РА играет популяция Т-хелперов, которые участвуют в развитии воспаления с помощью хемокинов и цитокинов. Важную роль в предотвращении развития аутоиммунных реакций и поддержании гомеостаза выполняет популяция регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов (Treg) [1], которые проявляют супрессорную активность по отношению к другим иммунцитам. Поэтому изучение развития и функционального состояния пула Treg-клеток при РА представляется очень важным для понимания патогенеза этого заболевания.

Для характеристики фенотипа Treg-клеток применяют ряд молекулярных маркеров [2, 3]. Однако в большинстве случаев при активации эти маркеры могут экспрессироваться и на эффекторных Т-лимфоцитах.

На сегодняшний день самым надежным маркером для определения таких клеток служит транскрипционный фактор FOXP3 (Forkhead Box P3), который необходим для развития и функционирования Treg-клеток. Еще одной особенностью Treg-клеток является конститутивная повышенная экспрессия α-цепи рецептора интерлейкина (Interleukin, IL) 2 (CD25) [2]. Также для идентификации Treg-клеток стали использовать молекулу CD127 (α-цепи рецептора IL 7), поскольку было обнаружено, что ее экспрессия обратно пропорциональна экспрессии транскрипционного фактора FOXP3 [3].

Для реализации своих функций Treg-клетки используют различные механизмы [4]. Один из механизмов Treg-опосредованной супрессии иммунного ответа связан с понижением костимуляции посредством экспрессии цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена 4 (CTLA-4). Эта молекула является негативной костимуляторной молекулой, передающей клетке-мишени сигнал, ингибирующий ее активацию и пролиферацию. Известно, что Treg-клетки конститутивно экспрессируют эту молекулу, и что использование анти-CTLA-4 моноклональных антител отменяет подавление пролиферации эффекторных Т-клеток *in vitro* [4]. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению Treg-лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях, по-прежнему нет однозначных данных о содержании и роли этих клеток в периферической крови больных РА [5–9]. Отмечается увеличение количества Treg-клеток в синовиальной жидкости сустава у больных РА [5, 9]. Кроме того, Treg-клетки экспрессируют целый ряд рецепторов хоминга, к которым относятся CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8 и др., предположительно участвующие в привлечении Treg-клеток в места воспаления. Предполагается, что ассоциированный с Treg-клетками хемокиновый рецептор CCR4 может обеспечивать такую миграцию периферических Treg-клеток [10].

Цель данного исследования — определение количества регуляторных Т-клеток (Treg) периферической крови больных РА на основе анализа экспрессии молекулярных маркеров CD4, CD25, CD127, FOXP3, а также уровня экспрессии функциональных молекул Treg-клеток больных РА — CTLA-4 и CCR4; определение содержания отдельных Treg-ассоциированных фенотипов в периферической крови больных РА.

Дизайн исследования

Данное исследование является сравнительным нерандомизированным.

Критерии соответствия

В наблюдаемую группу входили пациенты обоего пола в возрасте от 38 до 80 лет. Диагноз РА устанавливался на основании критериев Американской коллегии ревматологов (American College of Rheumatology, ACR, 1987), которые также используются в качестве основных критериев в РФ. Контрольную группу составили относительно здоровые лица в возрасте от 25 до 70 лет, у которых в анамнезе отсутствовали указания на аутоиммунные, сердечно-сосудистые заболевания, аллергии, онкопатологии, персистирующие вирусные инфекции. К критериям исключения относили также острые респираторные вирусные инфекции, перенесенные в течение последнего месяца до момента взятия образцов периферической крови.

Условия проведения

Исследование проведено на базе ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН (ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск) на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН. Обследование больных и взятие клинического материала проводили в ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» (Петрозаводск).

Продолжительность исследования

Исследование проведено в период с сентября 2014 по апрель 2015 г.

Исходы исследования

В качестве основного оцениваемого результата рассматривали содержание Treg-клеток с фенотипами CD4⁺CD25^{hi}, CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/-}, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, CD4⁺FOXP3⁺CD25⁻ в периферической крови больных РА по сравнению со здоровыми донорами. Дополнительно оценивали уровень экспрессии молекул CTLA-4 и CCR4, ассоциированных с Treg-клетками.

Методы регистрации исходов

Взятие крови проводили из локтевой вены в стандартные вакуумные пробирки объемом 4 мл, содержащие коагулянт. Цельную кровь использовали для анализа лимфоцитов методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Окрашивание клеток выполняли при помощи моноклональных антител CD4-FITC, CD4-PC7, CTLA-4-PE, CCR4-PE, CD25-PC5, CD127-PC7 (Beckman Coulter, США), FOXP3-FITC (eBioscience, США), а также соответствующих изотипических контролей. Внутриклеточное окрашивание антителами к FOXP3 проводили с применением набора реагентов для пермеабиллизации и фиксации клеток (eBioscience, США). Для анализа внутриклеточной экспрессии CTLA-4 использовали набор для пермеабиллизации IntraPrep (Beckman Coulter, США). Для лизиса эритроцитов применяли реагент FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США).

Этическая экспертиза

Для проведения исследования в соответствии с Хельсинкской декларацией было получено разрешение Комитета по медицинской этике при Министерстве здраво-

охранения и социального развития Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 25 от 12.02.2013 г.), а также информированное согласие от участников исследования.

Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью компьютерного пакета прикладных программ Statistica 6.0. Применяли стандартные методы вычисления средних величин и стандартных отклонений ($M \pm SD$). Достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали за 0,05.

Результаты

Участники исследования

В работе изучено 36 образцов периферической крови больных РА, возраст которых по медиане составил 65,5 [54; 68,25] лет. В исследовании принимали участие больные со II и III стадией заболевания по индексу активности болезни DAS28 (Disease Activity Score), у которых преобладала (94%) серопозитивная форма РА.

Все больные получали терапию базисными противовоспалительными препаратами. Базисная терапия включала преимущественно метотрексат, а также сульфасалазин. Терапия назначалась врачами согласно стандартной схеме лечения, принятой в данном клиническом учреждении. Контрольную группу составили 20 здоровых доноров в возрасте 58,0 [44; 66] лет.

Основные результаты исследования

Для определения популяции Treg-клеток широко используются мембранные молекулы CD25 и CD127 (рис. 1, А, Б). В работе проанализировано содержание Treg-клеток с фенотипами $CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low/-}$ в периферической крови больных РА ($n=14$) и здоровых доноров ($n=20$) и отмечено их увеличение у пациентов с РА по сравнению с контролем (рис. 2).

Поскольку привлечение клеток из кровотока к местам локального воспаления обеспечивается хемокинами, было интересно оценить уровень экспрессии ассоциированного с Treg-клетками хемокинового рецептора CCR4: так, результаты проведенного исследования продемонстрировали более высокий его уровень у больных РА ($p<0,01$) (табл.). Повышенная экспрессия CCR4 наблюдалась также на $CD4^+$ Т-лимфоцитах у больных РА (см. табл.), в то время как экспрессия этого

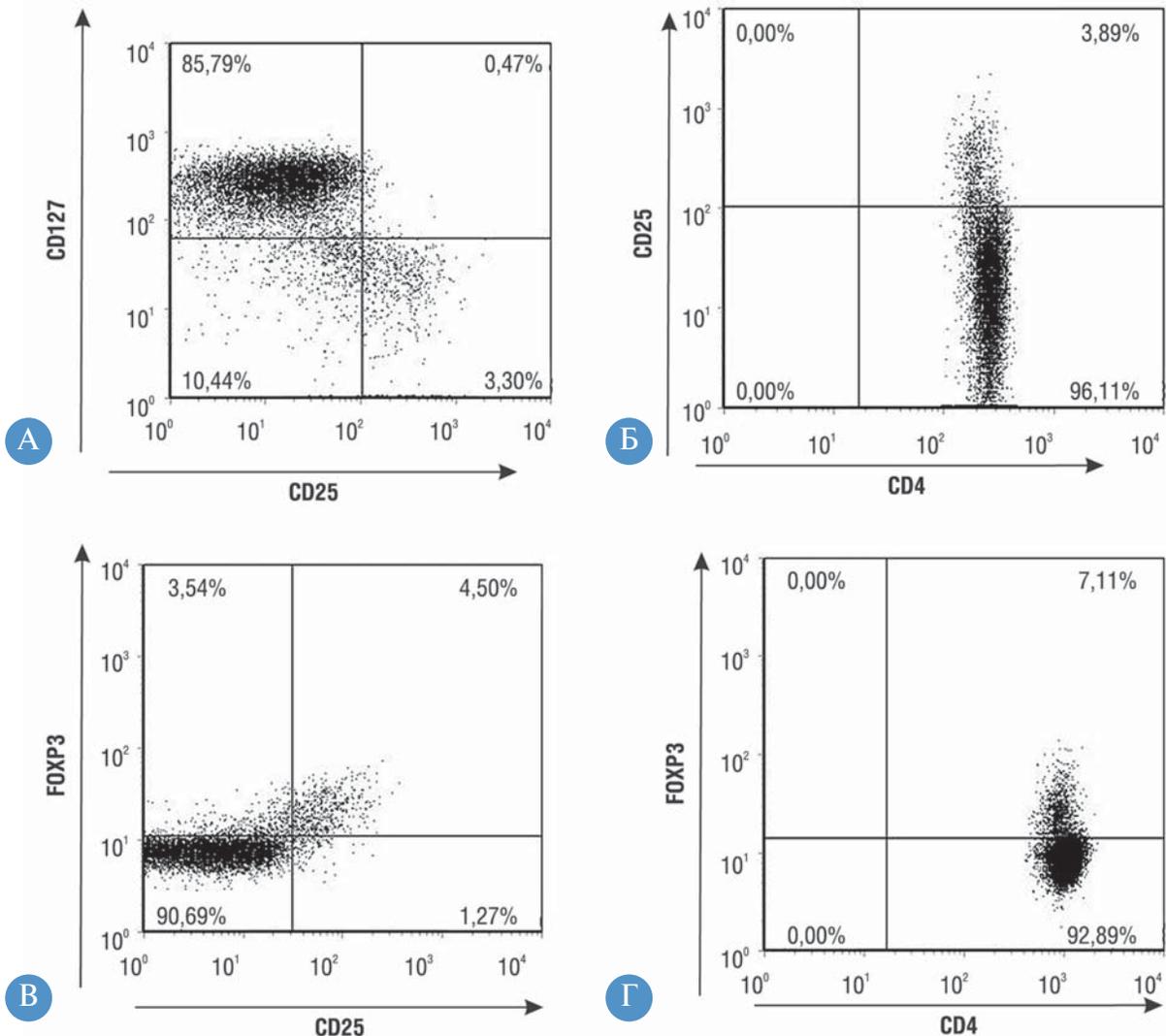


Рис. 1. Экспрессия Treg-ассоциированных молекул на $CD4^+$ Т-лимфоцитах периферической крови здорового донора
Примечание. Представлены индивидуальные значения относительного числа лимфоцитов после гейтирования по CD4: А — $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low/-}$; Б — $CD4^+CD25^{hi}$; В — $CD4^+CD25^+FOXP3^+$; Г — $CD4^+FOXP3^+$.

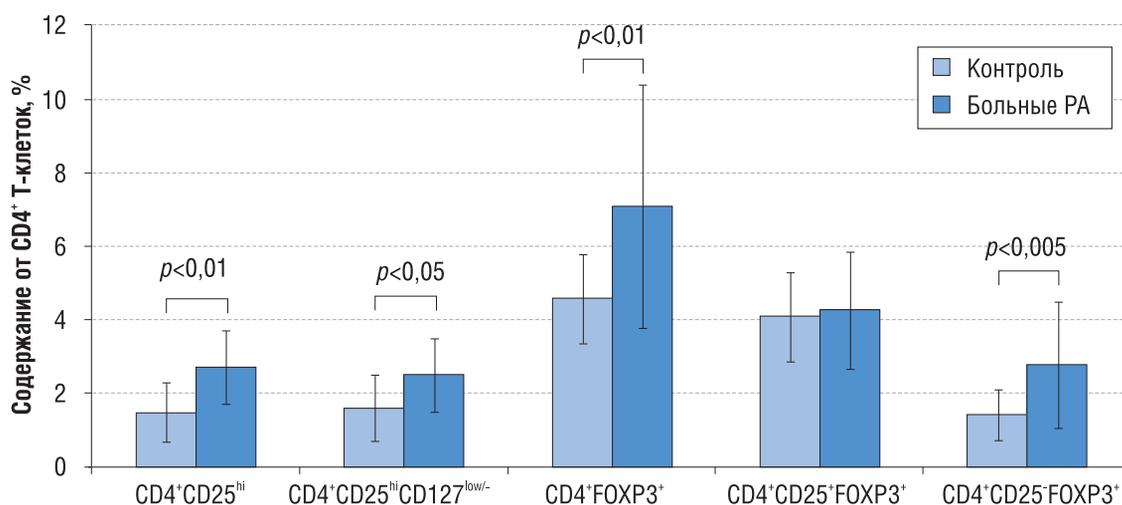


Рис. 2. Содержание CD4⁺ Т-клеток с Treg-ассоциированными фенотипами в периферической крови здоровых доноров (контроль) и у больных РА

Примечание. Данные представлены как M±SD, уровень значимости оценивали по критерию Манна–Уитни.

Таблица. Относительный уровень экспрессии CCR4 на лимфоцитах периферической крови больных ревматоидным артритом (РА)

Показатель	CD4 ⁺ Т-клетки		
	CCR4 ⁺ /CD4 ⁺	CCR4 ⁺ /(CD4 ⁺ CD25 ^{hi})	CCR4 ⁺ /(CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{low/-})
Контроль (n=20)	39,92±8,5	78,42±9,4	72,43±14,2
Больные РА (n=14)	53,06±12,7*	90,21±4,2*	87,7±6,6*

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контролем при p<0,01. Данные представлены как M±SD.

рецептора относительно общего числа лимфоцитов была на уровне контроля (31,72±10,2 и 32,31±7,4%, соответственно).

Развитие аутоиммунной реакции сопровождается не только изменением содержания Treg-клеток, но и нарушением их функциональной активности [1], что может быть связано с уровнем экспрессии некоторых Treg-ассоциированных молекул, важных для проявления супрессорной активности, в частности с изменением уровня экспрессии СТЛА-4. По нашим данным, у больных РА экспрессия антигена СТЛА-4 в CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/-} Т-клетках составила 90,76±7,0 и 90,78±7,1% от CD4⁺ Т-клеток, соответственно, и, несмотря на повышенное содержание этих клеток у больных РА, была на уровне контроля (95,6±2,9 и 94,55±2,8%, соответственно). В доступной литературе отмечены колебания уровня экспрессии этой молекулы у больных РА [8, 11, 12].

Помимо этого, в работе проанализирована экспрессия транскрипционного фактора FOXP3 (рис. 1, В, Г), необходимого для поддержания пула Treg-клеток на периферии и важного для реализации их супрессорной функции [2]. У больных РА (n=22) число CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих FOXP3⁺, было выше, тогда как относительное содержание CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток соответствовало уровню контроля (n=20; см. рис. 2). Интересно, что экспрессия FOXP3 была увеличена также в клетках, не экспрессирующих антиген CD25: содержание CD4⁺FOXP3⁺CD25⁻ Т-клеток при РА было выше, чем в контроле (см. рис. 2). В связи с этим была проведена оценка экспрессии FOXP3 Т-хелперами больных и здоровых лиц в гейтах CD25^{hi} и CD25⁺: оказалось, что уровень экспрессии FOXP3 у больных РА в этих клетках снижен (CD25^{hi} — 82,17±14,2%, CD25⁺ — 39,21±12,0%) по сравнению с контролем (CD25^{hi} — 93,54±4,12%, CD25⁺ — 65,28±17,6%; p<0,05).

Обсуждение

Ревматоидный артрит — это системное воспалительное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, связанное с нарушением Т-клеточной толерантности в организме. Важную роль в поддержании толерантности и предотвращении аутоиммунизации играют Treg-клетки. Так, в экспериментальных исследованиях было показано, что удаление Treg-клеток приводит к экспансии Т-эффекторных лимфоцитов с последующим развитием аутоиммунных расстройств [2]. Поэтому предполагают, что патогенез РА может быть связан с нарушением иммунной регуляции, опосредованным недостаточностью Treg-клеток. Данные литературы о содержании этих клеток в периферической крови больных РА неоднозначны [5–9]. Данные, полученные в результате нашего исследования, показали, что в периферической крови пациентов с РА увеличено число клеток с фенотипами CD4⁺CD25^{hi}, CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/-}, CD4⁺FOXP3⁺. В то же время относительное число CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток было на уровне контроля (см. рис. 2).

Повышение экспрессии молекулы CD25, так же как и снижение экспрессии CD127, происходит в период активации Т-лимфоцитов. N.E. Aerts с соавт. [13] сообщают, что не все CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Т-клетки, выделенные из крови больных РА, могут обладать супрессорными свойствами: экспрессия FOXP3 наблюдается при стимуляции и активации некоторых популяций эффекторных лимфоцитов, которые не относятся к Treg-клеткам [1, 14], что с учетом особенностей патогенеза РА усложняет идентификацию минорной популяции Treg-клеток. Исходя из этого, можно предположить, что использование фенотипов CD4⁺CD25^{hi}, CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} и CD4⁺FOXP3⁺ недостаточно точно отражает уровень Treg-клеток при РА, поскольку

они могут включать в себя значительную долю активированных CD4⁺ Т-клеток. Повышенный уровень клеток с такими фенотипами у больных РА наблюдали и другие авторы [5, 11]. При этом увеличение Трег-клеток было отмечено не только на периферии, но и в синовиальной жидкости пораженных суставов [5, 9]. Миграцию клеток к местам воспаления обеспечивают хемокины. Предполагается, что секреция хемокинового рецептора CCR4, лигандами которого являются CCL22 и CCL17, позволяет Т-лимфоцитам и Трег-клеткам мигрировать к местам воспаления [10]. В пользу этого могут свидетельствовать полученные нами данные об усилении экспрессии CCR4 на Т-хелперах и Трег-клетках в периферической крови при РА. Среди немногочисленных исследований по изучению экспрессии CCR4 при РА известны данные Z. Jiao с соавт. [15], которые показали, что в привлечении периферических Трег-клеток в синовиальную жидкость сустава больных могут участвовать несколько хемокиновых рецепторов (CCR5, CXCR4), в том числе CCR4. Однако, помимо Трег-клеток, выполняющих защитную роль при РА, хемокиновый рецептор CCR4 может приводить и к увеличению миграции патогенных активированных клонов Т-хелперов.

Заключение

У больных РА выявлено повышенное содержание клеток с фенотипами CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/-}. При анализе количества CD4 Т-клеток, экспрессирующих FOXP3, было также от-

мечено их увеличение у больных РА, происходившее за счет нарастания CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺-лимфоцитов, тогда как число CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ Трег-клеток при РА было на уровне контроля. Повышенный уровень Трег-ассоциированных фенотипов CD4⁺CD25^{hi}, CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} и CD4⁺FOXP3⁺ у больных РА может быть связан с активацией Т-хелперов при развитии патологии. Также интерес представляет значительное увеличение экспрессии хемокинового рецептора CCR4 как на Трег-клетках, так и на CD4⁺ Т-лимфоцитах периферической крови больных РА. Мы предполагаем, что повышенная экспрессия хемокинового рецептора CCR4, по-видимому, способствует привлечению периферических Т-хелперов и Трег-клеток в синовиальную жидкость сустава больных.

Источник финансирования

Финансирование проекта осуществлялось на средства гранта Президента РФ (МК-3680.2015.7), РФФИ (№ 16-04-00567) и из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0011

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие иных явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+) CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):849–859. doi: 10.1038/nri2889.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490–500. doi: 10.1038/nri2785.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1693–1700. doi: 10.1084/jem.20060468.
- Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009;30(5):636–645. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.010.
- Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008;253(1-2):92–101. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.05.007.
- Kawashiri S-Y, Kawakami A, Okada A, et al. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}-Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2011;38(12):2517–2521. doi: 10.3899/jrheum.110283.
- Kim JR, Chae JN, Kim SH, Ha JS. Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease. *J Korean Med Sci.* 2012;27(9):1009–1013. doi: 10.3346/jkms.2012.27.9.1009.
- Kosmaczewka A, Ciszak L, Swierkot J, et al. Alterations in Both the Activatory and Inhibitory Potential of Peripheral Blood CD4+ T Cells in Rheumatoid Arthritis Patients Correlate with Disease Progression. *Pathol Oncol Res.* 2014;20(2):235–243. doi: 10.1007/s12253-013-9687-0.
- Moradi B, Schnatzer P, Hagmann S, et al. CD4+CD25+/highCD127low/- regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints — analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(2):R97. doi: 10.1186/ar4545.
- Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):119–130. doi: 10.1038/nri2916.
- Alvarez-Quiroga C, Abud-Mendoza C, Doniz-Padilla L, et al. CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol.* 2011;31(4):588–595. doi: 10.1007/s10875-011-9527-5.
- Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(49):19396–19401. doi: 10.1073/pnas.0806855105.
- Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, et al. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008;251(2):109–115. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.04.008.
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009;30(6):899–911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019.
- Jiao Z, Wang W, Jia R, et al. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2007;36(6):428–433. doi: 10.1080/03009740701482800.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Кравченко Полина Николаевна, младший научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «ИБ КарНЦ» РАН
 Адрес: 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11, тел.: +7 (8142) 76-98-10,
 e-mail: k-polina13@mail.ru

Жулай Галина Анатольевна, младший научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «ИБ КарНЦ» РАН
 Адрес: 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11, тел.: +7 (8142) 76-98-10,
 e-mail: zhgali-111@rambler.ru

Чуров Алексей Викторович, кандидат биологических наук, научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «ИБ КарНЦ» РАН
 Адрес: 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11, тел.: +7 (8142) 76-98-10,
 e-mail: achurov@yandex.ru

Олейник Евгения Константиновна, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, руководитель группы иммунологии ФГБУН «ИБ КарНЦ» РАН
 Адрес: 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11, тел.: +7 (8142) 76-98-10,
 e-mail: ole@krc.karelia.ru

Олейник Виктор Михайлович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «ИБ КарНЦ» РАН
 Адрес: 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11, тел.: +7 (8142) 76-98-10,
 e-mail: scigraph@yandex.ru

Барышева Ольга Юрьевна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры госпитальной терапии медицинского института ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»
 Адрес: 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33, тел.: +7 (8142) 76-44-45,
 e-mail: olgar@karelia.ru

Везикова Наталья Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой госпитальной терапии медицинского института ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»
 Адрес: 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33, тел.: +7 (8142) 76-42-88,
 e-mail: vezikov23@mail.ru

Марусенко Ирина Михайловна, доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной терапии медицинского института ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»
 Адрес: 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33, тел.: +7 (8142) 77-31-78,
 e-mail: feva@karelia.ru

Проблема ожирения: современные тенденции в России и в мире

Обзор литературы представляет результаты современных эпидемиологических исследований ожирения в России и за рубежом с учетом гендерно-возрастных, этнических и социально-географических факторов. Показан рост распространенности ожирения среди различных категорий населения, включая детей и подростков. Проанализированы риски нарушения здоровья человека с возможной инвалидизацией и смертностью вследствие избыточной массы тела и ожирения. Среди многих факторов этиопатогенеза ожирения подчеркнута ведущая роль нарушения энергетического баланса вследствие несоответствия потребляемой с пищей и расходуемой энергии, что особенно актуально на фоне прогрессирующей гипокинезии во всех сферах жизни современного человека. Уделено внимание анализу экологических факторов, возрастающей урбанизации и социально-экономических условий жизни населения. Отмечена принципиальная значимость мультидисциплинарного подхода в разработке профилактических и лечебно-реабилитационных программ. Охарактеризовано влияние экономического фактора в развитии нарушений углеводного обмена. Подчеркнута важная роль государства в разработке межотраслевых программ оздоровления населения, включающих мероприятия по улучшению экологической обстановки, изменению антропогенной среды, связанной с двигательной активностью. Обозначены приоритетные направления комплексных программ профилактики и лечения ожирения, среди которых оптимизация двигательного режима, коррекция рациона питания, повышение мотивации населения к ведению здорового образа жизни, занятиям физкультурой и спортом, а также повышение личной ответственности человека за свое здоровье.

Ключевые слова: ожирение, избыточный вес, этиология, распространенность, осложнения.

(Для цитирования: Разина А.О., Руненко С.Д., Ачкасов Е.Е. Проблема ожирения: современные тенденции в России и в мире. Вестник РАМН. 2016;71(2):154–159. doi: 10.15690/vramn655)

Введение

В настоящее время ожирение рассматривается наиболее значимой проблемой медицины, поскольку представляет собой хроническое заболевание, распространенное как среди взрослых, так и в детской популяции [1, 2]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила ожирение и избыточный вес как «патологическое или чрезмерное накопление жира, которое может негативно повлиять на здоровье» [3] и объявила эту патологию глобальной эпидемией.

Классификация

Для классификации ожирения во многих странах, в том числе и в России, используется индекс массы тела

(ИМТ), рассчитываемый по формуле: масса (кг) / рост (м²). При этом ИМТ ≥ 25 указывает на избыточную массу, а ИМТ ≥ 30 — на ожирение [4].

Многие специалисты относят избыточную массу тела и ожирение к сложным, многофакторным, мультигенным расстройствам, эпидемиология и частота которых тесно связаны с географическими, социально-экономическими, а также психосоциально-культурными условиями жизни [5–7]. Так, до недавнего времени считали, что проблема ожирения актуальна для стран с высоким уровнем жизни (до 10 млн детского населения), однако количество страдающих от избыточного веса и ожирения детей растет и в странах с низким уровнем доходов, особенно среди проживающих в городских условиях (более 30 млн) [4, 5].

A.O. Razina, S.D. Runenko, E.E. Achkasov

Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Obesity: Current Global and Russian Trends

The review of literature presents the results of recent epidemiological studies in obese people in Russia and abroad taking into account gender, age, ethnic, social, and geographical factors. The increase of obesity prevalence among different population groups including children and adolescents was registered. The risks of health problems associated with overweight and obesity probably leading to disability and mortality were analyzed. It was shown that the energy imbalance played a key role in the etiopathogenesis of obesity among many other factors. This occurs as a consequence of discrepancy between energy consumption and energy discharge especially under the conditions of hypokinesia in all spheres of modern life. Particular attention was paid to the analysis of environmental factors, increasing urbanization, and socio-economic conditions of modern life. The fundamental importance of a multidisciplinary approach in the development of prevention and treatment and rehabilitation programs was accentuated. The attention was paid to the role of economic factors in the development of carbohydrate metabolism disorders. The important role of the government was shown in the development of health improvement programs including improvement of the environmental situation, change in anthropogenic environment due to physical activity. The preferred direction of comprehensive programs of prevention and treatment of obesity were defined including optimization of the motor regime, diet correction, increasing the motivation to healthy lifestyle, physical education and sports, as well as increasing the individual's personal responsibility for their health.

Key words: obesity, overweight, etiology, prevalence, complications.

(For citation: Razina AO, Runenko SD, Achkasov EE. Obesity: Current Global and Russian Trends. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2016;71(2):154–159. doi: 10.15690/vramn655)

Этиология

Главную причину развития и прогрессирования избыточного веса и ожирения ученые видят в нарушении энергетического баланса между потребляемыми и расходуемыми калориями [4, 6, 8, 9], что связано с высококалорийным питанием, нарушением пищевого поведения, увеличением размеров порций, повышенным содержанием в пище жиров и сахаров, низким содержанием витаминов, минералов и других микроэлементов [8, 10–12]. Другим важным патогенетическим фактором развития ожирения и избыточной массы тела считают сидячий образ жизни, низкую физическую активность и прогрессирующую гипокинезию во всех сферах жизни современного человека [7, 9, 13, 14].

Значительное повышение распространенности ожирения в последние 30 лет — результат культурных и средовых влияний. Отчетливую тенденцию к снижению уровня физической активности населения многие исследователи связывают с малоподвижными формами работы, отдыха и развлечений, с изменением способов передвижения и возрастающей урбанизацией [8, 9, 15, 16].

Эпидемиология

По оценкам ВОЗ, с 1980 г. число пациентов с ожирением во всем мире практически удвоилось. По данным за 2014 г., более 1,9 млрд (39%) взрослых людей в возрасте от 18 лет и старше имеют избыточный вес, из них свыше 600 млн (13%) страдают ожирением; на долю мужчин приходится 11%, на долю женщин — 13% [4]. В докладе по ожирению отмечено, что «избыточная масса тела и ожирение столь распространены, что влияют на здоровье населения больше, чем традиционные проблемы здравоохранения». Распространенность этой патологии среди людей разного возраста, пола, социального статуса и этнической принадлежности с каждым годом растет во всем мире, особенно эта тенденция прослеживается в развитых странах Европы, Северной Америки, а также в Австралии и Японии. [4, 9]. Лидирующее положение среди территорий с высокой заболеваемостью на протяжении долгого времени сохраняли США, где до 34% населения имели избыточную массу тела, а 27% — ожирение [7].

В большинстве Европейских стран более 50% населения имеют лишний вес или страдают ожирением; в целом по Европе распространенность ожирения среди мужчин достигает 10–25%, у женщин — 10–30% [8, 17].

Число американцев с избыточным весом (ИМТ ≥ 25 кг/м²) и ожирением (ИМТ ≥ 30 кг/м²) в последние годы значительно увеличилось, а процент тех, кто от избыточного веса прогрессировал к ожирению, удвоился с 13,4% в 1960 г. до 30,9% в 2010 г. [18, 19]. В Канаде в период с 2007 по 2009 г. ожирение (ИМТ ≥ 30) было выявлено у 24,1% взрослого населения, в то время как в США этот показатель составлял 34,4% [20].

В Российской Федерации в настоящее время не менее 30% трудоспособного населения имеют избыточную массу тела, из них 25% страдают ожирением [21]. По данным ВОЗ от 2008 г., 59,8% взрослого населения (старше 20 лет) в России имели избыточный вес и 26,5% страдали ожирением. Распространенность избыточной массы тела была ниже среди мужчин (56,2%) по сравнению с женщинами (62,8%). Доля мужчин и женщин, страдающих ожирением, составила 18,6 и 32,9%, соответственно. По прогнозам, в 2020 г. 31% мужчин и 26% женщин будут страдать ожирением. Разработанная модель демонстрирует, что 33% мужчин и 26% женщин в Российской Федерации будут страдать ожирением уже к 2030 г. [22].

По многолетним наблюдениям, у 60% взрослых людей, страдающих ожирением, набор избыточной массы тела начинается в детском возрасте и характеризуется более выраженной прибавкой в весе и значительной частотой сопутствующих заболеваний, чем при ожирении, дебютировавшем во взрослом периоде [21]. Распространенность ожирения среди детей и подростков резко возросла во второй половине XX в., обозначив новую проблему для общественного здравоохранения многих стран. В 2013 г., по данным ВОЗ, 42 млн детей в возрасте до 5 лет имели избыточный вес или ожирение [4]. На сегодняшний день в развитых странах до 25% подростков имеют избыточную массу тела, а 15% страдают ожирением разной степени [9].

Отечественные специалисты в 2006 г. опубликовали отчет о распространенности ожирения среди подростков России. По данным большой научной работы, в возрасте 12–17 лет избыточную массу тела имели 11,8% подростков, из них ожирением страдали 2,3% [23]. Распространенность ожирения в популяции московских подростков в возрасте 12–18 лет составляла 4,8%, избыточной массы тела — 11,8% [24].

Анализ результатов биоимпедансных исследований состава тела в 2010–2012 гг. показал, что частота заболеваемости у детей и подростков 5–17 лет составила 6,8% для лиц мужского пола и 5,3% — для женского (у взрослых людей — 21,9 и 29,7%, соответственно), что существенно не отличалось от аналогичных показателей 2005 г. (9 и 6%), и данных для Москвы за 2010 г. (9,6 и 7,9%) [25, 26].

Все более широкая распространенность ожирения в детском возрасте вызвана экономическими и социальными изменениями в обществе. Для детей в странах с низким и средним уровнем дохода высока вероятность неправильного питания в антенатальный период, период грудного вскармливания и в младшем возрасте. Потребление более дешевых продуктов с высоким содержанием жиров, сахара, соли в совокупности с низким уровнем физической активности приводят к резкому росту ожирения в младшей популяции [4]. Эта проблема связана не только с изменившимся образом жизни детей в семье и учебных заведениях, но также социально-экономическими условиями и политикой государства в области образования, транспорта, городского планирования, окружающей среды, сельского хозяйства, производства пищевых продуктов. По мнению большинства исследователей, для решения обозначенной социальной проблемы необходим многосекторальный, мультидисциплинарный подход на государственном уровне, учитывающий особенности экономики, образования и культуры конкретных стран [7, 27–31].

Для здравоохранения и государства борьба с ожирением была и остается одной из значительных статей расходов [4, 6, 8, 17]. Так, в Европе прямые денежные затраты, связанные с ожирением, составляют ~7% всех расходов на здравоохранение, что сопоставимо с таковыми для борьбы с некоторыми онкологическими заболеваниями (например, с раком) [9, 17].

Сопутствующие заболевания и риски для здоровья, связанные с ожирением

Избыточный вес и ожирение негативно влияют на качество жизни и все сферы деятельности человека, приводя зачастую к развитию тяжелых сопутствующих заболеваний, потери трудоспособности и инвалидности. Большинство людей с избыточной массой тела и ожире-

нием испытывают объективные трудности вследствие наличия серьезных отклонений в состоянии здоровья, физических ограничений и психологических проблем [8, 9].

В 2013 г. австралийскими учеными был проанализирован отчет национального министерства здравоохранения и медицинского исследовательского совета по выявлению рисков для здоровья человека, связанных с избыточным весом и ожирением [32]. В результате были сформулированы Клинические принципы борьбы с избыточным весом и ожирением у взрослых, подростков и детей в Австралии (Канберра: NHMRC, 2013), ключевые аспекты которых представлены ниже [33].

Риски для здоровья, связанные с избыточным весом и ожирением у взрослых:

Сердечно-сосудистая система:

- Инсульт
- Ишемическая болезнь сердца
- Сердечная недостаточность
- Гипертензия

Эндокринная система:

- Синдром поликистоза яичников
- Сахарный диабет 2 типа

Пищеварительная система:

- Болезни желчного пузыря
- Безалкогольная жировая дистрофия печени
- Патология поджелудочной железы
- Желудочно-пищеводный рефлюкс
- Раковые заболевания кишечника, желчного пузыря и поджелудочной железы

Мочеполовая система:

- Хроническая болезнь почек — гломеруллопатия
- Конечная стадия заболевания почек
- Онкологическое поражение почки
- Мочекаменная болезнь
- Рак предстательной железы
- Стрессовое недержание мочи (у женщин)
- Сексуальная дисфункция (у мужчин)

Дыхательная система:

- Синдром обструктивного апноэ во сне
- Синдром гиповентиляции при ожирении (Obesity hypoventilation syndrome)
- Астма

Опорно-двигательная система:

- Артроз (особенно коленного сустава)
- Поражение межпозвонкового диска
- Боль в пояснице
- Нарушения структуры мягких тканей, таких как сухожилия, фасции и хрящи
- Боль в ногах
- Двигательная нетрудоспособность (в частности, у пожилых людей)

Репродуктивная система:

- Нарушения менструального цикла
- Выкидыш и неблагоприятный исход беременности
- Бесплодие
- Рак молочной железы (у женщин в постменопаузе)
- Рак эндометрия
- Рак яичников

Психическое здоровье:

- Депрессия
- Расстройство пищевого поведения
- Ухудшение качества жизни

Представленные данные совпадают с аналогичным анализом сопутствующих ожирению заболеваний, который проводили специалисты разных стран, в том числе российские клиницисты. Так, избыточный вес и ожирение являются риском развития серьезных заболеваний

сердечно-сосудистой системы (в первую очередь, гипертонии и ишемической болезни сердца), эндокринных расстройств (сахарный диабет 2-го типа, нарушения репродуктивной функции), поражений опорно-двигательного аппарата (протрузии и грыжи межпозвонковых дисков, повреждение суставов нижних конечностей), а также психологических расстройств и онкологических заболеваний [4, 8, 34–39].

Специалисты из США дополнили анализ рисков для здоровья человека конкретными цифрами. По их оценке, ожирение может быть причиной сахарного диабета 2-го типа в 57% случаев, артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца — в 17%, остеопороза и остеоартроза — в 14%, желчнокаменной болезни — в 30%, рака молочной железы, матки и толстого кишечника — в 11% [8].

По другим данным, среди взрослого населения Европы избыточная масса и ожирение в 80% случаев являются причиной сахарного диабета 2-го типа, в 35% — ишемической болезни сердца, в 55% — артериальной гипертензии. Эти заболевания, в свою очередь, ежегодно становятся причиной 1 млн смертей в Европе. Только в Великобритании одна из каждых 13 смертей связана с наличием избыточной массы тела. Экономические последствия и затраты системы здравоохранения в связи с этой проблемой весьма существенны [8]. Ожирение 1-й степени увеличивает риск развития сахарного диабета 2-го типа в 3 раза, 2-й степени — в 5 раз, 3-й степени — в 10 раз [40].

Сахарный диабет 2-го типа в 90% случаев сочетается с избыточной массой тела и ожирением. При этом особую опасность представляет собой центральный тип ожирения с преимущественным отложением жира в абдоминальной области. Висцеральное ожирение в сочетании с артериальной гипертензией при обменных нарушениях (углеводного и липидного обмена) выделено в самостоятельный метаболический синдром, или «синдром X» [41].

Хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, онкологические заболевания, ожирение и сахарный диабет относятся к неинфекционным заболеваниям с высокой смертностью [6, 7, 9, 41, 42].

Избыточная масса тела и ожирение связаны с более высокой смертностью во всем мире (до 65% населения стран с высоким и средним уровнем доходов), чем недостаток веса. По крайней мере, 2,8 млн взрослых людей умирают каждый год в результате состояний и заболеваний, связанных с избыточным весом или ожирением [4].

C. Mathers и D. Loncar проанализировали тенденцию к дальнейшему увеличению в общей смертности доли сопутствующих ожирению заболеваний — от 59–60% в настоящее время до 69% к 2030 г. [43]. Ведущей причиной подобного негативного явления, помимо курения и злоупотребления алкоголем, являются малоподвижный образ жизни и несбалансированное питание, особенно среди детей и подростков, что предсказуемо ведет к дальнейшему увеличению доли взрослого населения с избыточной массой тела и ожирением [8, 9, 44, 45].

Роль образа жизни и окружающей среды в патогенезе ожирения

Всемирная ассамблея здравоохранения в 2013 г. приняла Глобальный план действий в отношении неинфекционных заболеваний на 2013–2020 гг., предусматривающий ряд мероприятий для государств-членов международных партнеров и Секретариата ВОЗ. Документ регламентирует

действия, направленные на пропаганду здорового образа жизни, рационального питания и повышение уровня физической активности. Эти меры, по мнению авторов резолюции, должны способствовать достижению к 2025 г. девяти глобальных целей по профилактике и лечению неинфекционных заболеваний, в том числе по оптимизации уровня физической активности и рациона питания [36].

Важной задачей отечественного здравоохранения, сформулированной в Стратегии развития медицинской науки в РФ на период до 2025 г. стало «развитие системы мер по снижению рисков для здоровья населения и формирования здорового образа жизни у граждан Российской Федерации». Эта концепция предусматривает не только развитие соответствующих отраслей медицины, но и «стимулирование сознательной, целенаправленной работы самого человека по восстановлению и развитию жизненных ресурсов, по принятию на себя ответственности за собственное здоровье, чтобы здоровый образ жизни стал естественной потребностью» [31].

Помимо воздействия на причинно-следственные связи и пропаганды здорового образа жизни для эффективной борьбы с эпидемией ожирения необходимо создание среды, способствующей снижению рисков развития патологии (гиподинамии в домашних условиях, на рабочем месте и в свободное время) [46, 47].

Установлена линейная зависимость степени ожирения от количества часов работы за компьютером и времени просмотра телевизионных программ пациентами всех возрастов [48–50].

В решении проблемы снижения избыточной массы тела особую роль играет правильно организованный досуг. Средний расход энергии на баскетбольных площадках, теннисных кортах и футбольных полях значительно выше, чем на открытых пространствах для пикников, выгула собак и бейсбольных и детских площадках [51, 52].

Специалисты акцентируют внимание на проблемах загрязнения окружающей среды, экологическом неблагополучии, нездоровом питании и токсинах. Плотные построенные офисы и торговые центры наряду с внедрением «щадящих, обездвиживающих» технологий (лифтов, электронных средств связи, автоматизированной бытовой техники) приводят к тотальному снижению двигательной активности на работе, дома, неактивному досугу и малоподвижным развлечениям. Все эти факторы, несомненно, способствуют развитию нынешней эпидемии ожирения [28, 29, 51].

Междисциплинарные исследования последних лет демонстрируют эффективность комплексных про-

грамм, включающих оптимизацию рациона питания, повышение физической нагрузки, а также изменение антропогенной среды, связанной с двигательной активностью. Отмечены положительное влияние долгосрочных проектов по изменению городского архитектурного планирования, доступности объектов отдыха и активного досуга (садово-парковые зоны, пешеходные инфраструктуры, велосипедные треки), а также обеспечение образовательных учреждений необходимым инвентарем для занятий физической культурой и спортом [4, 30, 31, 53].

Если информирование, обеспечение доступной средой, квалифицированная медицинская помощь — задача общественного здравоохранения и государства, то ведение здорового образа жизни, активное участие в процессе оздоровления и профилактики заболеваний является аспектом личной ответственности. Актуализация цели, поведенческие модификации, создание мотивации и комфортной психологической обстановки — необходимые условия успешной реализации программ по снижению избыточного веса [4, 30, 54, 55].

Заключение

Таким образом, приоритетными направлениями государственной политики многих стран, в том числе Российской Федерации, в отношении профилактики и лечения ожирения стали комплексные межотраслевые программы по изменению окружающей среды с целью увеличения двигательной активности, контроля за качеством потребляемой пищи и популяризации здорового образа жизни. При этом все патогенетические методы терапии эффективны только при активном добровольном участии пациентов в лечебном процессе [9, 31, 38, 51, 56, 57].

Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа проведена на личные средства членов авторского коллектива.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явного и потенциального конфликта интересов, связанного с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cherian AT, Cherian SS, Subbiah S. Prevalence of obesity and overweight in urban school children in Kerala, India. *Indian Pediatr.* 2012;49(6):475–477. doi: 10.1007/s13312-012-0070-0.
2. Ying-Xiu Z, Shu-Rong W. Secular trends in body mass index and the prevalence of overweight and obesity among children and adolescents in Shandong, China, from 1985 to 2010. *J Public Health (Oxf).* 2012;34(1):131–137. doi: 10.1093/pubmed/fdr053.
3. *Preventing and Managing the Global Epidemic of Obesity. Report of a WHO Consultation on Obesity.* Geneva: WHO Technical report series; 1997. 894 p.
4. who.int [Internet]. Obesity and overweight. Report of a WHO. 2015 [cited 2016 Apr 18]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
5. Zhang YX, Wang SR. Differences in development and the prevalence of obesity among children and adolescents in different socioeconomic status districts in Shandong, China. *Ann Hum Biol.* 2012;39(4):290–296. doi: 10.3109/03014460.2012.690888.
6. Guenard F, Houde A, Bouchard L, et al. Association of LIPA gene polymorphisms with obesity-related metabolic complications among severely obese patients. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(10):2075–2082. doi: 10.1038/oby.2012.52.
7. James WPT. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med.* 2008;263(4):336–352. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01922.x.
8. Bessesen DH, Kushner R. *Evaluation & Management of Obesity.* Center for Obesity Research and Education. Philadelphia: Hanley&Belfus; 2002. 239 p.
9. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines OEP. Expert panel report: Guidelines (2013) for the management of overweight and obesity in adults.

- Obesity (Silver Spring)*. 2014;22 Suppl 2:S41–S410. doi: 10.1002/oby.20660.
10. Барановский А.Ю. Руководство по диетологии. — СПб.: Питер; 2001. 544 с. [Baranovskii AY. *Rukovodstvo po dietologii*. St. Petersburg: Piter; 2001. 544 p. (In Russ).]
 11. Рубаненко Е.П., Буторина А.В. Рациональное питание в период занятий фитнесом и спортом // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2012. — Т.3. — С. 26–29. [Rubanenko EP, Butorina AV. Ratsional'noe pitanie v period zanyatii fitnesom i sportom. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2012;3:26–29. (In Russ).]
 12. Fock KM, Khoo J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(Suppl 4):59–63. doi: 10.1111/jgh.12407.
 13. Flores R. Dance for health: improving fitness in African American and Hispanic adolescents. *Public Health Rep*. 1995;110(2):189–193.
 14. Ачкасов Е.Е., Ландыр А.П. Влияние физической нагрузки на основные параметры сердечной гемодинамики и частоту сердечных сокращений // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2012. — Т.2. — С. 38–46. [Achkasov EE, Landyr AP. Vliyanie fizicheskoi nagruzki na osnovnye parametry serdechnoi gemodinamiki i chastotu serdechnykh sokrashchenii. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2012;2:38–46. (In Russ).]
 15. Коромыслов А.В., Маргазин В.А. Роль организованной двигательной активности в формировании показателей физического развития студентов за время обучения в вузе // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2013. — №1. — С. 36–39. [Koromyslov AV, Margazin VA. Rol' organizovannoi dvigatel'noi aktivnosti v formirovanii pokazatelei fizicheskogo razvitiya studentok za vremya obucheniya v vuze. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2013;1:36–39. (In Russ).]
 16. Гуревич К.Г., Платонов В.Н. Индивидуальная адаптация школьников к физической нагрузке // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2011. — №4. — С. 29–32. [Gurevich KG, Platonov VN. Individual'naya adaptatsiya shkol'nikov k fizicheskoi nagruzke. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2011;4:29–32. (In Russ).]
 17. Branca F, Nikogosian H, Lobstein T. *The challenge of obesity in the WHO European region and strategies of response: summary*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2007.
 18. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, et al. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes*. 2003;52(5):1210–1214. doi: 10.2337/diabetes.52.5.1210.
 19. Zhao G, Ford ES, Li C, et al. Waist circumference, abdominal obesity, and depression among overweight and obese U.S. adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *BMC Psychiatry*. 2011;11(1):130. doi: 10.1186/1471-244X-11-130.
 20. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010. *JAMA*. 2012;307(5):491–497. doi: 10.1001/jama.2012.39.
 21. Мельниченко Г.А., Романцева Т.И. Ожирение: эпидемиология, классификация, патогенез, клиническая симптоматика и диагностика. — М.: МИА; 2004. 456 с. [Mel'nichenko GA, Romantseva TI. *Ozhirenie: epidemiologiya, klassifikatsiya, patogenez, klinicheskaya simptomatika i diagnostika*. Moscow: MIA; 2004. 456 p. (In Russ).]
 22. *Global Health Observatory Data Repository. Report WHO* [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2013 [cited 2015 Feb 12]. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/country-work/russian-federation2/>.
 23. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Бутрова С.А., и др. Ожирение у подростков в России // *Ожирение и метаболизм*. — 2006. — Т. 3. — №4. — С. 30–34. [Dedov II, Mel'nichenko GA, Butrova SA, et al. Ozhirenie u podrostkov v Rossii. *Obesity and Metabolism*. 2006;(4):30–34. (In Russ).] doi: 10.14341/2071-8713-5141.
 24. Мельниченко Г.А., Бутрова С.А., Савельева Л.В., Чеботникова Т.В. Распространенность избыточного веса и ожирения в популяции московских подростков // *Ожирение и метаболизм*. — 2006. — Т. 3. — №2. — С. 25–31. [Melnichenko GA, Butrova SA, Savel'eva LV, Chebotnikova TV. Rasprostranennost' izbytochnogo vesa i ozhireniya v populyatsii moskovskikh podrostkov. *Obesity and Metabolism*. 2006;3(2):25–31. (In Russ).] doi: 10.14341/2071-8713-4863
 25. Соболева Н.П. Биоимпедансный скрининг населения России в центрах здоровья: распространенность избыточной массы тела и ожирения // *Российский медицинский журнал*. — 2014. — №4. — С. 4–13. [Soboleva NP. The bio-impedance screening of population in health centers: prevalence of surplus body mass and obesity. *Ross Med Zh*. 2014;(4):4–13. (In Russ).]
 26. Николаев Д.В., Руднев С.Г. Биоимпедансный анализ: основы метода, протокол обследования и интерпретация результатов // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2012. — №2. — С. 29–37. [Nikolaev DV, Rudnev SG. Bioimpedansnyi analiz: osnovy metoda, protokol obsledovaniya i interpretatsiya rezul'tatov. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2012;(2):29–37. (In Russ).]
 27. Contaldo F, Pasanisi F. Obesity epidemics: simple or simplistic answers? *Clin Nutr*. 2005;24(1):1–4. doi: 10.1016/j.clnu.2004.10.005.
 28. Tucker S, Lanningham-Foster L, Murphy J, et al. A school based community partnership for promoting healthy habits for life. *J Community Health*. 2011;36(3):414–422. doi: 10.1007/s10900-010-9323-9.
 29. Liu JH, Jones SJ, Sun H, et al. Diet, physical activity, and sedentary behaviors as risk factors for childhood obesity: an urban and rural comparison. *Child Obes*. 2012;8(5):440–448. doi: 10.1089/chi.2012.0090.
 30. Wimalawansa S.J. Controlling obesity & its complications by elimination of causes and adopting healthy habits: “cause-driven” approach. *Advan. Med Sci*. 2014;3:1–15.
 31. Приказ Минздрава России № 175 от 30.03.2013 г. «Об утверждении плана мероприятий по реализации стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года». [Decree of the Ministry of Health of the Russian Federation № 175 of 30 March 2013. «Ob utverzhdenii plana meropriyatii po realizatsii strategii razvitiya meditsinskoi nauki v Rossiiskoi Federatsii na period do 2025 goda». (In Russ).]
 32. Grima M, Dixon JB. Obesity: recommendations for management in general practice and beyond. *Aust Fam Physician*. 2013;42(8):532–541.
 33. National Health and Medical Research Council. *Clinical practice guidelines for the management of overweight and obesity in adults, adolescents and children: draft clinical practice guidelines for primary healthcare professionals*. Canberra: NHMRC; 2013.
 34. Rigby N, James P. The obesity campaign view of diabetes prevention. *Diabetes Voice*. 2003;48(Special Issue):20–23.
 35. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, North American Association for the Study of Obesity. *The practical guide: identification, education and treatment of overweight and obesity in adults* [Internet]. NIH Publication; 2005 [cited 2016 Apr 18]. Available from: http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/prctgd_c.pdf.
 36. WHO. *Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013–2020. Report of a WHO* [Internet]. WHO; 2013 [cited 2016 Apr 18]. Available from: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-action-plan/en/>.
 37. *Management of overweight and obesity in adults. Systematic evidence review from the Obesity Expert Panel, 2013*. New York: Department of Health and Human Service; National Institute of Health; 2013. 33 p.
 38. Alamdari S, Panah F, Amiri P, et al. Plan to design policies for science, technology and innovation in the field of obesity. Prevention and control measures in 20 years national vision. *Life Sci J*. 2012;9(4):5884–5889.

39. Мещеряков А.В., Левушкин С.П. Тип телосложения как возможный маркер заболеваний и особенностей организации двигательной активности студентов // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2015. — №1. — С. 61–67. [Meshcheryakov AV, Levushkin SP. Somatotype as possible marker of diseases and motion activity of students. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2015;(1):61–67. (In Russ).]
40. Caro JF. Clinical review 26: Insulin resistance in obese and non-obese man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73(4):691–695. doi: 10.1210/jcem-73-4-691.
41. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med*. 1993;44(1):121–131. doi: 10.1146/annurev.me.44.020193.001005.
42. Beaglehole R, Bonita R, Alleyne G, et al. UN high-level meeting on non-communicable diseases: addressing four questions. *Lancet*. 2011;378(9789):449–455. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60879-9.
43. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442.
44. Blair SN, Brodney S. Effects of physical inactivity and obesity on morbidity and mortality: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc*. 1999;31(Suppl 11):646–662. doi: 10.1097/00005768-199911001-00025.
45. Пермякова Е.Ю., Година Е.З., Гилярова О.А. Влияние физической активности и суточного потребления калорий на особенности жировоголожения у современных детей и подростков Архангельского региона и г. Москвы // *Вестник Московского университета*. — 2012. — №4. — С. 112–119. [Permyakova EY, Godina EZ, Gilyarova OA. Vliyanie fizicheskoi aktivnosti i sutochnogo potrebleniya kalorii na osobennosti zhirootlozheniya u sovremennykh detei i podrostkov Arkhangel'skogo regiona i g. Moskvy. *Vestnik Moskovskogo universiteta*. 2012;(4):112–119. (In Russ).]
46. Wimalawansa SJ. Pathophysiology of obesity: Focused, cause-driven approach to control the epidemic. *Global Advanced Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;2(1):1–13.
47. Ландырь А.П., Ачкасов Е.Е., Добровольский О.Б., и др. Программное обеспечение для анализа зарегистрированных значений частоты сердечных сокращений (лекция). Часть 1 // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2013. — №4. — С. 76–84. [Landyur AP, Achkasov EE, Dobvol'skii OB, et al. Software for analysis of the recorded heart rate (Lecture). Part 1. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2013;(4):76–84. (In Russ).]
48. Hu FB, Li TY, Colditz GA. Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and Type 2 Diabetes Mellitus in women. *JAMA*. 2003;289(14):1785–1791. doi: 10.1001/jama.289.14.1785.
49. De Craemer M, De Decker E, Bourdeaudhuij I, et al. Correlates of energy balance-related behaviours in preschool children: a systematic review. *Obes Rev*. 2012;13:13–28. doi: 10.1111/j.1467-789x.2011.00941.x.
50. Соколова В.С., Сахарова Н.Е. Динамика функциональных показателей при занятиях оздоровительным плаванием у детей с алиментарным ожирением // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2014. — №4. — С. 44–47. [Sokolova VS, Sakharova NE. Swimming sessions and dynamic of functional indicators in children with alimentary obesity. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2014;(4):44–47. (In Russ).]
51. Sallis JF, Floyd MF, Rodriguez DA, Saelens BE. Role of built environments in physical activity, obesity, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2012;125(5):729–737. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.969022.
52. Рубаненко Е.П., Буторина А.В. Медицинское обеспечение фитнеса // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2015. — №1. — С. 68–76. [Rubanenko EP, Butorina AV. Medical support of aerobic exercise and recreational sports. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2015;(1):68–76. (In Russ).]
53. Фудин Н.А., Классина С.Я., Пигарева С.Н. Особенности системной организации физиологических функций на отдельных этапах возрастающей физической нагрузки у лиц, занимающихся физической культурой и спортом // *Спортивная медицина: наука и практика*. — 2014. — №3. — С. 14–18. [Fudin NA, Klassina SY, Pigareva SN. Features of the systemic organization of physiological functions in different stages of increasing physical activity in persons doing increasing intensity graded physical exercises and sports. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2014;(3):14–18. (In Russ).]
54. Viuda-Serrano A, González Millán C, Pérez-González B, et al. *Obesity prevention through physical activity in school-age children and adolescents* [Internet]. Madrid: Universidad Camilo José Cela; 2011 [cited 2016 Apr 18]. Available from: http://www.olympic.org/Assets/Sport_for_all/2-CamiloJoseCelaUniversityStudy-preventionofobesity-final-en.pdf.
55. Tonstad S, Rössner S, Rissanen A, Astrup A. Medical management of obesity in Scandinavia 2016. *Obes Med*. 2016;1:38–44. doi: 10.1016/j.obmed.2016.01.002.
56. Никитина О.А. О необходимости создания социально-ориентированной системы обеспечения россиян санаторно-оздоровительными услугами // *Фундаментальные исследования*. — 2014. — №6–2. — С. 320–324. [Nikitina OA. The need to create a socially-oriented system for ensuring sanatorium and health improvement services of Russian population. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014;(6–2):320–324. (In Russ).]
57. Ромашин О.В., Лядов К.В., Шаповаленко Т.В., и др. Становление физической культуры как базового средства восстановительного лечения, медицинской реабилитации и целенаправленного оздоровления человека // *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. — 2013. — Т.90. — №1. — С. 39–43. [Romashin OV, Lyadov KV, Shapovalenko TV, et al. The development of physical education as a basic instrument of rehabilitative treatment, remedial medicine, and goal-oriented health promotion for the benefit of man. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*. 2013;90(1):39–43. (In Russ).]

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Разина Анастасия Олеговна, аспирант кафедры спортивной медицины и медицинской реабилитации ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; **тел.:** +7 (916) 871-55-93; **e-mail:** electrum_gaz@mail.ru

Руненко Светлана Давидовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры спортивной медицины и медицинской реабилитации ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; **тел.:** +7 (499) 248-48-44; **e-mail:** svetfit@mail.ru

Ачкасов Евгений Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой спортивной медицины и медицинской реабилитации ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; **тел.:** +7 (499) 248-48-44; **e-mail:** 2215.g23@rambler.ru

DOI:

А.А. Баранов¹, Л.С. Намазова-Баранова¹, И.В. Смирнов², Д.А. Девяткин²,
А.О. Шелманов², Е.А. Вишнёва¹, Е.В. Антонова¹, В.И. Смирнов¹¹ Научный центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация² Институт системного анализа Федерального исследовательского центра «Информатика и управление»
Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Технологии комплексного интеллектуального анализа клинических данных

Обоснование. Медицинские учреждения генерируют большой поток данных, содержащих важную информацию о пациентах. В структурированном виде, как правило, хранятся результаты анализов. Такие данные, как анамнезы, результаты осмотров, описания результатов обследований (УЗИ, ЭКГ, рентген) и другие, имеют неструктурированную форму (в виде текстов на естественном языке). Используя методы интеллектуальной обработки накопленных массивов данных, можно автоматизировать решение многих задач, возникающих в клинической практике, повысив таким образом качество медицинской помощи. **Цель исследования:** создание комплексной системы интеллектуальной обработки данных в многопрофильном педиатрическом центре. **Методы.** Извлечение информации из клинических текстов на русском языке осуществляется на основе их полного лингвистического анализа. Из текстов извлекаются названия заболеваний, симптомов, областей тела, к которым относится заболевание, а также лекарственных препаратов. В тексте распознаются такие атрибуты заболеваний, как «отрицание» (указывает на то, что заболевание отсутствует), «не пациент» (указывает на то, что заболевание относится не к пациенту, а к его родственнику), «тяжесть заболевания», «течение заболевания». Для извлечения информации применяют медицинские тезаурусы, набор вручную составленных шаблонов, а также различные методы на основе машинного обучения. Полученные из текстов данные используются для решения задачи автоматической диагностики хронических заболеваний. Предложен метод на основе машинного обучения для классификации пациентов со схожими нозологиями, а также метод для определения наиболее информативных признаков. **Результаты.** Экспериментальное исследование разработанных методов проводилось на обезличенных историях болезни пациентов педиатрического центра. Проведена оценка качества разработанных методов извлечения информации из клинических текстов на русском языке. Проведена экспериментальная оценка метода автоматической диагностики для пациентов с болезнями органов дыхания, с аллергическими, нефрологическими и ревматическими болезнями. Определены наиболее информативные признаки, а также подходящие методы машинного обучения для классификации пациентов по группам заболеваний. Получены шаблонные комбинации признаков заболеваний. Использование данных позволило повысить качество диагностики хронических заболеваний. **Заключение.** Разработанные методы были реализованы в системе интеллектуальной обработки данных в многопрофильном педиатрическом центре. Проведенные исследования свидетельствуют о перспективности использования системы для повышения качества медицинской помощи пациентам детской возрастной категории.

Ключевые слова: клинические тексты, извлечение информации, машинное обучение, анализ медицинских данных, интеллектуальный анализ данных.

(Для цитирования: Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Смирнов И.В., Девяткин Д.А., Шелманов А.О., Вишнёва Е.А., Антонова Е.В., Смирнов В.И. Технологии комплексного интеллектуального анализа клинических данных. Вестник РАМН. 2016;71(2):160–171. doi:)

Обоснование

Системы интеллектуального анализа медицинской информации применяются для поддержки принятия решений при диагностике заболеваний, выполнении лечебных мероприятий, в целях контроля действий медицинского персонала и для предупреждения о наступлении потенциально опасных изменений в состоянии здоровья пациентов [1]. Применению методов машинного обучения для анализа структурированных медицинских данных посвящено значительное число работ. Так, у N. Isa [2] представлена система, использующая методы интеллектуальной диагностики для прогнозирования рака груди. В работе A. Al-Nuагi и соавт. [3] описана система, позволяющая выполнить диагностику стадии хронической почечной недостаточности. M. Fazel Zarandi и соавт. [4] решают задачу автоматизированной диагностики астмы. В качестве входных данных ученые используют показатели здоровья в количественной и качественной форме, антропометрические данные, генетические тесты, по которым строится набор нечетких правил, составляющих основу для последующей классификации пациентов. Анало-

гичная диагностика проводится и при помощи деревьев решений [5]. Метод логистической регрессии применяется для диагностики ревматоидного артрита [6]. Среди исследований, посвященных выделению значимых признаков заболеваний, следует отметить работы A. Wright и соавт. и S. Dodd и соавт. [7, 8]. Используя априорный алгоритм, авторы получили эмпирические оценки взаимосвязи различных медикаментов, результатов лабораторных тестов и заболеваний. Этот метод применялся также для интеллектуальной диагностики диабета. Ассоциативные правила, сформированные априорным алгоритмом, использовались затем для построения классификатора [9].

Помимо структурированных данных медицинские учреждения генерируют большой объем неструктурированных текстов, содержащих важную информацию о здоровье пациентов. К ним относятся анамнезы, результаты осмотров, описания результатов обследований, таких как ультразвуковые (УЗИ), электрокардиографические (ЭКГ), рентгенологические и др. Анализ клинических текстов на сегодняшний день является одним из быстроразвивающихся актуальных научных направлений, которое находится на стыке компьютерной лингвистики

Методы

и медицины [10, 11]. Методы извлечения информации из клинических текстов позволяют повысить эффективность анализа клинических данных и улучшить качество медицинского обслуживания пациентов.

На практике часто возникает потребность в универсальной системе, которая могла бы анализировать разнообразные данные, как в структурированной форме, так и в неструктурированной, и позволяла бы автоматизировать широкий спектр мероприятий в рамках лечебного процесса. При создании такой системы необходима агрегация разнообразных методов анализа медицинских данных и текстов.

В статье представлена комплексная система интеллектуальной обработки данных в многопрофильном педиатрическом центре, которая решает следующие задачи:

- автоматическая диагностика хронических заболеваний у детей;
- выявление наиболее значимых для диагностики признаков заболеваний;
- выявление скрытых зависимостей в клинических данных.

Представлены также методы, примененные в системе для извлечения информации из клинических текстов и анализа медицинских данных. Проведено экспериментальное исследование разработанной системы на данных многопрофильного педиатрического центра.

Цель исследования: создание комплексной системы интеллектуальной обработки данных в многопрофильном педиатрическом центре.

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное исследование с целью машинного извлечения информации из клинических текстов деперсонализированных историй болезни пациентов многопрофильного педиатрического центра.

Условия проведения

Исследование проведено на базе ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России (ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России).

Продолжительность исследования

Исследование проведено в 2013–2015 гг.

Описание медицинского вмешательства

Медицинское вмешательство не проводилось.

Методы регистрации исходов**Интеграция методов интеллектуальной обработки данных и текстов в единой комплексной системе**

Комплексная система интеллектуальной обработки данных в многопрофильном педиатрическом центре разработана в соответствии с предложенной ранее сервисориентированной распределенной архитектурой [12], согласно которой каждый компонент системы представляет собой отдельный сервис, а взаимодействие между ними осуществляется посредством унифицированного протокола доступа к объектам (Simple

A.A. Baranov¹, L.S. Namazova-Baranova¹, I.V. Smirnov², D.A. Devyatkin²,
A.O. Shelmanov², E.A. Vishneva¹, E.V. Antonova¹, V.I. Smirnov¹

¹ Scientific Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

² Institute for Systems Analysis, Federal Research Center «Computer Science and Control»
of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Technologies for Complex Intelligent Clinical Data Analysis

*The paper presents the system for intelligent analysis of clinical information. Authors describe methods implemented in the system for clinical information retrieval, intelligent diagnostics of chronic diseases, patient's features importance and for detection of hidden dependencies between features. Results of the experimental evaluation of these methods are also presented. **Background:** Healthcare facilities generate a large flow of both structured and unstructured data which contain important information about patients. Test results are usually retained as structured data but some data is retained in the form of natural language texts (medical history, the results of physical examination, and the results of other examinations, such as ultrasound, ECG or X-ray studies). Many tasks arising in clinical practice can be automated applying methods for intelligent analysis of accumulated structured array and unstructured data that leads to improvement of the healthcare quality. **Aims:** the creation of the complex system for intelligent data analysis in the multi-disciplinary pediatric center. **Materials and methods:** Authors propose methods for information extraction from clinical texts in Russian. The methods are carried out on the basis of deep linguistic analysis. They retrieve terms of diseases, symptoms, areas of the body and drugs. The methods can recognize additional attributes such as «negation» (indicates that the disease is absent), «no patient» (indicates that the disease refers to the patient's family member, but not to the patient), «severity of illness», «disease course», «body region to which the disease refers». Authors use a set of hand-drawn templates and various techniques based on machine learning to retrieve information using a medical thesaurus. The extracted information is used to solve the problem of automatic diagnosis of chronic diseases. A machine learning method for classification of patients with similar nosology and the method for determining the most informative patients' features are also proposed. **Results:** Authors have processed anonymized health records from the pediatric center to estimate the proposed methods. The results show the applicability of the information extracted from the texts for solving practical problems. The records of patients with allergic, glomerular and rheumatic diseases were used for experimental assessment of the method of automatic diagnostic. Authors have also determined the most appropriate machine learning methods for classification of patients for each group of diseases, as well as the most informative disease signs. It has been found that using additional information extracted from clinical texts, together with structured data helps to improve the quality of diagnosis of chronic diseases. Authors have also obtained pattern combinations of signs of diseases. **Conclusions:** The proposed methods have been implemented in the intelligent data processing system for a multidisciplinary pediatric center. The experimental results show the availability of the system to improve the quality of pediatric healthcare.*

Key words: data mining in healthcare, natural language processing of clinical texts, hospital information system, information extraction.

(For citation: Baranov AA, Namazova-Baranova LS, Smirnov IV, Devyatkin DA, Shelmanov AO, Vishneva EA, Antonova EV, Smirnov VI. Technologies for Complex Intelligent Clinical Data Analysis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(2):160–171. doi:)

Object Access Protocol, SOAP) [13]. Основными компонентами системы являются лингвистический процессор Exactus [14], подсистема извлечения информации из клинических текстов, а также подсистема анализа структурированных данных, в которую входят различные классификаторы, основанные как на системах правил, так и на машинном обучении. Для решения различных задач обработки данных в системе определены наборы правил, определяющие порядок обработки информации, и компоненты, которые будут задействованы при этом.

Рассмотрим процесс обработки информации при решении задачи диагностики (рис.). Полуструктурированные данные экспортируются из медицинской информационной системы (МИС) в формате XML. Эти документы содержат как структурированные строковые поля и числовые данные, так и крупные неструктурированные текстовые блоки: анамнезы, результаты осмотров и др. XML-парсер (расширяемый язык разметки документов) анализирует поступающие документы, выделяет текстовые и структурированные данные, перенаправляет тексты на лингвистический анализ. В результате лингвистического анализа строится реляционно-ситуационная структура текста [15], содержащая информацию о морфологических характеристиках слов, синтаксической и ролевой структуре предложений, а также семантических отношениях. Построенная структура используется для извлечения информации из текста — медицинских терминов, их атрибутов, числовых данных и др. Извлеченная информация передается подсистеме анализа структурированных данных, в которой из нее формируются признаки для работы классификаторов на основе правил или моделей машинного обучения.

Методы извлечения информации из клинических текстов на русском языке

Подробное описание методов извлечения информации из клинических текстов на русском языке представлено в исследовании А. Shelmanov и соавт. [16]. В настоящей работе рассмотрим основные принципы, заложенные в них.

Цепочка извлечения информации из клинических текстов состоит из 7 компонентов: первый осуществляет извлечение и нормализацию результатов различных клинических анализов, которые обычно представляют собой строковые или числовые значения; второй распознает в тексте медицинские термины по заданным кодификаторам (заболевания, препараты, медицинские процедуры и др.); затем подключаются к работе компоненты, распознающие конструкции, указывающие на отсутствие заболеваний, на отношение заболевания не к пациенту, определяющие тяжесть и течение заболевания, сопоставляющие заболевание и связанную с ним область тела.

Извлечение и нормализация результатов клинических анализов осуществляется с помощью системы правил и регулярных выражений.

В основе метода распознавания медицинских терминов по заданным кодификаторам лежит подход, реализованный в системе MetaMap [17]. Для терминов из заданного кодификатора строится обратный поисковый индекс по словам. В тексте отыскиваются упоминания слов из поискового индекса (стоп-слова не учитываются). Затем на основе единичных слов порождаются варианты терминов, представляющие собой более сложные конструкции в тексте. При порождении вариантов используются синтаксические связи, линейный контекст слева и справа от слова и эвристические (от др.-греч. Εὐρίσχω —

162

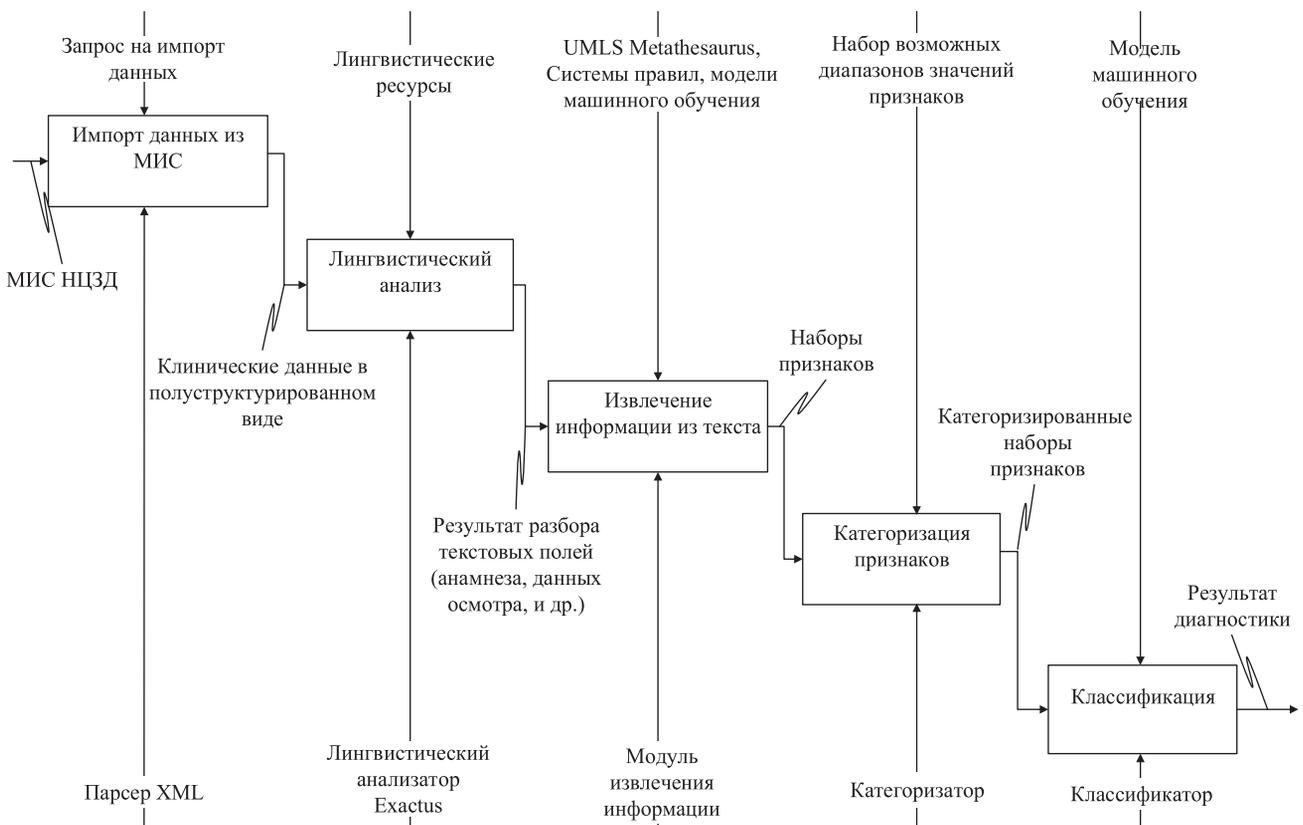


Рис. Процесс комплексной интеллектуальной обработки данных в системе
Примечание. МИС — медицинская информационная система.

отыскиваю, открываю) правила. Полученные варианты сопоставляются с терминами из кодификатора и ранжируются. Оценивается, насколько термин из кодификатора близок к сгенерированному варианту. На оценку влияют пересечение слов сгенерированного варианта и термина кодификатора; синтаксическая связность слов в варианте; способ, с помощью которого был сгенерирован вариант и другие эвристики. Варианты с низкими оценками отсекаются по порогу. Оставшиеся варианты, найденные в тексте, обычно имеют от одного до трех соответствующих им кодов из кодификатора. По кодам определяются типы найденных медицинских терминов (заболевание, симптом, лекарственный препарат и т.п.). Разработанный метод позволяет находить в тексте не только точные термины из кодификаторов, но и различные варианты их написания. В качестве кодификаторов использовались Unified Medical Language System (UMLS) Metathesaurus [18] (на русский язык переведен MeSH [19]), а также государственный реестр лекарственных средств (предварительно преобразован так, чтобы препаратам с одинаковыми действующими веществами был сопоставлен единый код) [20].

В методах распознавания конструкций, указывающих на отсутствие заболевания и на то, что заболевание не относится к пациенту, используются эвристики и лексико-синтаксические шаблоны. Ко всем упоминаниям заболеваний, найденным с помощью метода распознавания в тексте медицинских терминов по кодификаторам, применяется набор правил и шаблонов. Отыскиваются устойчивые словосочетания, указывающие на отрицания, упоминания о родственниках и др. (как в примере: «Наследственность — у матери лекарственная аллергия на пенициллины, у старшего брата пищевая аллергия»), которые находясь в контексте упоминания заболевания или же синтаксически связаны с ним.

Методы определения атрибутов, тяжесть заболевания и течение заболевания, а также метод установления связей между заболеваниями и областями тела основаны на машинном обучении. Алгоритм определения тяжести и течения заболевания одинаковый. Для заданной аннотации заболевания в предложении к каждому слову классификатор проставляет метку, указывающую на принадлежность к атрибуту заболевания. После того как все слова в предложении просмотрены, рядом стоящие слова с одинаковыми метками группируются в единый атрибут. После выделения атрибутов из текста другой набор классификаторов осуществляет их нормализацию, т.е. определяет значение атрибута. Для классификации используются лексические, морфологические и синтаксические признаки, извлеченные из контекста слов. Алгоритм установления связей между заболеваниями и областями тела заключается в том, что каждая пара аннотаций «заболевание—область тела», найденная в предложении, оценивается бинарным классификатором, который определяет, связаны они или нет. В качестве признаков для классификации используются дальность в токенах (обособленная последовательность символов) между аннотацией заболевания и областью тела, количество аннотаций заболеваний между ними, наличие синтаксического подчинения единому родителю, его часть речи, наличие синтаксической связи между словами аннотаций.

Методы интеллектуального анализа медицинских данных

Для решения задачи диагностики хронических заболеваний предлагается использовать методы машинного

обучения на основе деревьев решений. Рассмотрим примененный метод диагностики подробнее.

Пусть $D = \{d_1, d_2, \dots, d_m\}$, где $m \in \mathbb{N}^+$ — множество всех возможных диагнозов, определяемых системой. Ранее извлеченные численные показатели здоровья пациентов переводятся в категориальную форму. Для этого используется функция категоризации показателей:

$Cat(i, val, d_{pr}, age, sex) : I \times R \times D \times R \times Sx \rightarrow C^I, I \in \mathbb{N}^+$ где $Sx = \{m, f\}$ — множество возможных значений признака «пол пациента», $C = \{low, normal, high\}$ — множество возможных категориальных значений показателя здоровья. Функции S и Cat задаются в реляционном виде экспертами в предметной области.

Для того чтобы классификатор мог работать с категориальными признаками, производится их предварительная бинаризация:

$$X = \bigcup_{i \in S I} i \times C$$

где X — пространство бинарных признаков, $S I$ — пространство категориальных признаков.

Рассмотрим способ построения классификатора на основе деревьев решений CART [21]. Обозначим полученные ранее наборы признаков объектов как $x_i \in R^n$, где $i=1, 2, \dots, l$, и вектор их меток, соответствующих различным заболеваниям из D , как $u \in d^n$. Дерево решений рекурсивно разбивает пространство объектов таким образом, что похожие объекты группируются вместе.

Пусть Q — подмножество объектов, разделяемых некоторой вершиной m дерева. Зададим разделитель $\theta = (j, t_m)$, состоящий из признака j и порога t_m , дробящий исходное множество объектов, соответствующих вершине на подмножества $Q_{left} \theta$ и $Q_{right} \theta$:

$$Q_{left}(\theta) = \{(x, y) \mid x_j \leq t_m\}$$

$$Q_{right}(\theta) = Q \setminus Q_{left}(\theta).$$

Оценка разделителя $G(Q, \theta)$, заданного для вершины m , вычисляется с использованием функции неоднородности по Джини ($Gin(\cdot)$):

$$G(Q, \theta) = \frac{n_{left}}{N_m} Gin(Q_{left}(\theta)) + \frac{n_{right}}{N_m} Gin(Q_{right}(\theta)),$$

где N_m — размер множества объектов, разделяемых вершиной m , n_{left} , n_{right} — размер подмножеств объектов, соответствующих левому и правому поддеревьям вершины m . При построении дерева выберем для вершины m разделитель с минимальной оценкой:

$$\theta^* = \arg \min_{\theta} G(Q, \theta).$$

Затем рекурсивно выберем разделители для подмножеств $Q_{left}(\theta^*)$ и $Q_{right}(\theta^*)$. Процесс продолжается до тех пор, пока не будет достигнута требуемая высота дерева.

Для каждого предварительного диагноза на основе тестового набора данных строится отдельный классификатор. В качестве положительных примеров для обучения используются результаты обследований пациентов с целевым диагнозом, а в качестве отрицательных — результаты обследований пациентов со схожей симптоматикой.

Для повышения качества работы методов диагностики используются композиции классификаторов на основе деревьев решений.

Первым рассмотренным способом построения композиции стал случайный лес (Random Forest) [22]. Он представляет собой лес деревьев решений:

$$H = \{h(x, \theta_k), k=1, \dots, n\},$$

где $n \in \mathbb{N}^+$, $h(x, \theta)$ — решающее дерево, $\{\theta_k\}$ — векторы параметров, и все деревья в нем участвуют в голосовании за диагноз, соответствующий вектору признаков заболе-

вания x . Все деревья в лесу обучаются на подмножествах данных, случайным образом сгенерированных на основе исходной обучающей выборки, причем для обучения каждого дерева отбирается случайное подмножество признаков заболеваний. Для выбора разделяющих признаков, как и в деревьях CART, используется функция неоднородности по Джини.

Вторым рассмотренным способом построения композиций стал градиентный бустинг (от англ. Boosting — улучшение; процедура последовательного построения композиции алгоритмов машинного обучения) на деревьях решений [23]. В этом методе составляется линейная свертка классификаторов:

$$H_m(x) = \sum_{m=1}^M b_m h(x, \theta_m)$$

где $b_m \in R$ и m — длина композиции.

Эта композиция должна быть оптимальной в смысле минимизации функционала ошибки Q :

$$Q = \sum_{i=1}^l L(y_i, H_m(x_i)) \rightarrow \min$$

Будем последовательно строить такую композицию при помощи рекурсивного алгоритма, каждый раз добавляя в сумму классификатор, оптимизирующий Q :

$$H_m(x) = H_{m-1}(x) + b_m h(x, \theta_m).$$

Обозначим ∇Q_i i -компонент градиента функции Q . Тогда параметры и вес m -слагаемого могут быть получены методом градиентного спуска:

$$b_m = \arg \min_{b \in R} \sum_{i=1}^l L(y_i, H_{m-1}(x_i) - b \nabla Q_i)$$

$$\theta_m = \arg \min_{\theta \in R^n} \sum_{i=1}^l L(y_i, b_m h(x_i, \theta))$$

Процесс обучения прекращается, когда величина функционала ошибки становится меньше предварительно заданного параметра $L \in R$, либо когда длина свертки превысит заранее определенную величину $M \in N^+$.

Для оценки качества диагностики использовалась F_I -мера. В качестве метода вычисления этой оценки применялась десятикратная перекрестная проверка, при помощи которой для каждого метода диагностики и для каждого заболевания была получена оценка F_I , а также величина ее среднеквадратичного отклонения.

Для определения относительной важности признаков, связанных с заболеваниями, использовалась мера значимости по Джини [24]. По результатам всех проходов перекрестной проверки по этой мере вычислялась суммарная значимость признаков, и отбирались наиболее значимые признаки.

Для решения задачи выявления скрытых зависимостей между признаками заболеваний, лекарственными средствами и диагнозами использовался метод формирования наборов ассоциативных правил [25]. С помощью априорного алгоритма [26] составлялись шаблонные комбинации признаков различных заболеваний.

Рассмотрим процесс формирования ассоциативных правил более подробно.

Пусть $I = \{i_1, i_2, \dots, i_n\}$ — набор булевых признаков, $D = \{t_1, t_2, \dots, t_m\}$ — набор транзакций. Каждая транзакция в D состоит из элементов множества I . Пусть ассоциативное правило является импликацией вида $X \Rightarrow Y$, где $X, Y \subseteq I$ и $X \cap Y = \emptyset$. Каждое такое правило включает под-

множества X и Y , где X называется антецедентом (от лат. *Antecedens* — предшествующее), а Y — следствием. Величина поддержки подмножества X относительно $T \subset D$ определяется как доля транзакций в T , которые содержат X . Величина доверия к ассоциативному правилу $X \Rightarrow Y$ относительно множества T — мера того, как часто элементы из Y появляются среди транзакций в T , содержащих X . Тогда задача построения набора ассоциативных правил состоит в выявлении подмножеств с высоким уровнем поддержки и формировании в дальнейшем набора ассоциативных правил с высоким доверием. Для уменьшения вычислительной сложности построения ассоциативных правил используется априорный алгоритм. В нем для выявления наборов признаков с высоким уровнем поддержки используется поиск в ширину. При построении ассоциативных правил применяется антимонотонное свойство поддержки:

$$\forall A, B: (A \subseteq B) \Rightarrow s(A) \geq s(B).$$

Это свойство состоит в том, что мера поддержки множества никогда не превышает поддержку его подмножеств. Отсюда следует, что любое подмножество признаков будет часто встречающимся тогда и только тогда, когда все его подмножества будут встречаться также часто. Это означает, что формирование набора правил можно выполнять рекурсивно: сначала генерируются правила на основе подмножеств длины $k-1$, затем составляются правила, в которые входят подмножества признаков длиной k .

Благодаря низкой вычислительной сложности такой подход к формированию наборов ассоциативных правил применим для анализа больших наборов признаков пациентов.

Этическая экспертиза

Исследование проводилось в соответствии с Федеральным законом № 152-ФЗ от 27.07.2006 (ред. от 21.07.2014) «О персональных данных».

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Использование выборок малого размера для настройки методов интеллектуального анализа данных или текстов может приводить к проблеме переобучения. Теоретическая оценка размера выборки, достаточного для корректной настройки методов машинного обучения, может быть определена для используемого класса алгоритмов на основе размерности Вапника–Червоненкиса [27]. Однако такие оценки сильно завышены и плохо применимы на практике [28], поэтому для настройки методов интеллектуального анализа данных или текстов используют наибольшие доступные выборки, а оценка их применимости для обучения производится эмпирически.

Методы статистического анализа данных

Для получения оценки обобщающей способности методов машинного обучения обычно используют процедуру многократной перекрестной проверки. В рамках этой процедуры анализируемая выборка произвольно разбивается на n блоков одинакового размера. Затем выполняется n тестовых итераций: в ходе каждой из них один из блоков используется для контроля (определения оценки качества работы метода), а остальные применяются для обучения (настройки) исследуемого метода. По итогам выполнения этой процедуры вычисляется среднее арифметическое полученной эмпирической оценки качества обучения метода. В качестве эмпирической оценки обобщающей способности предложенных методов использовалась F_I -мера.

Результаты

Основные результаты исследования

Результаты экспериментальных исследований методов извлечения информации из клинических текстов

Размеченный корпус клинических текстов. Для применения методов машинного обучения в задачах извлечения информации из клинических текстов и для проведения экспериментальных исследований этих методов был создан размеченный корпус клинических текстов на русском языке. В состав корпуса вошли более 120 деперсонализированных историй болезни пациентов педиатрического центра с аллергическими, ревматическими и нефрологическими заболеваниями, а также болезнями органов дыхания. Обезличенные карты включали в себя эпикризы, рекомендации и отчеты, фиксирующие результаты различных медицинских обследований (УЗИ, ЭКГ, рентгенографию и др.). Совместно с экспертами педиатрического центра была определена важная для врачей информация, требующая извлечения и автоматической обработки, а также выработаны соглашения и инструкции по разметке сущностей, атрибутов и связей. При составлении инструкций по разметке учитывался опыт зарубежных семинаров, таких как CLEF eHealth [29], для которых создавались схожие ресурсы. Специалисты в области медицины разметили в корпусе более 18 000 сущностей, а также более 12 000 атрибутов и связей.

Результаты экспериментальных исследований метода извлечения заболеваний и лекарственных препаратов

Для экспериментальных исследований метода извлечения заболеваний из разработанного корпуса был выделен подкорпус, состоящий из 30 случайно выбранных историй болезней. Остальная часть корпуса использовалась для настройки параметров метода. Рассчитывались точность, полнота и F_1 -мера (подробное описание различных метрик оценки качества методов машинного обучения приведено в [30]). При этом пересечение аннотации, полученной автоматически с помощью разработанной системы, с аннотацией «золотого стандарта» считалось правильным ответом системы. Разработанный метод сравнивался с двумя другими, более простыми «базовыми» методами. Первый «базовый» метод отмечает в тексте любые слова, которые встречаются в терминах из тезауруса, относящихся к заболеваниям. Этот алгоритм потенциально обладает максимальной полнотой, но низкой точностью. Второй «базовый» метод помечает словосочетание как термин, только если все слова, входящие в словосочетание, присутствуют в термине из тезауруса, представленном в виде «мешка слов». Этот алгоритм потенциально обладает низкой полнотой, но максимальной точностью. Результаты оценки методов представлены в табл. 1.

Для экспериментальной оценки метода извлечения лекарственных препаратов из клинических текстов использовалась та же методика, что и для оценки метода извлечения заболеваний. Точность метода составила 84,3%, полнота — 74,6%, F_1 -мера — 79,2%.

Результаты экспериментальных исследований методов распознавания конструкций, указывающих на отсутствие заболевания и на то, что заболевание не относится к пациенту

Экспериментальная оценка методов распознавания конструкций, указывающих на отсутствие заболевания

(атрибут «отрицание») и на то, что заболевание не относится к пациенту (атрибут «не пациент»), проводилась на всем размеченном корпусе, поскольку количество подобных аннотаций в нем было невелико. Так как оба метода основаны на правилах, это допущение не снижало объективности оценки методов. Стоит также отметить, что в экспериментах, помимо атрибутов заболеваний, учитывались атрибуты аннотаций симптомов. Результаты экспериментов представлены в табл. 2.

Результаты экспериментальных исследований методов извлечения и нормализации атрибутов «тяжесть» и «течение» заболевания, а также метода, устанавливающего связи между областями тела и заболеваниями

В экспериментальных исследованиях методов извлечения и нормализации атрибутов «тяжесть заболевания» и «течение заболевания», а также метода, устанавливающего связи между областями тела и заболеваниями, использовалась пятикратная перекрестная проверка на размеченном корпусе. Отдельно оценивалось качество извлечения атрибутов и их нормализации. Чтобы исключить ошибки модуля определения заболеваний, мы оценивали только атрибуты, которые относятся к заболеваниям, выделенным нашей системой. В задаче извлечения атрибутов «тяжесть заболевания» и «течение заболевания» рассчитывались нестрогие оценки точности, полноты и F_1 -меры. При нестрогой оценке пересечение аннотации, полученной автоматически с помощью системы, с аннотацией «золотого стандарта» считалось правильным ответом системы.

В задаче нормализации атрибутов оценивалась только аккуратность (Assigasy), поскольку это задача классификации без «пустого» класса.

В задаче установления связей между областями тела и заболеваниями учитывались только связи между заболеваниями и областями тела, которые были определены на предыдущих этапах анализа текста.

Для каждого метода и для каждой задачи проводились эксперименты с четырьмя классификаторами на основе машинного обучения: линейный метод опорных векторов, метод опорных векторов с радиальным ядром, случайный лес, AdaBoost (сокращение от Adaptive Boosting — алгоритм усиления классификаторов путем объединения их в комитет) [31].

В табл. 3 представлены результаты экспериментальной оценки методов извлечения атрибутов «тяжесть заболевания» и «течение заболевания», а также метода установления связей между областями тела и заболеваниями,

Таблица 1. Результаты экспериментальной оценки методов извлечения заболеваний

Метод	Полнота, %	Точность, %	F_1 -мера, %
Разработанный метод	72,8	95,1	82,4
Базовый 1	84,9	9,3	16,7
Базовый 2	69,8	99,2	81,9

Таблица 2. Результаты экспериментальной оценки методов распознавания конструкций, указывающих на отсутствие заболевания и на то, что заболевание не относится к пациенту

Метод	Полнота, %	Точность, %	F_1 -мера, %
Определение атрибута «отрицание»	98,7	95,3	97,0
Определение атрибута «не пациент»	90,9	96,8	93,8

Таблица 3. Результаты экспериментальной оценки методов извлечения атрибутов «тяжесть заболевания» и «течение заболевания», а также метода установления связей между областями тела и заболеваниями

Задача	Классификатор	Полнота, %	Точность, %	F_1 -мера, %
Извлечение атрибута «тяжесть заболевания»	Случайный лес	93,6	82,6	87,5
Извлечение атрибута «течение заболевания»	Линейный SVM	92,3	99,2	95,7
Установление связей между областями тела и заболеваниями	RBF SVM	91,4	76,6	83,3

Таблица 4. Результаты экспериментальной оценки методов нормализации атрибутов «тяжесть заболевания» и «течение заболевания»

Задача	Классификатор	Аккуратность, %
Нормализация атрибута «тяжесть заболевания»	AdaBoost	89,8
Нормализация атрибута «течение заболевания»	Случайный лес	92,7

Таблица 5. Состав тестового набора данных

Заболевание	Похожие заболевания
Бронхиальная астма	Бронхит Аллергический ринит Муковисцидоз
IgA-нефропатия	Широкий спектр гломерулярных заболеваний
Юношеский артрит	Спондилит

а в табл. 4 — результаты оценки качества нормализации атрибутов «тяжесть заболевания» и «течение заболевания». Для каждой задачи указан результат наилучшего классификатора.

Результаты экспериментальных исследований методов анализа медицинских данных

Описание тестовых данных. Для исследования методов интеллектуального анализа медицинских данных использовался набор данных, состоящий из историй болезни пациентов НЦЗД с основными клиническими диагнозами: бронхиальная астма, юношеский артрит и спондилит, IgA-нефропатия, а также эпикризов пациентов с похожей симптоматикой (табл. 5).

Всего в тестовом наборе данных представлено более 1000 историй болезни. Они содержат данные осмотра, анамнез и результаты проведения дополнительных исследований (томографии, рентгенографии, кожные пробы) в текстовой форме (заключения) и результаты анализов (анализы мочи, крови, посевы микрофлоры) в полуструктурированном виде. Для формирования представления данных в структурированном виде использовался метод анализа медицинских текстов.

Таблица 6. Результаты экспериментов по диагностике хронических заболеваний (полный набор признаков)

Нозология	Категоризация численных признаков	Метод	F_1	σ
Бронхиальная астма	Нет	Деревья решений	0,82	0,23
		Случайный лес	0,95	0,07
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,78	0,23
	Да	Деревья решений	0,86	0,19
		Случайный лес	0,98	0,04
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,81	0,20
IgA-нефропатия	Нет	Деревья решений	0,87	0,21
		Случайный лес	0,74	0,24
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,88	0,19
	Да	Деревья решений	0,92	0,15
		Случайный лес	0,74	0,24
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,90	0,16
Юношеский артрит	Нет	Деревья решений	0,91	0,07
		Случайный лес	0,94	0,05
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,96	0,03
	Да	Деревья решений	0,90	0,06
		Случайный лес	0,95	0,05
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,97	0,03

Таблица 7. Результаты экспериментов по диагностике хронических заболеваний (только численные признаки)

Нозология	Категоризация численных признаков	Метод	F_1	σ
Бронхиальная астма	Нет	Деревья решений	0,69	0,22
		Случайный лес	0,82	0,22
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,70	0,20
	Да	Деревья решений	0,61	0,25
		Случайный лес	0,73	0,19
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,65	0,24
IgA-нефропатия	Нет	Деревья решений	0,63	0,24
		Случайный лес	0,75	0,25
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,69	0,24
	Да	Деревья решений	0,64	0,24
		Случайный лес	0,75	0,24
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,69	0,24
Юношеский артрит	Нет	Деревья решений	0,79	0,16
		Случайный лес	0,87	0,10
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,83	0,14
	Да	Деревья решений	0,76	0,14
		Случайный лес	0,89	0,10
		Градиентный бустинг на деревьях решений	0,84	0,12

Описание результатов. В ходе первого эксперимента выполнялось исследование методов диагностики заболеваний с/без использования признаков, выделенных из текстовых полей (данные осмотра, анамнез, результаты обследований). Для каждого заболевания выявлялось качество его дифференциации от похожих заболеваний. Результаты представлены в табл. 6 и 7. Выявлено, что использование текстовых признаков позволяет значительно улучшить качество диагностики. Отметим также, что использование категоризации признаков позволяет повысить качество диагностики и уменьшить дисперсию ошибки. Наиболее высокого качества классификации на имеющемся тестовом наборе удалось добиться с помощью случайного леса.

В ходе второго эксперимента выделялись наиболее значимые признаки, связанные с диагностируемыми заболеваниями. В качестве исходных данных использовались данные осмотра, результаты анализов и информация из анамнеза, в том числе применяемые ранее препараты. Результаты этого эксперимента представлены в табл. 8.

В результате проведения третьего эксперимента получены шаблонные комбинации признаков заболеваний:

1. Набор ассоциативных правил, выражающих шаблонные комбинации признаков для болезней верхних дыхательных путей:
 ('ГИПЕРСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ', 'АСТМА БРОНХИАЛЬНАЯ', 'РИНИТ') => ('Монтелукаст')
 ('ГИПЕРСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ', 'АСТМА БРОНХИАЛЬНАЯ') => ('Будесонид')
 ('ГИПЕРСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ', 'РИНИТ') => ('АСТМА БРОНХИАЛЬНАЯ')
 ('КАШЕЛЬ', 'АСТМА БРОНХИАЛЬНАЯ') => ('РИНИТ')
 ('АСТМА БРОНХИАЛЬНАЯ') => ('Флутиказон')
 ('IGE повышен', 'РИНИТ') => ('КАШЕЛЬ')

('IGE повышен') => ('Уровень базофилов повышен')

('IGE повышен', 'ГИПЕРСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ') => ('РИНИТ')

2. Набор ассоциативных правил, выражающих шаблонные комбинации признаков для нефрологии:
 ('Белок в моче повышен', 'Холестерин повышен', 'СОЭ повышена') => ('Преднизолон')
 ('Холестерин повышен', 'Эритроциты в моче повышены') => ('Белок в моче повышен')
 ('IgG понижен', 'Холестерин повышен') => ('Белок в моче повышен')
 ('Холестерин повышен', 'СОЭ повышена', 'Альбумин понижен') => ('Белок в моче повышен')
3. Набор ассоциативных правил, выражающих шаблонные комбинации признаков для ревматологии:
 ('ЭКЗАНТЕМА') => ('Метотрексат', 'Метилпреднизолон')
 ('ЭКЗАНТЕМА') => ('Метилпреднизолон', 'Тоцилизумаб')
 ('ГОЛЕНЬ', 'ЭКЗАНТЕМА') => ('Тоцилизумаб')
 ('Метотрексат', 'ЭКЗАНТЕМА') => ('Метилпреднизолон')
 ('Холестерин повышен') => ('Эритроциты повышены')
 ('С-реактивный белок повышен') => ('Лейкоциты повышены')
 ('СОЭ повышена') => ('Лейкоциты повышены', 'Холестерин повышен')
 ('Эритроциты в моче повышены') => ('Количество патологических цилиндров в моче повышено')
 ('Эритроциты в моче повышены') => ('Лейкоциты повышены')
 ('Количество патологических цилиндров в моче повышено') => ('Круглый эпителий в моче повышен').
 Таким образом, работоспособность предложенной системы была подтверждена экспериментально.

Таблица 8. Наиболее значимые признаки, связанные с заболеваниями

Нозология	Тип признаков	Наиболее значимые признаки
Юношеский артрит	Текстовые признаки	Локализация: ягодичная область Симптом: лейкоцитоз Препарат: сульфасалазин Препарат: этанерцепт
	Численные признаки	Удельное количество лейкоцитов в крови Удельное количество тромбоцитов в крови Уровень креатинина в крови Уровень гемоглобина в крови СОЭ
IgA-нефропатия	Текстовые признаки	Симптом: васкулит Симптом: повышен уровень IgA Симптом: сердечный тон Симптом: гиперемия Локализация: спина
	Численные признаки	Уровень креатинина в крови Удельное количество цилиндров в моче Удельный вес мочи Уровень холестерина в крови Наличие слизи в моче
Бронхиальная астма	Текстовые признаки	Препарат: флутиказон Препарат: сальбутамол Симптом: сенсibilизация подтверждена кожными пробами Препарат: будесонид Симптом: бронхитические изменения в легких
	Численные признаки	Уровень эозинофилов в крови Уровень лимфоцитов в крови Уровень IgE в крови СОЭ Уровень базофилов в крови

Примечание. СОЭ — скорость оседания эритроцитов.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

В результате исследований была экспериментально подтверждена работоспособность предложенных методов извлечения информации из клинических текстов. В том числе проведена апробация методов извлечения заболеваний и лекарственных препаратов, распознавания конструкций, указывающих на отсутствие заболевания и на то, что заболевание не относится к пациенту, методов извлечения и нормализации атрибутов «тяжесть» и «течение» заболевания, а также метода, устанавливающего связи между областями тела и заболеваниями.

Произведена также апробация методов анализа медицинских данных: диагностики хронических заболеваний; определения значимых признаков, связанных с заболеваниями; выявления шаблонных комбинаций признаков заболеваний. Показано, что использование дополнительных признаков, полученных с помощью методов извлечения информации из клинических текстов, позволяет улучшить качество диагностики. Экспериментально подтверждена работоспособность подхода к интеграции различных методов анализа данных и текстов в комплексной системе. Таким образом, работоспособность предложенной системы была подтверждена экспериментально.

Обсуждение основного результата исследования

Анализ результатов экспериментальных исследований методов извлечения информации из клинических текстов

Анализ результатов экспериментальных исследований методов извлечения заболеваний и лекар-

ственных препаратов. По результатам проведенных экспериментов, разработанный метод извлечения заболеваний обладает наибольшим качеством (наибольшей F_1 -мерой — 82,4%). Как и ожидалось, он обладает большей точностью, чем первый «базовый» метод, и большей полнотой, чем второй. Стоит отметить, что преимущество разработанного метода над вторым «базовым» по F_1 -мере будет более значительным в задаче нормализации медицинских терминов и при строгом сопоставлении результатов автоматической разметки с «золотым стандартом». Второй «базовый» метод часто находит общие однословные термины, представленные в кодификаторе, но не отыскивает сложных словосочетаний.

Оценка полноты метода извлечения лекарственных препаратов оказалась немного ниже ожидаемой, поскольку разметчики при создании корпуса отмечали не только зарегистрированные в России лекарства, но и некоторые терапевтические косметические средства (например, специальные местные средства по уходу при кожных проявлениях аллергии). Было также отмечено, что некоторые ошибки, вызывающие снижение полноты, связаны с сокращениями наименований препаратов в клинических записях и использованием обобщенных названий: например, «пенициллин», тогда как в тезаурусе имеется лишь официальное наименование «бензатина бензилпенициллин».

Анализ результатов экспериментальных исследований методов распознавания конструкций, указывающих на отсутствие заболевания и на то, что заболевание не относится к пациенту. Полученные оценки качества методов показывают, что применение довольно простых правил и ша-

блонов позволяет добиваться высокого качества решения задач выделения атрибутов «отрицание» и «не пациент».

Анализ результатов экспериментальных исследований методов извлечения и нормализации атрибутов «тяжесть» и «течение» заболевания, а также метода, устанавливающего связи между областями тела и заболеваниями. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что разработанные методы извлечения и нормализации атрибутов «тяжесть» и «течение» заболевания, а также метод, устанавливающий связи между областями тела и заболеваниями, обладают высокой F_1 -мерой и позволяют решать указанные задачи с приемлемым качеством. Тем не менее остается значительное пространство для улучшения этих методов, что может быть достигнуто с помощью применения новых методов машинного обучения и разработки более сложного признакового пространства.

Анализ результатов экспериментальных исследований методов интеллектуального анализа медицинских данных

Анализ результатов экспериментальных исследований метода диагностики хронических заболеваний. В результате проведенных экспериментов было выявлено, что использование методов градиентного бустинга и случайного леса позволяет добиться наибольшей точности и полноты диагностики хронических заболеваний по сравнению с другими методами (деревья решений). В ходе экспериментов метод диагностики на основе градиентного бустинга показал большую устойчивость, что выразилось в меньшем значении среднеквадратичного отклонения F_1 -меры. Отметим, что совместное использование методов анализа структурированных и текстовых данных в рамках единой процедуры, а также выполнение предварительной категоризации числовых показателей здоровья пациентов позволило значительно повысить качество диагностики заболеваний.

Анализ результатов экспериментальных исследований метода определения значимых признаков, связанных с заболеваниями. В ходе эксперимента выполнялось обучение классификатора на основе случайного леса, и вычислялась значимость признаков заболеваний по Джини. Определялась значимость не только числовых показателей здоровья, но и текстовых признаков, таких как симптомы, их локализация, используемые препараты. Экспертный анализ выявленных значимых признаков подтвердил их связь с соответствующими хроническими заболеваниями.

Анализ результатов экспериментальных исследований метода выявления шаблонных комбинаций признаков заболеваний. В результате эксперимента выявлено наличие устойчивых неявных связей между различными показателями здоровья пациентов, а также применяемыми лекарственными препаратами и диагнозами. Произведена эвристическая оценка достоверности полученных связей. Отмечена перспектива использования метода в целях автоматизации процесса диагностики.

Заключение

В работе выполнено экспериментальное исследование методов извлечения информации из клинических текстов, методов интеллектуальной диагностики хронических заболеваний у детей, метода определения относительной значимости признаков заболевания, а также метода построения ассоциативных правил. Случайный

лес показал лучшее качество диагностики по сравнению с деревьями решений CART и градиентным бустингом на имеющемся тестовом наборе данных.

К основным научно-техническим проблемам, решенным при создании системы, относятся организация первичной обработки разнородных данных о пациентах, неравномерное распределение заболеваний в обучающей выборке и интеграция различных методов интеллектуального анализа данных и текстов в рамках единой системы. Первая проблема была решена с помощью методов извлечения информации из текстов.

Для решения второй проблемы потребовалось применение композиции алгоритмов классификации, таких как бэггинг (случайный лес) и градиентный бустинг на деревьях решений. Использование композиций классификаторов позволяло нивелировать перекосы обучающего набора данных.

Для решения третьей проблемы была разработана специфическая архитектура системы на основе спецификации OGSA [32], которая позволила произвольным образом комбинировать разнородные методы обработки данных и текстов в рамках выполнения лечебно-диагностических процедур.

Отметим, что совместное использование методов анализа структурированных и текстовых данных в рамках единой процедуры позволило значительно повысить качество диагностики хронических заболеваний системой. Использование предварительной категоризации числовых показателей здоровья пациентов также позволило добиться устойчивого прироста качества диагностики. Выявление наиболее значимых для диагностики признаков заболеваний и скрытых зависимостей в клинических данных, по результатам экспериментального исследования разработанной системы в многопрофильном педиатрическом центре, свидетельствует о перспективах ее использования в целях автоматизации процесса диагностики. Более того, созданная комплексная универсальная система способна анализировать разнородные данные как структурированного, так и неструктурированного характера и позволяет автоматизировать не только диагностический этап медицинской помощи, но и широкий спектр мероприятий в рамках лечебного процесса при ряде хронических нозологических форм в педиатрической практике.

Использованные методы извлечения информации из клинических текстов и анализа медицинских данных, а также их агрегации позволили ускорить и усовершенствовать процесс дифференциально-диагностического поиска при таких тяжелых, хронических, инвалидизирующих заболеваниях, как бронхиальная астма, юношеский артрит и спондилит, IgA-нефропатия. Для пациента педиатрического профиля несвоевременность установки диагноза и промедление в назначении патогенетической терапии являются основной составляющей прогноза течения и исхода болезни, определяют экономическое бремя данных нозологий для здравоохранения.

Дальнейшее совершенствование системы, назначение и внедрение подсистем поддержки принятия решений и анализа результатов, а также дополнение новыми нозологическими формами необходимо для обеспечения процесса качественного оказания медицинской помощи детям. В условиях внедрения современных возможностей информационно-коммуникационных технологий интеграция разработанной модели в клиническую практику обеспечит своевременность, качество и в то же

время позволит осуществлять аудит и контроль оказания медицинской помощи пациентам детской возрастной категории.

комплексной системы интеллектуальной обработки данных (на примере многопрофильного педиатрического центра)».

Источник финансирования

Исследование поддержано грантом РФФИ № 13-04-12062 «офи_м» «Исследование методов и средств интеллектуального анализа данных для построения

Конфликт интересов

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

ЛИТЕРАТУРА

- Musen MA, Middleton B, Greenes RA. Clinical decision-support systems. In: Biomedical informatics. Springer; 2014. p. 643–674. Doi:10.1007/978-1-4471-4474-8_22.
- Isa NAM. Towards intelligent diagnostic system employing integration of mathematical and engineering model. In: Proceedings of International Conference on Mathematics, Engineering and Industrial Applications. AIP Publishing; 2015. p. 030002–1–030002–13. Doi:10.1063/1.4915633.
- Abeer YA, Ahmad MA, Majid AA. Clinical decision support system for diagnosis and management of chronic renal failure. In: Proceedings of Applied Electrical Engineering and Computing Technologies. IEEE; 2013. p. 1–6. Doi:10.1109/aect.2013.6716440.
- Zarandi MHF, Zolnoori M, Moin M, Heidarnajad H. A fuzzy rule-based expert system for diagnosing asthma. Transaction E: Industrial Engineering. 2010;17(2):129–142.
- Prosperi MC, Marinho S, Simpson A, Custovic A, Buchan IE. Predicting phenotypes of asthma and eczema with machine learning. BMC medical genomics. 2014;7(1). Doi:10.1186/1755-8794-7-s1-s7.
- Carroll RJ, Thompson WK, Eyer AE, Mandelin AM, Cai T, Zink RM, et al. Portability of an algorithm to identify rheumatoid arthritis in electronic health records. Journal of the American Medical Informatics Association. 2012;19(e1):e162–e169. Doi:10.1136/amiajnl-2011-000583.
- Wright A, Chen ES, Maloney FL. An automated technique for identifying associations between medications, laboratory results and problems. Journal of biomedical informatics. 2010;43(6):891–901. Doi:10.1016/j.jbi.2010.09.009.
- Doddi S, Marathe A, Ravi SS, T DC. Discovery of association rules in medical data. Informatics for Health and Social Care. 2001;26(1):25–33. Doi:10.1080/14639230117529.
- Stilou S, Bamidis P, Maglaveras N, Pappas C. Mining association rules from clinical databases: an intelligent diagnostic process in healthcare. Studies in health technology and informatics. 2001;(2):1399–1403.
- Dligach D, Bethard S, Becker L, Miller TA, Savova GK. Discovering body site and severity modifiers in clinical texts. Journal of the American Medical Informatics Association (JAMIA). 2014;p. 448–454. Doi:10.1136/amiajnl-2013-001766.
- Chikka VR, Mariyasagayam N, Niwa Y, Karlapalem K. Information Extraction from Clinical Documents: Towards Disease/Disorder Template Filling. In: Experimental IR Meets Multilinguality, Multimodality, and Interaction. Springer; 2015. p. 389–401. Doi:10.1007/978-3-319-24027-5_41.
- Баранов АА, Намазова-Баранова ЛС, Смирнов ИВ, Девяткин ДА, Шелманов АО, Вишнева ЕА, et al. Методы и средства комплексного интеллектуального анализа медицинских данных. Труды ИСА РАН. 2015;65(2):81–93.
- Gudgin M, Hadley M, Mendelsohn N, Moreau JJ, Nielsen HF, Karmarkar A, et al. Soap version 1.2 part 1: Messaging framework. W3C Working Draft, DevelopMentor, Sun, IBM, Canon, Microsoft. 2002.
- Shelmanov AO, Smirnov IV. Methods for semantic role labeling of Russian texts. In: Computational Linguistics and Intellectual Technologies. Papers from the Annual International Conference «Dialogue» (2014). 13; 2014. p. 607–620.
- Osipov G, Smirnov I, Tikhomirov I, Shelmanov A. Relational-situational method for intelligent search and analysis of scientific publications. In: Proceedings of the Integrating IR Technologies for Professional Search Workshop; 2013. p. 57–64. Doi:10.3103/s0147688210060080.
- Shelmanov AO, Smirnov IV, Vishneva EA. Information Extraction from Clinical Texts in Russian. In: Computational Linguistics and Intellectual Technologies. Papers from the Annual International Conference «Dialogue» (2015). 13; 2015. p. 560–572.
- Aronson AR, Lang FM. An overview of MetaMap: historical perspective and recent advances. Journal of the American Medical Informatics Association. 2010;17(3):229–236. Doi:10.1136/jamia.2009.002733.
- Schuyler PL, Hole WT, Tuttle MS, Sherertz DD. The UMLS Metathesaurus: representing different views of biomedical concepts. Bulletin of the Medical Library Association. 1993;81(2).
- 2014AA UMLS MeSH Russian Source Information URL: <http://www.nlm.nih.gov/research/umls/sourcereleasedocs/current/MShRUS/>; 2015.
- Государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС) URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>; 2015.
- Breiman L, Friedman J, Stone CJ, Olshen RA. Classification and regression trees. CRC press; 1984. Doi:10.2307/2530946.
- Breiman L. Random forests. Machine learning. 2001;45(1):5–32. Doi:10.1023/A:1010933404324.
- Friedman JH. Greedy function approximation: a gradient boosting machine. Annals of statistics. 2001;p. 1189–1232. Doi:10.1214/aos/1013203451.
- Breiman L. Technical note: Some properties of splitting criteria. Machine Learning. 1996;24(1):41–47. Doi:10.1007/bf00117831.
- Agrawal R, Inski T, Swami A. Mining association rules between sets of items in large databases. In: Proceedings of the 1993 ACM SIGMOD International Conference on Management of Data. vol. 22. ACM; 1993. p. 207–216. Doi:10.1145/170036.170072.
- Agrawal R, Srikant R. Fast algorithms for mining association rules. In: Proceedings of 20th International Conference on Very Large Data Bases. vol. 1215; 1994. p. 487–499.
- Vapnik V. The nature of statistical learning theory. Springer Science & Business Media; 1998.
- Воронцов КВ. Комбинаторный подход к оценке качества обучаемых алгоритмов. Математические вопросы кибернетики. 2004;13:5–36.
- Kelly L, Goeuriot L, Suominen H, Schreck T, Leroy G, Mowery DL, et al. Overview of the SHARE/CLEF eHealth evaluation lab 2014. In: Information Access Evaluation. Multilinguality, Multimodality, and Interaction. Springer; 2014. p. 172–191. Doi:10.1007/978-3-319-11382-1_17.
- Powers DM. Evaluation: from precision, recall and F-measure to ROC, informedness, markedness and correlation. 2011;2(1):37–63.

31. Freund Y, Schapire R, Abe N. A short introduction to boosting. Journal-Japanese Society For Artificial Intelligence. 1999;14(771-780):1612.
32. Corcho O, Alper P, Kotsiopoulos I, Missier P, Bechhofer S, Goble C. An overview of S-OGSA: A reference semantic grid architecture. Web Semantics: Science, Services and Agents on the World Wide Web. 2006;4(2):102–115. Doi:10.1016/j.websem.2006.03.001.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Баранов Александр Александрович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-30-83, e-mail: baranov@nczd.ru

Намазова-Баранова Лейла Сеймуровна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, директор НИИ педиатрии ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 967-14-14, e-mail: namazova@nczd.ru

Смирнов Иван Валентинович, кандидат физико-математических наук, доцент, заведующий лабораторией «Компьютерная лингвистика и интеллектуальный анализ информации» Института системного анализа Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» Российской академии наук (ИСА ФИЦ ИУ РАН)

Адрес: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 9, тел.: +7 (499) 135-90-20, e-mail: ivs@isa.ru

Девяткин Дмитрий Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории «Интеллектуальные технологии и системы» ИСА ФИЦ ИУ РАН

Адрес: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 9, тел.: +7 (499) 135-90-20, e-mail: devyatkin@isa.ru

Шелманов Артём Олегович, кандидат технических наук, младший научный сотрудник лаборатории «Компьютерная лингвистика и интеллектуальный анализ информации» ИСА ФИЦ ИУ РАН

Адрес: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 9, тел.: +7 (499) 135-90-20, e-mail: shelmanov@isa.ru

Вишнёва Елена Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая отделом стандартизации и клинической фармакологии ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-65, e-mail: vishneva@nczd.ru

Антонова Елена Вадимовна, доктор медицинских наук, заведующая отделом прогнозирования и планирования научных исследований ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-15-66, e-mail: antonova@nczd.ru

Смирнов Владимир Иванович, кандидат экономических наук, заместитель директора по информационным технологиям ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-15-66, e-mail: support@nczd.ru

Ирина Соломоновна Фрейдлин



7 марта исполнилось 80 лет главному научному сотруднику отдела иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», заслуженному деятелю науки Российской Федерации, члену-корреспонденту Российской академии наук, доктору медицинских наук, профессору Ирине Соломоновне Фрейдлин.

Ирина Соломоновна родилась в Ленинграде. В 1959 г. окончила 1-й Ленинградский медицинский институт имени академика И.П. Павлова, затем аспирантуру при кафедре микробиологии этого же учебного заведения. Кандидатская диссертация молодого специалиста была посвящена изучению фагоцитоза, докторская — роли макрофагов в иммуногенезе. Ирина Соломоновна работала на кафедре в должности ассистента, доцента, а с 1976 г. — профессора кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Основным направлением научных исследований Ирины Соломоновны стало изучение проблем фундаментальной, инфекционной и клинической иммунологии.

И.С. Фрейдлин — ведущий отечественный специалист по системе мононуклеарных фагоцитов. В ее монографии «Система мононуклеарных фагоцитов» (1984) подведены итоги многолетнего изучения регуляции функций макрофагов в эксперименте и особенностей моноцитов крови больных.

Приоритетные исследования Ирины Соломоновны были посвящены моделированию на животных иммунодефицитных состояний с избирательными дефектами фагоцитирующих клеток, которые нашли применение при изучении различных иммуномодулирующих препаратов. Цикл работ И.С. Фрейдлин, посвященных иммуномодулирующим свойствам синтетических пептидов, позволил ей сформулировать некоторые общие принципы поиска иммуномодулирующих препаратов. Ученой показана двойственная роль в противoinфекционной защите макрофагов и провоспалительных цитокинов, которые могут выполнять как защитные функции, так и участвовать в механизмах повреждения. В работах И.С. Фрейдлин впервые была доказана возможность целенаправленной регуляции функций макрофагов. Ею были селекционированы короткие пептиды из состава природных биорегуляторов, в том числе провоспалительных цитокинов, способные имитировать активирующие эффекты целых молекул.

Под руководством Ирины Соломоновны получило развитие новое научное направление — изучение цитокиновой регуляторной сети. В отделе иммунологии НИИ экспериментальной медицины проводится широкое изучение различных проявлений биологической активности про- и противовоспалительных цитокинов; исследуется влияние различных факторов внутренней и внешней среды на интенсивность продукции цитокинов с целью изыскания путей ее регуляции. Цитокиновая регуляторная сеть исследуется и в связи с проблемами инфекционной иммунологии. В частности, ученой была выявлена способность иммунных комплексов, образованных бактериальным токсином или коксиеллезным антигеном, индуцировать секрецию провоспалительных цитокинов фагоцитирующими клетками.

В отделе иммунологии Института налажены методы культивирования эндотелиальных клеток и их кокультивирования с макрофагоподобными клетками. Использование таких модельных систем позволило исследовать влияние атерогенных липопротеинов на продукцию цитокинов в атеросклеротической бляшке в лабораторных условиях. Была разработана экспериментальная модель для изучения про- и антиангиогенных эффектов с использованием перевиваемой линии человеческих эндотелиальных клеток. Проведенные исследования цитокинового контроля процессов пролиферации, функциональной активности и взаимодействия с мононуклеарными фагоцитами эндотелиальных клеток перевиваемой линии позволили сделать заключение, что про- и противовоспалительные цитокины вызывают существенные изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток, их адгезионных свойств и секреторной активности.

В совместных с клиницистами исследованиях И.С. Фрейдлин были предложены патогенетически обоснованные подходы к выбору иммунологических тестов и к трактовке полученных результатов исследований. Разработаны новые методы, позволяющие оценить функциональную активность моноцитов крови у больных с различной патологией, показана высокая информативность оценки цитокинового статуса.

Ирина Соломоновна выполняла совместные научные проекты с голландскими и бельгийскими учеными, участвовала с докладами в четырех международных конгрессах иммунологов. В научно-исследовательской работе она до сих пор поддерживает творческие контакты с зарубежными специалистами из Нидерландов, Бельгии, Франции, Англии, США, Швеции, Израиля.

И.С. Фрейдлин является автором 192 печатных работ, среди которых 10 монографий, 5 учебников, руководство к лабораторным занятиям, 5 авторских свидетельств на изобретения (в соавторстве).

И.С. Фрейдлин много внимания и энергии уделяет подготовке научных кадров. При ее научной консультации и под непосредственным руководством выполнены 4 докторские и 22 кандидатские диссертации. Ирина Соломоновна имеет богатый опыт педагогической работы: читает курсы лекций по фундаментальной и клинической иммунологии, а также лекции на курсах повышения квалификации врачей; ведет спецкурс по иммунологии для студентов.

И.С. Фрейдлин — председатель Правления Санкт-Петербургского регионального отделения Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов, член Правления Российского научного общества иммунологов, главный редактор научного журнала «Медицинская иммунология», член редакционных коллегий научных журналов «Иммунология», «Russian Journal of Immunology», «Аллергология». Является руководителем грантов РФФИ и гранта Президента Российской Федерации, экспертом РФФИ и РНФ.

И.С. Фрейдлин награждена медалью «Ветеран труда», знаками «Житель блокадного Ленинграда» и «Изобретатель СССР».

Бюро отделения медицинских наук и Бюро секции профилактической медицины отделения медицинских наук Российской академии наук, редколлегия журнала «Вестник РАМН», друзья, коллеги и ученики сердечно поздравляют Ирину Соломоновну с юбилеем и желают ей здоровья, счастья, благополучия, долгих лет активной жизни и новых творческих успехов на благо медицинской науки, здравоохранения и образования.