

# ВЕСТНИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ANNALS OF THE RUSSIAN ACADEMY  
OF MEDICAL SCIENCES



4

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.  
Индексируется в базах данных: Elsevier BV Scopus, Pub Med, Embase, EBSCO,  
Russian Science Citation Index.

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,  
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**

---

## 2018/том 73/№4

---

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](mailto:vestnikramn@nczd.ru)

Отпечатано ООО «Полиграфист и издатель». 119501, Москва, ул. Веерная, 22-3-48. Тел. +7 (499) 737-78-04.

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).

The journal is indexed in Elsevier BV Scopus, Pub Med, Embase, EBSCO,  
Russian Science Citation Index.

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,  
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

**SCIENCE EDITOR: A.A. KUBANOV**

---

# 2018/ 73 (4)

---

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](mailto:vestnikramn@nczd.ru)

Printed by «PRINTER & PUBLISHER» Ltd, 22-3-48, Veernaya street, Moscow, 119501. Tel. +7 (499) 737-78-04.

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ АКУШЕРСТВА И ГИНЕКОЛОГИИ

*Д.Е. Никифорова, Т.А. Макаренко, А.Б. Салмина*  
Молекулярные механизмы формирования синдрома хронической тазовой боли у пациенток с наружным генитальным эндометриозом: маркеры и мишени для диагностики и терапии (обзор литературы)

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОХИМИИ

*Л.И. Колесникова, А.А. Семендяев, Д.А. Ступин, М.А. Даренская, Л.А. Гребёнкина, Л.В. Натяганова, И.Н. Данусевич, М.А. Черепанова, С.И. Колесников*  
Интенсивность процессов липопероксидации у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза в зависимости от стадии заболевания

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КАРДИОЛОГИИ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ

*А.В. Красюков, Е.В. Машковский, Е.Е. Ачкасов, Е.М. Кащенко*  
Нарушения работы сердечно-сосудистой системы у людей с хронической травмой спинного мозга при занятиях адаптивной физической культурой и паралимпийским спортом

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МИКРОБИОЛОГИИ

*О.Ю. Манзеньюк, В.В. Фирстова, Т.Н. Мухина, И.Г. Шемякин*  
Молекулярные системы регулирования формирования биопленок бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПСИХОЛОГИИ И ПСИХИАТРИИ

*Э.А. Мордовский, А.Г. Соловьёв, А.Л. Санников*  
Актуальные методические проблемы оценки масштаба негативных последствий потребления алкоголя и пути их решения

### OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY: CURRENT ISSUES

**221** *D.E. Nikiforova, T.A. Makarenko, A.B. Salmina*  
Molecular Mechanisms of Formation of Chronic Pelvic Pain Syndrome in Patients with External Genital Endometriosis: Markers and Targets for Diagnosis and Therapy (Review)

### BIOCHEMISTRY: CURRENT ISSUES

**229** *L.I. Kolesnikova, A.A. Semendyaev, D.A. Stupin, M.A. Darenskaya, L.A. Grebenkina, L.V. Natyaganova, I.N. Danusevich, M.A. Cherepanova, S.I. Kolesnikov*  
The Intensity of Lipid Peroxidation Processes in Women with Primary Varicose Veins of the Pelvic

219

### CARDIOLOGY AND CARDIOVASCULAR SURGERY: CURRENT ISSUES

**236** *A.V. Krassioukov, E.V. Mashkovskiy, E.E. Achkasov, E.M. Kashchenko*  
Disturbances of Cardiovascular System in Persons with Chronic Spinal Cord Injury during Exercise and Participation in Paralympic Sports

### MICROBIOLOGY: CURRENT ISSUES

**244** *O.Yu. Manzenyuk, V.V. Firstova, T.N. Mukhina, I.G. Shemyakin*  
Molecular Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms

### PSYCHOLOGY AND PSYCHIATRY: CURRENT ISSUES

**252** *E.A. Mordovsky, A.G. Soloviev, A.L. Sannikov*  
Actual Methodical Problems of the Assessment of Negative Consequences of Alcohol Consumption and Ways to Solve them

## АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ

*Ф.М. Кипкеева, Т.А. Музаффарова, М.П. Никулин,  
П.В. Апанович, А.В. Карпукхин*

Перспективные гены-мишени таргетной терапии  
и прогностические биомаркеры рака желудка

## ONCOLOGY: CURRENT ISSUES

**262** *F.M. Kipkeeva, T.A. Muzaffarova, M.P. Nikulin,  
P.V. Apanovich, A.V. Karpukhin*

Promising Targeted Therapies Genes and Prognostic  
Biomarkers of Gastric Cancer

## АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПЕДИАТРИИ

*О.Л. Морозова, П.Ф. Литвицкий, Д.А. Морозов,  
Л.Д. Мальцева*

Механизмы развития нефросклероза  
у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом

## PEDIATRICS: CURRENT ISSUES

**273** *Olga L. Morozova, Peter F. Litvitskiy, Dmitri A. Morozov,  
Larisa D. Maltseva*

Mechanisms of Nephrosclerosis Development  
in Children with Vesicoureteral Reflux

## АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭНДОКРИНОЛОГИИ

*М.С. Михина, В.А. Иоутси, Е.А. Трошина*

Роль высокоэффективной жидкостной  
хроматографии – тандемной  
масс-спектрометрии в оптимизации диагностики  
и лечения заболеваний щитовидной железы

## ENDOCRINOLOGY: CURRENT ISSUES

**279** *M.S. Mikhina, V.A. Ioutsi, E.A. Troshina*

The Role of High-Performance Liquid  
Chromatography – Tandem Mass Spectrometry  
in Optimizing Diagnosis and Treatment  
of Thyroid Diseases

Д.Е. Никифорова\*, Т.А. Макаренко, А.Б. Салмина

Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого,  
Красноярск, Российская Федерация

# Молекулярные механизмы формирования синдрома хронической тазовой боли у пациенток с наружным генитальным эндометриозом: маркеры и мишени для диагностики и терапии (обзор литературы)

В статье систематизированы результаты исследований относительно патогенетических механизмов формирования синдрома хронической тазовой боли у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. Боль является одним из тяжелых клинических проявлений и осложнений эндометриоза, представляет собой актуальный и сложный вопрос, так как длительный диагностический поиск (занимающий в среднем 5–8 лет) приводит к формированию стойкого автономного болевого синдрома, что сопровождается рецидивами даже после выполненного комплексного лечения (хирургического и/или длительного гормонального). У больных эндометриозом имеет место смешанный характер боли, включающий в себя нейропатический и ноцицептивный компоненты, что доказано на примере экспрессии в эктопических очагах специфических биомаркеров. Поэтому так остро стоит вопрос раннего выявления эндометриоза с помощью неинвазивных методов, что возможно лишь при разработке диагностической панели, состоящей из биомаркеров, экспрессирующихся эктопическими очагами уже на начальной стадии развития заболевания.

**Ключевые слова:** наружный генитальный эндометриоз, хроническая тазовая боль, нейропатическая боль, ноцицептивная боль, молекулы-мишени, экспрессия биомаркеров, биомаркеры боли.

(Для цитирования: Никифорова Д.Е., Макаренко Т.А., Салмина А.Б. Молекулярные механизмы формирования синдрома хронической тазовой боли у пациенток с наружным генитальным эндометриозом: маркеры и мишени для диагностики и терапии (обзор литературы). *Вестник РАМН*. 2018;73(4):221–228. doi: 10.15690/vramn937)

221

## Механизмы развития и молекулы-маркеры эндометриоза

Эндометриоз является хроническим эстрогензависимым заболеванием, при котором происходит имплантация эндометриоидных гетеротопий, что вызывает значи-

тельные боли в области таза, снижение качества жизни и зачастую бесплодие. Изучение вопросов патогенеза, неинвазивной ранней диагностики и лечения этого заболевания занимает место в ряду актуальных проблем в гинекологической практике. Это связано с тем, что наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) поражает до 10–15%

D.E. Nikiforova\*, T.A. Makarenko, A.B. Salmina

Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky,  
Krasnoyarsk, Russian Federation

## Molecular Mechanisms of Formation of Chronic Pelvic Pain Syndrome in Patients with External Genital Endometriosis: Markers and Targets for Diagnosis and Therapy (Review)

This article systematizes the results of studies on the pathogenetic mechanisms of CPPS formation in patients with EGE. Pain is one of the severe clinical manifestations and complications of endometriosis. To ease the pain in patients with EGE is complex but urgent task. Long diagnostic search (mean period 5–8 years) leads to the formation of a persistent Autonomous pain syndrome associated with relapses of pain even after a comprehensive treatment of patients (surgical and/or long-term hormonal). Patients with endometriosis suffer from mixed pain including neuropathic and nociceptive components which is proved by the example of expression in ectopic foci of specific biomarkers. Therefore, the question of early non-invasive diagnosis of endometriosis is very vital and can be solved by the development of a diagnostic panel consisting of biomarkers expressed by ectopic foci at the initial stage of the disease.

**Key words:** external genital endometriosis; chronic pelvic pain; neuropathic pain; nociceptive pain; target molecules; expression of biomarkers; biomarkers of pain.

(For citation: Nikiforova DE, Makarenko TA, Salmina AB. Molecular Mechanisms of Formation of Chronic Pelvic Pain Syndrome in Patients with External Genital Endometriosis: Markers and Targets for Diagnosis and Therapy (Review). *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2018;73(4):221–228. doi: 10.15690/vramn937)

женщин в общей популяции, при этом на долю женщин репродуктивного возраста приходится от 10 до 45%, для пациенток с бесплодием этот показатель составляет ~25%, с синдромом хронических тазовых болей — 70–80% [1].

В настоящее время диагностика эндометриоза достаточно сложна, поскольку основана только на симптомах, клиническом обследовании, методах визуализации (ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография), анализах крови или мочи. Отчасти это связано с тем, что нет достоверных диагностических маркеров

или их групп, которые являлись бы специфическими для этого заболевания [2–4]. На сегодняшний день имеется более 100 предполагаемых периферических биомаркеров, связанных с механизмами дисрегуляции у больных эндометриозом (адгезия, апоптоз, ангиогенез; гормональные, иммунологические, факторы роста), которые были предложены и рассмотрены в отношении их диагностической значимости с высокой чувствительностью и специфичностью, но ни один из них не доказал свою высокую эффективность [3–5] (табл.).

**Таблица.** Чувствительность и специфичность маркеров и их комбинаций у больных эндометриозом

Маркер / комбинация маркеров	Среда	Чувствительность / специфичность при эндометриозе I–IV ст., %	Исследование, источник
CA-125 (углеводный антиген 125, муцин-16; белок, используемый в качестве онкомаркера рака яичников и его метастазов)	Кровь	50–60 / 72–80	Исследование плазмы крови; Центр рождаемости Левенского католического университета (LUFС), Бельгия [4]
Группа: CA-125, синтаксин-5 и ламинин-1	Кровь	90 / 70	Изучение гамма 2 ламинина-332 в нормальном и эктопическом эндометрии пациенток с эндометриозом, Италия [6]
Группа: CA-125, хемокиновые рецепторы, моноцитарный хемоаттрактантный протеин (Monocyte chemoattractant protein, MCP) 1	Кровь	92,2 / 81,6	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
Группа: CA-125, интерлейкин 8 (IL8) и фактор некроза опухоли α (TNFα)	Кровь	89,7 / 71,1	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
Группа: CA-125, сосудисто-эндотелиальный фактора роста (VEGF), аннексин V (Annexin V), гликоделина растворимые межклеточные молекулы адгезии-1 (Glycodelin-soluble intercellular adhesion molecule, sICAM)	Кровь	74–94 / 55–75	Исследование плазмы крови; Центр рождаемости Левенского католического университета (LUFС), Бельгия [4]
Копептин	Кровь	65 / 58,3	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
VEGF		80/0	Исследование экспрессии VEGF-A у женщин с эндометриозом [8]
Группа из 3 пептидных пиков в протеомном спектре	Кровь	91,4 / 95	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
Комбинация гидроксисфингомиелина C16:1 и соотношение между фосфатидилхолином C36:2 и эфиром-фосфолипидом C34:2	Кровь	90,0 / 84,3	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
3280.9 Da перивульварный пептид	Моча	82 / 88	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
Енолаза-1	Моча	56 / 72	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
Группа из 5 дифференциально экспрессирующихся пептидных пиков 5,385; 5,425; 5,891; 6,448 и 6,898 м/з (м/з — отношение массы к заряду)	Биоптат эндометрия	91,7 / 90	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза

Таблица. Чувствительность и специфичность маркеров и их комбинаций у больных эндометриозом (Окончание)

Маркер / комбинация маркеров	Среда	Чувствительность / специфичность при эндометриозе I–IV ст., %	Исследование, источник
Группа из 3 дифференциально экспрессирующихся пептидных пиков (16,069; 15,334 и 15,128 м/з)	Биоптат эндометрия	87,5 / 86,2	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
Группа из 5 дифференциально экспрессирующихся пептидных пиков в секреторную фазу эндометрия (1,949; 5,183; 8,650; 8,659 и 13,910 м/з)	Биоптат эндометрия	89,5 / 90	Кокрановская библиотека [7]: исследование диагностической точности биомаркеров эндометрия в диагностике эндометриоза
Группа: PGP9.5 (белковый продукт гена 9,5; убиквитин карбокситерминальная гидролаза-1), субстанция P и вазоинтестинальный пептид	Биоптат эндометрия	95 / 100	Кокрановская библиотека [9]: Исследование нейротрофического фактора в развитии эндометриоза
PGP9.5	Биоптат эндометрия	98 / 83	Кокрановская библиотека [9]: Исследование нейротрофического фактора в развитии эндометриоза

Исследования зарубежных коллег показали, что эпителиальные и стромальные клетки в эндометриозных очагах имеют повышенную способность к экспрессии молекул адгезии [10], включая интегрины, молекулы межклеточной адгезии (Intercellular adhesion molecules, ICAMs) [11], ламинин [6], фибронектин и E-кадгерин, а также содействуют реконструкции ткани и инвазии эктопических очагов за счет увеличения экспрессии матриксных металлопротеиназ (Matrix metalloproteinases, MMP) — ключевых ферментов, ответственных за ремоделирование внеклеточного матрикса [11, 12] и уменьшение экспрессии тканевых ингибиторов металлопротеиназ (Tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) [13]. Эти механизмы ответственны за развитие и прогрессирование эндометриоза, тяжелые формы которого приводят к изнуряющим болям и нарушениям функций органов, подверженных распространению патологических очагов [12, 13].

Наиболее частым осложнением НГЭ, снижающим качество жизни и работоспособность женщин репродуктивного возраста, является синдром хронических тазовых болей. В структуре этого синдрома выделяют следующие виды боли: ноцицептивную (соматическую и висцеральную), нейропатическую, психогенную и смешанную [3, 4]. Изнуряющее и длительное течение заболевания меняет психосоматический статус женщины. Однако в настоящее время, к сожалению, отсутствует терапия, купирующая полностью синдром хронических тазовых болей и избавляющая пациенток от рецидивов боли. Это связано со сложными патофизиологическими механизмами болевого синдрома, который в кратчайшие сроки на фоне изменений со стороны вегетативной нервной системы переходит в автономный режим существования [3, 4]. В связи с этим остается приоритетным вопрос разработки комплексной терапии, которая на сегодняшний день имеет лишь временный эффект, не предотвращая развитие рецидивов заболевания.

С позиции патофизиологии болевого синдрома, в основе синдрома хронических тазовых болей у пациенток с НГЭ лежат важные биомеханизмы, включающие воспаление, ноцицепцию и нейропатию (спектр молекул, экспрессируемых в тканях, поврежденных эндометриозными гетеротопиями, представлен на рис.).

### Воспаление и формирование хронического болевого синдрома при эндометриозе

223

На основании современных данных, патогенетический механизм боли у пациенток с генитальным эндометриозом основан на имплантации в брюшину эндометриозных очагов, что приводит к развитию воспалительной реакции и экспрессии биологических медиаторов воспаления и боли (простагландинов, гистаминов, кининов), а глубокая пенетрация приводит к поражению не только тканей, но и нервов. Брюшина не является инертной тканью, и в ответ на инвазию гетеротопических имплантатов возникает локальная реакция, которая носит неспецифический воспалительный характер. Значимое влияние на данный процесс оказывают ростовые факторы, а также факторы воспаления в перитонеальной жидкости. Вокруг эндометриозных очагов выявлены достоверное увеличение числа тканевых базофилов, усиление активности нейтрофилов и макрофагов, в результате чего происходит стимуляция воспалительной реакции с последующим ангиогенезом на ранних стадиях развития НГЭ [12, 13].

Морфологическая основа для соматогенной боли в очагах эндометриоза при его тяжелых формах — это локальная воспалительная реакция с формированием окислительного стресса и увеличением пролиферации клеточных элементов, поддерживаемая автономным стероидогенезом. Последующее формирование болевых рецепторов и нервных структур усиливается экспрессией клетками гетеротопий — маркера пролиферативной активности клеток (Ki-67), фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазы (PTEN), кластера дифференцировки, молекулы межклеточной адгезии (CD34), сосудисто-эндотелиального фактора роста (Vascular endothelial growth factor, VEGF), циклооксигеназы-2 (Cyclooxygenase-2, COX2), MMP 1 и 2 [12, 13]. Указывается и значимая роль воспаления в эктопических очагах, равно как и в развитии синдрома хронической тазовой боли при НГЭ [13]. Воспалительный ответ в эндометриозных гетеротопиях, гиперпластические изменения и неоангиогенез на локальном уровне, а также облегчение периневрального, пери- и интраваскулярного



Рис. Биомаркеры эндометриоза

*Примечание.* HGF (Hepatocyte growth factor) — маркер активности адипоцитов, FGF (Fibroblast growth factor) — фактор роста фибробластов, IGF (Insulin-like growth factor) — инсулиноподобный фактор роста, GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, CRP (C-reactive protein) — С-реактивный белок, СЭФР — сосудисто-эндотелиальный фактор роста, sFlt — растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1, Fas (First apoptosis signal) — первый сигнал апоптоза. Остальные значения биомаркеров указаны в тексте.

224

роста эктопических очагов поддерживается высокой продукцией MMP 1 и 2 [12, 13]. Развитию ангиогенеза способствует усиленная и несбалансированная продукция проангиогенных факторов (VEGF, лактата, трансформирующего фактора роста бета-1, метаболитических факторов HIF1A, PDK1, LDHA, GLUT1, TSP) [8, 14], а формирование эндометриозных гетеротопий включает в себя элементы эпителиально-мезенхимального перехода [15].

Эпителиальный мезенхимальный переход — это процесс, при котором эпителиальные клетки теряют поляризованную организацию цитоскелетных и клеточно-клеточных контактов, приобретая высокую подвижность мезенхимальных клеток. Эти изменения являются предпосылками для первоначального формирования эндометриозных очагов. Кроме того, существуют два стимулирующих сигнала — гипоксия и эстрогены, которые способствуют активации процесса эпителиального мезенхимального перехода при эндометриозе. Эти пути связаны со многими клеточными факторами, такими как трансформирующий фактор роста бета-1 и Wnt (Wingless + Int), что, в конечном счете, приводит к распространению клеток и их миграции [15]. В совокупности эти изменения формируют основу для реализации механизма ноцицепции и развития нейропатии.

На протяжении последних лет активно изучаются функции полимодальных ваниллоидных рецепторов типа 1 (Transient receptor potential vanilloid, TRPV1), которые отвечают за ноцицептивную информацию. Благодаря проводимым исследованиям получены первые результаты, которые доказывают роль TRPV1 в формировании хронических тазовых болей при НГЭ и дисменорее у больных аденомиозом [16]. Таким образом, было показано, что активность TRPV1 приводит к секреции нейропептидов, которые отвечают за нейрогенное воспаление, результатом чего становится активация нейтрофилов, макрофагов,

процесс окислительного стресса, экскреция интерлейкинов 1, 6 и фактора некроза опухоли (Tumor necrosis factor, TNF)  $\alpha$ , дегрануляция тучных клеток [17]. Суммация данных изменений приводит не только к развитию болевого синдрома, но и способствует прогрессированию эндометриоза. По данным О. Ростовцевой и соавт. [18], в группах больных НГЭ и тяжелым болевым синдромом (7–10 баллов по визуальной аналоговой шкале) отмечена усиленная экспрессия TRPV1, что доказывает их роль в развитии болевого синдрома у женщин с НГЭ. Исследователями сделан вывод о возможности блокады TRPV1 как о перспективном патогенетическом варианте терапии болевого синдрома при эндометриозе [18].

За последние годы сформированы данные, которые свидетельствуют о значимости воспалительных и иммунных клеток в развитии болевого синдрома, который генерируется при поражении периферических нервов [17]. В месте локального повреждения нерва дегранулируют тучные клетки, что приводит к высвобождению таких воспалительных медиаторов, как гистамин, TNF $\alpha$ , которые сенсбилизируют ноцицепторы и активируют Т-лимфоциты, нейтрофилы и макрофаги, в свою очередь экспрессирующие другие воспалительные медиаторы, такие как простагландин E2. При травме нервного волокна индуцируется экспрессия нейротропных факторов (фактора роста нервов), TNF $\alpha$  и простагландина E2 из шванновских клеток миелинизированных аксонов. Нейротравма сопровождается выделением нервными окончаниями нейропептидов — субстанции P (Substance P, SP) и кальцитонин-генеродетивного пептида (Calcitonin gene-related peptide, CGRP). Данные субстраты сенсбилизируют нервные волокна и нейроны в дорсальных рогах спинного мозга и вызывают у пациентов центральные болевые ощущения [19].

Эти факты говорят в пользу **ноцицептивного характера боли** у больных эндометриозом.

## Механизмы развития нейропатической боли при эндометриозе

Для нейропатического механизма боли у пациенток с НГЭ характерны перинеуральный и пери- и интраганглионарный типы инвазивного роста эндометриозной ткани. Эктопические очаги за счет роста гладкомышечной и фиброзной ткани травмируют нервные волокна и ганглии, а также нарушают регенерацию поврежденных нервов и приводят к развитию ампутированных невров. Периваскулярный тип роста гетеротопий обуславливает дисциркуляторные расстройства и лимфостаз в поврежденных частях кишечной стенки и приводит к развитию гипоксии, усугубляющей микротравму нервных волокон в периваскулярных тканях, а также является кофактором в стимуляции болевого синдрома. Значимую роль в нейропатическом типе болевого синдрома играет компрессия нервных волокон в перифокальной фиброзной ткани и ectopических очагах за счет гипертрофированных и гиперплазированных гладкомышечных волокон [20].

По мнению P. Stratton и K. Berkley [21], эндометриозные очаги плотно пронизаны нервными волокнами при наличии инфильтративных форм эндометриоза. Наличие гетеротопий сопровождается денервацией или реиннервацией, что приводит к изменениям в центральной нервной системе и формированию хронического болевого синдрома [21].

По данным ряда немногочисленных исследований по изучению особенностей влияния ectopической эндометриозной ткани на строение и функцию периферических нервных структур, было показано, что в гетеротопиях на брюшине количество и плотность нервных волокон значимо выше в сравнении с нормальной брюшиной у пациенток без эндометриоза (16,3 и 2,5 в 1 мм<sup>2</sup> соответственно). Полученные данные доказывают, что в очагах эндометриоза при его тяжелых инфильтративных формах с инвазией в прямую, сигмовидную кишку и аппендикс плотность расположения нервных волокон значимо выше и составляет около 170 волокон в 1 мм<sup>2</sup> [22].

Е. Коган и соавт. [23] получили результаты, демонстрирующие различия в экспрессии продукта гена протеина 9.5 (Protein gene product, PGP9.5), нейрофиламентов NF (Nerve factor), NGF (Nerve growth factor) и его рецептора p75 (NGFRp75) в гетеротопиях и прилегающей ткани при болевой и безболевой формах эндометриоза. При этом уровни экспрессии не зависят от локализации очагов эндометриоза. Выявленные молекулярные особенности показывают возможность ремоделирования нервных волокон и нервных окончаний в гетеротопиях, а PGP9.5, NGF и NGFRp75 отвечают за формирование *de novo* нервных волокон и развитие болевого синдрома у пациенток с НГЭ. Что интересно, иммуногистохимический фенотип очагов эндометриоза не зависит от их расположения, а подтверждает наличие или отсутствие болевого синдрома [23]. Помимо этого, исследователи сделали предположение, что ectopический эндометрий у больных эндометриозом имеет свои особенности в сравнении с таковым у здоровых женщин [23]. Это выражается наличием изменений в его структуре, пролиферативной активности, концентрации молекул адгезии, цитокинов, факторов роста, экспрессии различных генов. Данные изменения приводят к формированию ангиогенного потенциала, создающего условия для инвазии ectopического эндометрия, заброшенного ретроградно в брюшную полость во время менструации. Поддержанию в перитонеальной жидкости ангиогенного потенциала также может

способствовать экспрессия VEGF. Данные механизмы поддерживают дальнейший рост гетеротопий на брюшине, а также стимулируют развитие новых ectopических очагов. Помимо доказанной роли в ангиогенезе, VEGF стимулирует нейрогенез и нейропротекцию, являющиеся патогенетической основой для проявления тазовых болей у пациенток с НГЭ [24].

P. Stratton и K. Berkley считают, что за счет сдавления или прорастания через близлежащие нервы эндометриозные гетеротопии приводят к развитию болевого синдрома [21]. Данный механизм доказывается наличием в очагах эндометриоза NGF [25, 26]. Эндометриозные гетеротопии иннервируются одновременно с васкуляризацией, и эти процессы взаимно потенцируют друг друга при тяжелом инфильтративном эндометриозе по сравнению с другими типами поражения [26].

В последнее время увеличивается количество исследований и публикаций, посвященных изучению нейротрофинов в качестве маркеров боли, ассоциированной с тяжелыми формами эндометриоза. Нейротрофины являются мощными активаторами роста нервов, способными индуцировать ангиогенез, пролиферацию, адгезию и устойчивость к апоптозу — все те механизмы, которые причастны к патофизиологии эндометриоза [9]. Одним из таких активаторов является мозговой нейротрофический фактор (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Он относится к членам семьи нейротрофинсекретируемых факторов роста, в классическом понимании участвует в росте, развитии и функционировании как центральных, так и периферических нейронов. В мозге BDNF способен стимулировать выживание нейрональных клеток, дифференцировку и их пластичность. Этот нейропептид также обнаружен в периферической плазме человека, где его уровень увеличивается в ответ на физические травмы и хронический стресс [25].

По данным ряда авторов, у пациенток с эндометриозом имеется значимое повышение в периферической крови BDNF в сравнении с женщинами без этого заболевания [9]. Кроме того, высокие уровни BDNF в плазме крови положительно коррелируют с тяжелой тазовой болью у пациенток с НГЭ [27].

Помимо этого, имеется доказательная база в отношении влияния иммунной системы на патогенез боли у пациенток с НГЭ. По результатам проведенных исследований удалось установить, что НГЭ связан с выраженным дисбалансом иммунного ответа, который проявляется пониженной цитотоксической активностью естественных киллеров и Т-лимфоцитов, а также увеличенной активностью перитонеальных макрофагов. Развитие иммунного асептического воспаления связано с нарушением цитокинового профиля перитонеальной жидкости у данной категории пациенток [28]. Представленные особенности иммунной системы поддерживают успешную имплантацию гетеротопий с формированием в дальнейшем пролиферации и болевого синдрома.

## Фармакотерапия синдрома хронических тазовых болей при эндометриозе: молекулы-мишени и новые подходы

Выбор адекватной терапии болевого синдрома напрямую зависит от особенностей этиологии и патогенеза боли у пациенток с эндометриозом. Благодаря многочисленным исследованиям на сегодняшний день получены

некоторые представления о патогенетических механизмах развития эндометриоза и ассоциированной с ним тазовой боли; продолжается поиск антирецидивной и патогенетически обоснованной терапии, которая будет направлена на повышение эффективности лечения и улучшение качества жизни больных с НГЭ, осложненного синдромом хронических тазовых болей.

Несмотря на солидный арсенал применяемых гормональных препаратов для лечения НГЭ, только три группы лекарственных средств можно отнести к патогенетически обоснованной терапии данного заболевания: агонисты гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), антигонадотропины (даназол) и препараты группы прогестагенов [29]. Аналоги ГнРГ, антагонисты ГнРГ, ингибиторы ароматазы снижают системный и локальный синтез эстрогенов, в свою очередь резистентность к прогестерону снижается за счет гестагенов (медроксипрогестерон, диеногест, даназол, левоноргестрел), а использование селективных модуляторов рецепторов прогестерона в терапии эндометриоза находится на стадии изучения [30].

Длительность использования агонистов ГнРГ в лечении эндометриоза составляет около 30 лет. По своему строению аналоги ГнРГ очень близки к гонадолиберину, но отличаются более высоким сродством к рецепторам ГнРГ. При связывании с рецепторами ГнРГ в гипофизе агонисты активируют их и таким образом повышают секрецию лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, но при повторном курсе лечения или при применении депо-препаратов следует фаза истощения гонадотрофов гипофиза (десенситизация), которая связана со снижением числа рецепторов к ГнРГ. При назначении агонистов ГнРГ возникает дефицит эндогенного фолликулостимулирующего гормона, что в свою очередь подавляет овуляцию, которая, согласно современным представлениям, является основной патофизиологической причиной формирования эндометриозных гетеротопий. Кроме этого, применение агонистов ГнРГ приводит к снижению уровня белка мидкина в фолликулярной и перитонеальной жидкостях больных НГЭ [31]. Известно, что мидкаин является фактором роста и связан с ангиогенезом, хемотаксисом, митотической активностью, а также участвует в воспалении, что объясняет его важную роль в патогенезе эндометриоза. Агонисты ГнРГ имеют и периферический эффект, оказывая на эндометриозные имплантаты антипролиферативное, проапоптотическое, антиангиогенное действие. Эффективность применения агонистов ГнРГ также обусловлена снижением экспрессии провоспалительных интерлейкинов 2, 6 и 8, факторов роста (VEGF), ряда хемокинов (MCP1, MIG и RANTES), MMP в эктопических очагах [31].

Согласно рекомендациям Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE), гестагены «можно рассматривать терапией выбора для лечения эндометриоза, так как они эффективны для уменьшения тяжести заболевания по (лапароскопической) шкале оценки и борьбы с болевым синдромом, как даназол и агонисты ГнРГ; более дешевы, однако характеризуются более низкой частотой побочных эффектов» [31]. Диеногест — прогестаген 4-го поколения, объединяющий фармакологические свойства группы прогестерона и прогестероноподобных соединений, а также производных 19-нортестостерона. Известно, что кроме эстрогенов на прогрессирование заболевания в значительной мере оказывают влияние медиаторы воспаления, в большом количестве синтезирующиеся в эндометриозных гетеротопи-

ях [31]. Рецепторы прогестерона, являющиеся основной точкой приложения диеногеста, принимают участие в регуляции местной воспалительной реакции, подавляя ее через ядерный фактор транскрипции, отвечающий за синтез провоспалительных цитокинов (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB). Диеногест уменьшает уровни TNFα и IL1β и тем самым подавляет экспрессию фактора роста нервов в эндометриозной ткани, способствуя уменьшению болевого синдрома [31].

Основа действия комбинированных оральных контрацептивов направлена на торможение гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы, в результате чего в яичниках подавляются фолликулогенез и овуляция, понижается продукция эстрадиола [31]. Благодаря подавлению овариальной функции комбинированные оральные контрацептивы также способствуют снижению эстрогениндуцированного синтеза простагландинов, что сопровождается уменьшением асептического воспалительного процесса при эндометриозе. В последние годы в литературе появляются сообщения о возможном негативном влиянии комбинированных оральных контрацептивов на течение эндометриоза [31]. Учитывая, что данное заболевание характеризуется прогестеронорезистентностью, а основным действующим компонентом в комбинированных оральных контрацептивах является прогестаген, ряд исследователей предупреждает о возможном неполноценном взаимодействии комплекса гормон-рецептор и, как следствие, о недостаточном прогестероновом влиянии данного компонента и негативной эстрогенной стимуляции, связанной с применением эстрогенного компонента в составе комбинированных оральных контрацептивов. К тому же их длительное использование в циклическом режиме сопровождается так называемыми «масками ложного благополучия» эндометриоза — временным уменьшением симптомов, в первую очередь снижением болевого синдрома (дисменореи, диспареунии, тазовой боли) [31].

Доказано, что у пациенток с НГЭ в эндометриальной ткани наблюдается увеличение экспрессии цитохрома P450-ароматазы, при этом у женщин без эндометриоза его экспрессия отсутствует. Хотя нормальный эндометрий не содержит обнаруживаемых уровней активности ароматазы, этот фермент индуцируется на очень высоком уровне в эндометриозных имплантатах. Поэтому патогенетически обосновано использование ингибиторов ароматазы для лечения НГЭ и его осложнений [32].

Установленные данные свидетельствуют о том, что измененная иммунная функция играет решающую роль в генезе и развитии эндометриоза. Логично предположить, что локальное воспаление, активация макрофагов и вторжение внеклеточной матрицы являются потенциальными мишенями для лечения и/или профилактики этого заболевания. Некоторые иммуномодуляторы способны снижать данные патологические реакции при НГЭ [32].

MMP представляют собой семейство эндопептидаз, которые могут разрушать компоненты экстрацеллюлярного матрикса. Это имеет важное значение для многих физиологических и патологических процессов, включая имплантацию эмбрионов и эндометриоз, и регулируется ингибиторами. В эксперименте подавление выделенных MMP из эктопического эндометрия человека с помощью TIMP1 значительно тормозило прогрессирование эндометриоза при моделировании этого заболевания у лабораторных мышей. Помимо этого, было доказано, что

доксциклин (doxycycline, DOX) имеет ряд неантибиотических свойств. Одним из них является ингибирование деятельности матриксных ММР. Недавнее исследование показало влияние DOX на модель эндометриоза у крыс. Лечение DOX вызвало значительное снижение площади имплантата по сравнению с контролем, в некоторых случаях низкие дозы DOX привели к регрессу эндометриоза в экспериментальной модели на крысах [32].

А. Elnashar [32] провел исследование по оценке влияния антипролиферативных препаратов (анастрозол, метотрексат и 5-фторурацил) на пролиферацию эндометриоидных клеток *in vitro* и *in vivo*. Хотя анастрозол, метотрексат и прогестерон были неэффективны, при использовании 5-фторурацил значительно снизилась пролиферация эндометриоидных клеток в пробирке и сдерживался рост клеток при эндометриомах и глубококом инфильтративном эндометриозе. Учитывая общие черты между эндометриоидными и опухолевыми клетками, применение 5-фторурацил может быть вариантом лечения некоторых форм эндометриоза [32]. В моделях на крысах А. Elnashar [32] обнаружил также, что метформин и летрозол вызывали значимый регресс эндометриоидных имплантатов. При этом метформин способен подавлять воспалительную реакцию, активацию фермента ароматазы и распространение эндометриоидных стромальных клеток. У пациенток с эндометриозом применение метформина в дозе 500 мг трижды в день в течение 6 месяцев привело к значительному сокращению жалоб ( $p < 0,01$ ) и снижению уровня интерлейкинов 6 и 8, VEGF в сыворотке крови. Авторы предполагают, что данные препараты могут иметь терапевтический потенциал в качестве антиэндометриоидных препаратов [32, 33].

### Заключение

Таким образом, по результатам современных исследований установлено, что морфологической основой синдрома хронических тазовых болей при НГЭ являются факторы, действующие *in situ* в зоне локализации эктопических очагов, а также изменения, связанные с инфильтративным периваскулярным, интраваскулярным и периневральным ростом эктопического эндометрия. К формированию соматогенного болевого синдрома в ге-

теротопиях приводит накопление альгогенов, что является результатом воспаления и фиброза. В свою очередь за нейропатический компонент боли у данных пациентов отвечает хроническое повреждение нервных волокон как источник ноцицептивной стимуляции.

Учитывая особенности экспрессии ноцицептивных и нейропатических биомаркеров, можно предполагать именно смешанный патофизиологический вариант развития синдрома хронических тазовых болей у больных НГЭ.

На сегодняшний день продолжается поиск маркеров, направленный на выявление изменений в эктопическом эндометрии, идентификация которых позволит диагностировать НГЭ, а также прогнозировать развитие, рецидивирование и прогрессирование симптомов заболевания. Многокомпонентность боли при эндометриозе диктует необходимость разработки комплексного неинвазивного и максимально информативного подхода к диагностике данного заболевания и его осложнений, основанного на выявлении экспрессии нейропатических и ноцицептивных молекул-маркеров.

### Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа проведена на базе ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

227

### Конфликт интересов

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

### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию текста перед публикацией.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Эндометриоз: диагностика, лечение и реабилитация. Клинические рекомендации по ведению больных / Под ред. Л.В. Адамян. — М.: 2013. — 86 с. [Endometriosis: diagnostika, lechenie i rehabilitatsiya. Klinicheskie rekomendatsii po vedeniyu bol'nykh. Ed by L.V. Adamyan. Moscow; 2013. 86 p. (In Russ).]
2. May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, et al. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2010;16(6):651–674. doi: 10.1093/humupd/dmq009.
3. May KE, Villar J, Kirtley S, et al. Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. *Hum Reprod Update*. 2011;17(5):637–653. doi: 10.1093/humupd/dmr013.
4. Vodolazkaia A, El-Aalamat Y, Popovic D, et al. Evaluation of a panel of 28 biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod*. 2012;27(9):2698–2711. doi: 10.1093/humrep/des234.
5. Fassbender A, Burney RO, O DF, et al. Update on biomarkers for the detection of endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:130854. doi: 10.1155/2015/130854.
6. Locci R, Nisolle M, Angioni S, et al. Expression of the gamma 2 chain of laminin-332 in eutopic and ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:94. doi: 10.1186/1477-7827-11-94.
7. Gupta D, Hull ML, Fraser I, et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;4:CD012165. doi: 10.1002/14651858.CD012165.
8. Young VJ, Ahmad SF, Brown JK, et al. Peritoneal VEGF-A expression is regulated by TGF- $\beta$ 1 through an ID1 pathway in women with endometriosis. *Sci Rep*. 2015;5:16859. doi: 10.1038/srep16859.
9. Wessels JM. *Uterine brain-derived neurotrophic factor and endometriosis*. [dissertation] Hamilton, Ontario: McMaster University; 2015.
10. Li X, Zhang Y, Zhao L, et al. Whole-exome sequencing of endometriosis identifies frequent alterations in genes involved in cell adhesion and chromatin-remodeling complexes. *Hum Mol Genet*. 2014;23(22):6008–6021. doi: 10.1093/hmg/ddu330.
11. Pino M, Galleguillos C, Torres M, et al. Association between MMP1 and MMP9 activities and ICAM1 cleavage induced by tumor

- necrosis factor in stromal cell cultures from eutopic endometria of women with endometriosis. *Reproduction*. 2009;138(5):837–847. doi: 10.1530/rep-09-0196.
12. Delbandi AA, Mahmoudi M, Shervin A, et al. Eutopic and ectopic stromal cells from patients with endometriosis exhibit differential invasive, adhesive, and proliferative behavior. *Fertil Steril*. 2013;100(3):761–769. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.041.
  13. Protopapas A, Markaki S, Mitsis T, et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors, and cathepsin-D in ovarian endometriosis: correlation with severity of disease. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2470–2472. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.03.007.
  14. Young VJ, Brown JK, Maybin J, et al. Transforming growth factor- $\beta$  induced Warburg-like metabolic reprogramming may underpin the development of peritoneal endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3450–3459. doi: 10.1210/jc.2014-1026.
  15. Yang YM, Yang WX. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis. *Oncotarget*. 2017;8(25):41679–41689. doi: 10.18632/oncotarget.16472.
  16. Nie J, Liu X, Guo SW. Immunoreactivity of oxytocin receptor and transient receptor potential vanilloid type 1 and its correlation with dysmenorrhea in adenomyosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(4):327–346. doi: 10.1016/j.ajog.2009.11.035.
  17. Чернуха Г.Е. Эндометриоз и хроническая тазовая боль: причины и последствия // *Проблемы репродукции*. — 2011. — №5 — С. 83–89. [Chernukha GE. The endometriosis and chronic pelvic pain: the causes and effects. *Modern reproductive technologies*. 2011;(5):83–89. (In Russ).]
  18. Ростовцева О.О., Волков В.Г., Паклина О.В., Сетдикова Г.Р. Морфологическая, иммуногистохимическая и ультраструктурная характеристика синдрома хронической тазовой боли при наружном генитальном эндометриозе // *Вестник новых медицинских технологий*. — 2010. — Т.17. — №4 — С. 142–144. [Rostovtseva OO, Volkov VG, Paklina OV, Setdikova GR. The morphological, immunohistochemical and ultrastructural characteristics of the syndrome chronic pelvis pain at external genital endometriosis. *Journal of new medical technologies*. 2010;17(4):142–144. (In Russ).]
  19. Данилов А.Б., Давыдов О.С. *Нейропатическая боль*. — М.: Боргес; 2007. — 190 с. [Danilov AB, Davydov OS. *Neuropathическая боль*. Moscow: Borges; 2007. 190 p. (In Russ).]
  20. Коган Е.А., Парамонова Н.Б., Демура Т.А., и др. Морфологический субстрат и патогенетические механизмы синдрома тазовой боли при эндометриозе // *Архив патологии*. — 2014. — Т.76. — №6 — С. 37–43. [Kogan EA, Paramonova NB, Demura TA, et al. The morphological substrate and pathogenetic mechanisms of pelvic pain syndrome in endometriosis. *Arkhiv patologii*. 2014;76(6):37–43. (In Russ).] doi: 10.17116/patol201476637-43.
  21. Stratton P, Berkley KJ. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update*. 2011;17(3):327–346. doi: 10.1093/humupd/dmq050.
  22. gynendo.ru [интернет]. *Глобальный консенсус по современному ведению эндометриоза*, 2013. [Consensus on current management of endometriosis, 2013. (In Russ).] <https://gynendo.ru/biblioteka/publikatsii/politicheskie-dokumenty/globalnyj-konsensus-posovremennom/>. Ссылка активна на 15.07.2018.
  23. Коган Е.А., Овакимян А.С., Парамонова Н.Б., и др. Морфологический субстрат и патогенетические механизмы синдрома тазовой боли при эндометриозе. Часть II. Ремоделирование периферической нервной ткани в очагах эндометриоза // *Архив патологии*. — 2016. — Т.78. — №3 — С. 20–25. [Kogan EA, Ovakimyan AS, Paramonova NB, et al. Morphological substrate and pathogenetic mechanisms of pelvic pain syndrome in endometriosis. Part II. Peripheral nerve tissue remodeling in the foci of endometriosis. *Arkhiv patologii*. 2016;78(3):20–25. (In Russ).] doi: 10.17116/patol201678320-25.
  24. Wang G, Tokushige N, Russell P, et al. Hyperinnervation in intestinal deep infiltrating endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009;16(6):713–719. doi: 10.1016/j.jmig.2009.07.012.
  25. Novella-Maestre E, Herraiz S, Vila-Vives JM, et al. Effect of antiangiogenic treatment on peritoneal endometriosis-associated nerve fibers. *Fertil Steril*. 2012;98(5):1209–1217. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1103.
  26. Wang G, Tokushige N, Markham R, Fraser IS. Rich innervation of deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(4):827–34. doi: 10.1093/humrep/den464.
  27. Rocha AL, Vieira EL, Ferreira MC, et al. Plasma brain-derived neurotrophic factor in women with pelvic pain: a potential biomarker for endometriosis? *Biomark Med*. 2017;11(4):313–317. doi: 10.2217/bmm-2016-0327.
  28. Семерикова М.В., Качалина Т.С., Стронгин Л.Г. Иммунный статус у больных с наружным генитальным эндометриозом, ассоциированным с гипотиреозом // *Российский вестник акушера-гинеколога*. — 2011. — Т.11. — №3 — С. 14–16. [Semerikova MV, Kachalina TS, Strongin LG. The immune status in patients with external genital endometriosis associated with hypothyroidism. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa*. 2011;11(3):14–16. (In Russ).]
  29. Ярмолинская М.И., Беженарь В.Ф. Опыт применения диногеста в комбинированном лечении генитального эндометриоза // *Фарматека*. — 2013. — №3. — С. 48–51. [Yarmolinskaya MI, Bezhenar' VF. Opyt primeneniya dienogesta v kombinirovannom lechenii genital'nogo endometrioz. *Farmateka*. 2013; (3):48–51. (In Russ).]
  30. Tosti C, Biscione A, Morgante G, et al. Hormonal therapy for endometriosis: from molecular research to bedside. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;209:61–66. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.05.032.
  31. Ярмолинская М.И., Айламазян Э.К. *Генитальный эндометриоз. Различные грани проблемы*. — СПб.: Эко-Вектор; 2017. — 615 с. [Yarmolinskaya MI, Ailamazyan EK. *Genital'nyi endometrioz. Razlichnye grani problem*. St.Petersburg: Eko-Vektor; 2017. 615 p. (In Russ).]
  32. Elnashar A. Emerging treatment of endometriosis. *Middle East Fertil Soc J*. 2015;20(2):61–69. doi: 10.1016/j.mefs.2014.12.002.
  33. Oner G, Ozcelik B, Ozgun MT, et al. The effects of metformin and letrozole on endometriosis and comparison of the two treatment agents in a rat model. *Hum Reprod*. 2010;25(4):932–937. doi: 10.1093/humrep/deq016.

228

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\***Никифорова Дарья Евгеньевна** [Daria E. Nikiforova, MD];  
**Адрес:** Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1 [address: 1, Partizana Zheleznyaka street, 660022 Krasnoyarsk, Russia],  
**тел.:** +7 (495) 627-24-00, **e-mail:** dashsemch@mail.ru, **SPIN-код:** 1219-6470, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7516-5203>  
**Макаренко Татьяна Александровна**, д.м.н., доцент [Tatyana A. Makarenko, MD, PhD];  
**e-mail:** makarenko7777@yandex.ru, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7823-6222>, **SPIN-код:** 3133-7406  
**Салмина Алла Борисовна**, д.м.н., профессор [Alla B. Salmina, MD, PhD, Professor];  
**e-mail:** allasalmina@mail.ru, **SPIN-код:** 6504-7657, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4012-6348>

Л.И. Колесникова<sup>1,2</sup>, А.А. Семендяев<sup>1,3</sup>, Д.А. Ступин<sup>1</sup>, М.А. Даренская<sup>1\*</sup>, Л.А. Гребёнкина<sup>1</sup>,  
Л.В. Натяганова<sup>1</sup>, И.Н. Данусевич<sup>1</sup>, М.А. Черепанова<sup>4</sup>, С.И. Колесников<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Иркутский государственный университет, Иркутск, Российская Федерация

<sup>3</sup> Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Российская Федерация

<sup>4</sup> Родильный дом № 25, Москва, Российская Федерация

<sup>5</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

# Интенсивность процессов липопероксидации у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза в зависимости от стадии заболевания

**Обоснование.** Сведения о вовлечении общих неспецифических реакций, в частности процессов липопероксидации, в прогрессирование варикозной болезни вен малого таза у женщин до сих пор слишком скудны. **Цель исследования** — изучить интенсивность процессов перекисного окисления липидов и активность компонентов антиоксидантной защиты у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза на разных стадиях заболевания. **Методы.** Исследование проводилось в течение 2012–2017 гг. В основную группу были включены 137 пациенток с варикозной болезнью вен малого таза, контрольную группу составили 30 здоровых женщин. Использованы спектрофотометрические и флуориметрические методы исследования. **Результаты.** Выявлено, что уровень первичных продуктов липопероксидации — диеновых конъюгатов — статистически значимо увеличивался относительно контрольных значений в зависимости от стадии заболевания: в I — в 1,25, во II — в 1,51, в III — в 1,59 раза. Изменения в содержании конечных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, обнаруживали сходные характеристики — увеличение средних значений во все стадии заболевания относительно контроля (в 1,24; 1,17 и 1,77 раза соответственно). Активность глутатионпероксидазы возрастала во II стадию заболевания (в 1,19 раз) при максимальном увеличении в III стадию (в 1,42 раза); активность глутатион-S-трансферазы возрастала в 1,18 раз во II стадию заболевания. Концентрация восстановленной формы глутатиона в клинических группах отличалась более низкими значениями по отношению к контролю (в 1,22 раза в I стадию; в 1,64 — во II) с максимальным снижением данного параметра в III стадию (в 3,67 раза). Уровень активности каталазы увеличивался в I стадию в 1,18 раз и снижался в III стадию в 1,14 раз относительно контроля. Активность супероксиддисмутазы обнаруживалась сходные с каталазой изменения в виде повышенных значений на I стадии (в 1,35 раз) и сниженных — на II (в 1,35) и III (в 1,65) стадиях болезни по отношению к значениям контроля. **Заключение.** На фоне прогрессирования первичного заболевания (от I к III стадии) у женщин отмечается усиление дисбаланса в системе перекисное окисление липидов — антиоксидантная защита: на I стадии регистрируется компенсаторное повышение активности антиоксидантных ферментов, на III стадии имеет место снижение большинства факторов антиоксидантной защиты как относительно контрольных значений, так и начальных стадий заболевания.

**Ключевые слова:** варикозное расширение вен малого таза, женщины, липопероксидация, антиоксидантная защита.

**(Для цитирования:** Колесникова Л.И., Семендяев А.А., Ступин Д.А., Даренская М.А., Гребёнкина Л.А., Натяганова Л.В., Данусевич И.Н., Черепанова М.А., Колесников С.И. Интенсивность процессов липопероксидации у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза в зависимости от стадии заболевания. *Вестник РАМН.* 2018;73(4):229–235. doi: 10.15690/vramn1005)

## Обоснование

Высокая медико-социальная значимость варикозной болезни вен малого таза у женщин связана с широкой распространенностью (70% случаев), риском репродуктивных нарушений (у 15–25% пациенток), тяжестью течения, в частности с развитием конгестии — синдрома хронической тазовой боли, и отсутствием стойкого клинического эффекта, несмотря на проводимые лечебные мероприятия [1–3]. Прогрессирующие морфофункциональные изменения вен малого таза обусловлены главным образом возрастом и наследственной предрасположенностью, а также совокупным воздействием других факторов [4, 5]. Диагностика первичной варикозной болезни вен малого таза бывает затруднена в связи с отсутствием специфической клинической симптоматики и лабораторных критериев, свойственных начальным проявлениям патологического процесса [6, 7]. Даже тяжелые формы заболевания могут характеризоваться бессимптомным

течением или наличием синдрома острого живота [5]. Среди клинических проявлений данного патологического состояния выделяют наличие хронических тазовых болей, диспареунии, циклических и ациклических кровотечений, бесплодия и других симптомов [7, 8].

Отличительным признаком заболевания является стадийный характер течения патологического процесса, этапы которого определяют тяжесть состояния пациентки [5]. Начало заболевания характеризуется наличием венозной гипертензии, клапанной недостаточности вен, ретроградного кровотока по яичниковым венам и веновенозного сброса бассейна гонадных вен [1, 9]. Среди основных направлений фармакологической терапии варикозной болезни вен малого таза выделяют улучшение венозного оттока, коррекцию микроциркуляторных расстройств, уменьшение воспалительных явлений в стенках вен и окружающих тканях [3, 10].

Интенсификация свободнорадикального окисления представляет собой процесс дезинтеграции биологиче-

ских мембран при различных формах патологии инфекционной и неинфекционной природы [11–13]. Имеются данные о том, что при прогрессировании заболевания у женщин, помимо гемодинамических нарушений, определенная доля участия принадлежит общим неспецифическим реакциям, универсальным для развития различных деструктивных процессов в тканях [14]. При этом важная роль отводится интенсивности процессов перекисного окисления липидов и активности системы антиоксидантной защиты (ПОЛ-АОЗ). Однако указанной проблематике посвящено незначительное количество исследований, причем представленный в данных работах механизм влияния липоперекисных процессов на формирование варикозных вен носит фрагментарный характер и не отражает комплекса взаимодействий гемодинамических нарушений и изменений в системе ПОЛ-АОЗ [15, 16].

**Цель исследования** — изучить интенсивность процессов перекисного окисления липидов и активность компонентов антиоксидантной системы у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза на разных стадиях заболевания.

## Методы

### Дизайн исследования

Наблюдательное нерандомизированное одномоментное многоцентровое выборочное исследование.

### Критерии соответствия

**Критерии включения в группу пациенток с варикозной болезнью вен малого таза:** репродуктивный возраст (20–45 лет), информированное согласие на участие в исследовании, подтвержденный диагноз по результатам ультразвукового исследования с дуплексным ангиосканированием.

**Критерии не включения в основную группу:** наличие сопутствующей соматической патологии, гинекологических заболеваний и органических поражений в малом таза.

**Критерии включения в контрольную группу:** сопоставимость по возрасту, полу, месту проживания и другим основным критериям (по типу копия–пара); отсутствие на момент обследования острого заболевания или обострения хронических заболеваний, отсутствие патологии венозной системы.

**Критерии исключения** для обеих групп: беременность; прием в течение последних 6 мес препаратов венотонизирующего, ангиопротективного, антиоксидантного действия или синтетических аналогов женских половых гормонов (гормональные контрацептивы).

### Условия проведения

Исследование проведено на базе медицинских учреждений г. Иркутска: ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; Центр инновационной медицины ФГБНУ «Научный центр проблем

230

L.I. Kolesnikova<sup>1, 2</sup>, A.A. Semendyaev<sup>1, 3</sup>, D.A. Stupin<sup>1</sup>, M.A. Darenskaya<sup>1\*</sup>, L.A. Grebenkina<sup>1</sup>,  
L.V. Natyaganova<sup>1</sup>, I.N. Danusevich<sup>1</sup>, M.A. Cherepanova<sup>4</sup>, S.I. Kolesnikov<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

<sup>4</sup> Maternity hospital № 25, Moscow, Russian Federation

<sup>5</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

## The Intensity of Lipid Peroxidation Processes in Women with Primary Varicose Veins of the Pelvic Depending on the Stage of the Disease

**Background:** Information about involvement of general nonspecific reactions, in particular lipid peroxidation processes, in the progression of varicose veins of the pelvic (VVP) in women is still too scarce. **Aims:** To study the intensity of processes of lipid peroxidation and the activity of components of the antioxidant system in women with primary varicose veins of the pelvic at different stages of the disease. **Materials and methods:** 167 women of reproductive age were examined — 137 with VVP and 30 made up a control group. All patients with VVP were divided into 3 groups depending on stages of the disease. Spectrophotometric and fluorometric methods of investigation were used. The study was conducted during 2012–2017. **Results:** It was revealed that the level of primary products of lipid peroxidation, diene conjugates, increased statistically significantly according to the stage of the disease by 1.25 times (in the 1st stage), 1.51 times (in the II stage) and 1.59 times (in the III stage) values. Changes in the content of final TBA-active products showed similar changes—an increase in the mean values for all stages of the disease relative to control (in 1.24, 1.17, and 1.77 times, respectively). Activity of glutathione peroxidase increased in stage 2 of VVP (1.19 times), with the maximum increase in stage III (1.42 times); activity of glutathione-S-transferase increased 1.18 times in the II stage of the disease. The concentration of GSH in the clinical groups was characterized by lower values with respect to the control (by 1.22 times in the 1st stage, in 1.64 times in the II stage), with the maximum decrease of this parameter in the III stage of VVP (3.67 times). The level of catalase activity increased in the I stage of VVP — by 1.18 times and decreased in the III stage — by 1.14 times with respect to the control. The activity of SOD showed similar changes with catalase — in the form of increased activity at the 1st stage (1.35 times higher) and decreased values for II (1.35 times lower) and III (1.65 times lower) for the stages of VVP to the values of control. **Conclusions:** At progression of primary VVP in women (from the initial stage to the 3rd stage of the disease), there is an increase in imbalance in the lipid peroxidation — antioxidant defense system. Moreover, if the compensatory increase in activity of antioxidant enzymes is registered at stage 1 of the disease, then the most of the antioxidant defense factors decreases as relative to control values, and the initial stages of the disease.

**Key words:** primary varicose veins of the pelvic, women, lipid peroxidation, antioxidant defense.

(**For citation:** Kolesnikova LI, Semendyaev AA, Stupin DA, Darenskaya MA, Grebenkina LA, Natyaganova LV, Danusevich IN, Cherepanova MA, Kolesnikov SI. The Intensity of Lipid Peroxidation Processes in Women with Primary Varicose Veins of the Pelvic Depending on the Stage of the Disease. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2018;73(4):229–235. doi: 10.15690/vramn1005)

здоровья семьи и репродукции человека»; НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД», Городская клиническая больница № 1; кафедра акушерства и гинекологии с курсом гинекологии детей и подростков ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет».

### **Продолжительность исследования**

Набор участниц в исследование проведен в период 2012–2017 гг.

### **Описание медицинского вмешательства**

Забор крови у всех участниц исследования осуществляли утром натощак из локтевой вены в объеме 10 мл однократно.

### **Исходы исследования**

#### **Основной исход исследования**

В работе проводилась оценка изменений параметров системы липопероксидации — содержания первичных (диеновые конъюгаты) и конечных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), и антиоксидантной защиты (активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы, уровень восстановленного глутатиона).

### **Методы регистрации исходов**

Стадийность варикозной трансформации вен при первичной варикозной болезни вен малого таза установлена на основании результатов дуплексного ангиосканирования, обладающего высокой чувствительностью (91,5–100%) и диагностической точностью (95,1–98,7%) при запущенной форме патологического процесса [17]. В качестве критериев степени тяжести заболевания были использованы эхографические признаки яичниковых вен, бассейн которых является приоритетным в осуществлении оттока крови из малого таза у женщин. Объективными метрическими показателями яичниковых вен являлись максимальный диаметр просвета магистрального ствола вен (I стадия — 5,0–7,0 мм; II стадия — 7,1–10,0 мм; III стадия — более 10,0 мм); длительность рефлюксного кровотока в общем стволе яичниковых вен в состоянии покоя (I стадия — 0,4–1,5 сек; II стадия — 1,6–2,5 сек; III стадия — более 2,5 сек); вовлеченность венозных сплетений малого таза (I стадия — правое или левое яичниковое сплетение; II стадия — пресакральное и оба яичниковых сплетения; III стадия — тазовое венозное полнокровие) [5, 17].

У женщин контрольной группы анатомо-гемодинамические показатели в магистральном стволе яичниковых вен соответствовали нормальным параметрам и характеризовались следующими показателями: диаметр сосуда просвета не превышал 5 мм, длительность рефлюксного кровотока составляла не более 0,3 сек.

В качестве материала исследования использовали плазму и гемолизат эритроцитов. Интенсивность процессов ПОЛ определяли спектрофотометрическим методом по содержанию диеновых конъюгатов и флуорометрическим методом по уровню ТБК-активных продуктов ПОЛ [18]. О состоянии системы АОЗ судили по изменению ее компонентов: активности супероксиддисмутазы [18], содержанию восстановленного глутатиона (glutathione, GSH) [18], а также активности каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы с помощью коммерческих наборов фирмы Randox (Вели-

кобритания). Измерения проводили на спектрофлуорометре Shimadzu RF-1501 (Япония) и спектрофотометре Shimadzu RF-1650 (Япония).

### **Этическая экспертиза**

Получение информированного согласия на участие в исследовании было обязательной процедурой при включении женщин в одну из групп. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (Выписка из протокола заседания № 3.1 от 26.10.2012).

### **Статистический анализ**

#### **Принципы расчета размера выборки**

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

#### **Методы статистического анализа данных**

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета комплексной обработки данных Statistica 6.1 (StatSoft Inc., США) (правообладатель лицензии — ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»). Для представления количественных данных приводили среднее ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Для определения нормальности распределения количественных признаков использовали визуально-графический метод и критерии согласия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро–Уилка. В зависимости от вида распределения использовали параметрический Т-критерий Стьюдента (при нормальном распределении данных) или непараметрический критерий Манна–Уитни (при распределении, отличном от нормального). Критический уровень значимости принимался равным 5% (0,05).

## **Результаты**

### **Объекты (участники) исследования**

Обследовано 167 женщин репродуктивного возраста, у 137 из них (средний возраст  $37,4 \pm 9,1$  года) по результатам ультразвукового исследования с дуплексным ангиосканированием было диагностировано первичное варикозное расширение вен малого таза (основная группа); 30 женщин (средний возраст  $33,5 \pm 6,3$  года) вошли в контрольную группу. Пациентки основной группы были разделены на 3 подгруппы в соответствии со стадиями заболевания (I, II, III стадии). В основной и контрольной группах проводили оценку интенсивности процессов липопероксидации — антиоксидантной защиты с помощью флуоро- и спектрофотометрических методов исследования.

### **Основные результаты исследования**

Результаты исследования показали наличие статистически значимых изменений в содержании продуктов липопероксидации у пациенток основной группы в зависимости от стадии заболевания (табл. 1). Так, уровень первичных продуктов липопероксидации — диеновых конъюгатов — статистически значимо увеличивался согласно стадии заболевания относительно контрольных значений: в 1,25 раза — в I, в 1,51 — во II, в 1,59 — в III. Также отмечалось повышенное содержание диеновых конъюгатов (в 1,27 раза) в III стадию болезни по сравнению с начальной стадией. Изменения в содержании конечных ТБК-активных продуктов обнаруживали сходные

**Таблица 1.** Содержание продуктов перекисного окисления липидов у пациенток с варикозной болезнью вен малого таза в зависимости от стадии заболевания ( $M \pm \sigma$ )

Показатели	Контрольная группа	Пациентки с ВБВМТ		
		I стадия	II стадия	III стадия
	1	2	3	4
Диеновые конъюгаты, мкмоль/л	1,81±0,07	2,26±0,11*	2,73±0,14*	2,88±0,16*., ##
ТБК-активные продукты, мкмоль/л	2,67±0,08	3,31±0,20*	3,12±0,17*	4,72±0,36*., ##

*Примечание.* \* — статистически значимые различия между группами ВБВМТ и контрольной; # — статистически значимые различия между группами с I и III стадией ВБВМТ; ## — статистически значимые различия между группами со II и III стадией ВБВМТ. ВБВМТ — варикозная болезнь вен малого таза, ТБК — тиобарбитуровая кислота.

**Таблица 2.** Состояние активности системы антиоксидантной защиты у пациенток с варикозной болезнью вен малого таза в зависимости от стадии заболевания ( $M \pm \sigma$ )

Показатели	Контрольная группа	Пациентки с ВБВМТ		
		I стадия	II стадия	III стадия
	1	2	3	4
Супероксиддисмутаза, усл. ед.	57,36±3,85	77,58±3,62*	42,58±2,39*., **	34,72±1,85*., ##
Каталаза, мкмоль/мл	42,15±2,68	49,53±3,74*	40,38±3,36**	37,24±1,85*., #
Глутатионпероксидаза, мкмоль (GSH/г Нв)	34,83±1,21	38,53±1,24	41,72±1,40*	49,63±1,48*., ##
Глутатионредуктаза, мкмоль/мл	4,12±0,23	4,05±0,18	4,27±0,32	4,20±0,25
Глутатион-S-трансфераза, ммоль/г Нв	4,96±0,28	5,13±0,36	5,86±0,45*., **	4,50±0,24*., #., ##
Восстановленный глутатион, ммоль/л	3,56±0,28	2,93±0,15*	2,17±0,11*., **	0,97±0,04*., #., ##

*Примечание.* \* — статистически значимые различия между группами ВБВМТ и контрольной; \*\* — статистически значимые различия между группами с I и II стадией ВБВМТ; # — статистически значимые различия между группами с I и III стадией ВБВМТ; ## — статистически значимые различия между группами со II и III стадией ВБВМТ. ВБВМТ — варикозная болезнь вен малого таза.

изменения — увеличение средних значений во все стадии заболевания относительно контроля (в 1,24; 1,17 и 1,77 раза соответственно). Уровень ТБК-активных продуктов значительно увеличивался в III стадию как в сравнении с I (в 1,43 раза), так и со II (в 1,51 раза) стадиями заболевания.

Содержание параметров антиоксидантной защиты также статистически значимо изменялось в зависимости от тяжести заболевания (табл. 2). Активность основного фермента системы АОЗ — супероксиддисмутазы — увеличивалась на I стадии (в 1,35 раза) и снижалась на II (в 1,35) и III (в 1,65) стадиях по отношению к значениям контроля. Значения активности супероксиддисмутазы на III стадии также уменьшались относительно начальных стадий заболевания (в 2,23 раза относительно I стадии и в 1,23 — относительно II). Активность каталазы обнаруживала сходные с супероксиддисмутазой изменения в виде увеличения в 1,18 раз в I стадию патологического процесса и снижения в 1,14 раз в III стадию относительно контроля, при этом начальная стадия процесса отличалась максимально высокими значениями (в 1,23 раза выше в сравнении со II и в 1,33 — в сравнении с III стадией). Уровень активности глутатионпероксидазы возрастал во II стадию патологического процесса (в 1,19 раз), при максимальном увеличении в III стадию (в 1,42 раза) относительно контроля. Третья стадия также отличалась повышенной активностью глутатионпероксидазы в сравнении с I (в 1,29 раза) и II (в 1,19) стадиями. Активность глутатионредуктазы статистически значимо не отличалась в исследуемых группах ( $p > 0,05$ ). Глутатион-S-трансферазная активность возрастала в 1,18 раз во II стадию заболевания и незначительно снижалась (в 1,1) в III стадию по отношению к контролю, при этом II стадия отличалась более высокими значениями данного показателя в сравнении с I (в 1,14 раз) и III (в 1,3) стадиями, в III стадию значения были наиболее низкими

(в 1,14 раз в сравнении с I стадией). Концентрация восстановленной формы глутатиона в клинических группах отличалась более низкими значениями по отношению к контрольной группе (в 1,22 раза в I стадию; в 1,64 — во II) с максимальным снижением данного параметра в III стадию (в 3,67 раз). Значимость изменений содержания данного показателя прослеживалась и в зависимости от стадии: наиболее высокие значения отмечены в I стадию (в 1,35 раза выше в сравнении со II стадией и в 3,02 раза выше в сравнении с III) и минимальные в III (в 2,24 раза ниже в сравнении со II стадией).

### Нежелательные явления

В исследовании отсутствовали случаи нежелательных явлений.

## Обсуждение

### Резюме основного результата исследования

Результаты исследования показали наличие статистически значимых изменений в содержании продуктов липопероксидации и параметрах антиоксидантной защиты у пациенток с варикозной болезнью вен малого таза в зависимости от стадии заболевания. Выявлено, что начальный этап развития заболевания (I стадия) сопровождается активацией процессов пероксидации и компенсаторным увеличением антиоксидантной активности в отличие от III стадии заболевания, когда имеет место дисбаланс в системе ПОЛ-АОЗ.

### Обсуждение основного результата исследования

Известно, что варикозная болезнь вен малого таза имеет хронический характер течения, трудно поддается лечению, что обусловлено по большей части огромным разнообразием факторов, воздействующих на венозную

стенку [1, 2, 5]. Изменения в системе липопероксидации могут служить значимым фактором в развитии и прогрессировании данного патологического состояния. Полученные нами данные свидетельствовали о нарастании активности процессов ПОЛ в зависимости от стадии заболевания. Так, если начало заболевания сопровождалось незначительным увеличением первичных (диеновых конъюгатов) и конечных — ТБК-активных продуктов ПОЛ, то III стадия прогрессирования патологического процесса характеризовалась значительным ростом концентрации токсичных липоперекисных продуктов. Известно, что биологический эффект свободных радикалов реализуется как вследствие их непосредственного влияния на белки, ферменты, нуклеиновые кислоты, так и через продукты ПОЛ (гидроперекиси липидов, диеновые конъюгаты, альдегиды и др.), образующиеся на разных этапах цепной реакции [19, 20]. В избыточных концентрациях многие из продуктов ПОЛ являются высокотоксичными и оказывают негативное повреждающее действие на структурные компоненты клетки. Так, гидроперекиси липидов способны ингибировать синтез ДНК, индуцировать апоптоз и тем самым подавлять пролиферацию, созревание и рост клеток организма, к тому же обладают мутагенным и канцерогенным эффектом, вызывают татогенные изменения [21, 22]. Возрастание токсичных продуктов ПОЛ, как правило, свидетельствует о быстром вовлечении процессов ПОЛ в патогенетические механизмы развивающихся структурно-функциональных нарушений в клетках органов и тканей. В единичных исследованиях показано, что индуктивным фактором патологических изменений вен малого таза у женщин является наличие локальной застойной венозной гемодинамики, инициирующей гипоксию, снижение сатурации кислорода и продукцию активных форм кислорода [14, 16]. Развивающиеся вследствие варикозной трансформации вен ишемия тканей и дисфункция эндотелия могут способствовать дальнейшему усилению свободнорадикальных реакций, что приводит к снижению регенераторных возможностей, резистентности, развитию аутосенсбилизации [15]. Присоединение воспалительного процесса усугубляет повреждение стенок вен за счет лейкоцитарной агрессии, которая приводит к прогрессированию нарушений целостности венозного каркаса [4]. Имеются также данные об усилении образования в результате пероксидных процессов плотных структур по типу липофуцина, которые нарушают функционирование микроциркуляторного русла во многих органах и тканях со сдвигом метаболизма в сторону анаэробноза [22]. Таким образом, активация реакций липопероксидации при развитии патологического процесса у больных может усугублять морфофункциональные расстройства на уровне венозного кровотока и способствовать дальнейшему прогрессированию заболевания.

Важнейшим лимитирующим фактором липопероксидных процессов является высокая активность антиоксидантных компонентов, составляющих систему антиоксидантной защиты организма [23]. Различные ступени каскада антиоксидантного механизма клетки имеют определенную специализацию и разделены на ферментативное и ферментативное звено [24]. Вследствие того, что в клетке постоянно имеются условия, необходимые для ПОЛ, то дефект в одном из звеньев системы АОЗ может привести к активации данного процесса. Анализ активности ферментативного звена системы АОЗ у пациенток основной группы показал ее разнонаправленный характер в различные стадии заболевания. Так, фермент

начального этапа обезвреживания супероксидного анион-радикала — супероксиддисмутазы — отличался увеличением активности в I стадию заболевания и снижением — в III. Сниженную активность супероксиддисмутазы можно объяснить усилением прооксидантных процессов у пациенток с прогрессирующей формой варикозной болезни вен малого таза. Жизненно важное значение имеют также механизмы поддержания нормального уровня пероксида водорода в крови, основную роль при этом играют ферменты, избирательно разрушающие его молекулы, — каталаза и глутатионпероксидаза. Активность каталазы в исследуемых группах изменялась сходным образом — с ростом значений в I стадию и значительным снижением в III, что также можно объяснить выраженной окислительной нагрузкой в III стадию патологического процесса. Возрастание активности глутатионпероксидазы во II и III стадиях может свидетельствовать о компенсаторном характере изменений данного компонента системы АОЗ в условиях недостаточности сходного по функциональной активности фермента — каталазы. Увеличенная активность во II стадию отмечалась и в отношении глутатион-S-трансферазы — основного представителя семейства многофункциональных белков, основной функцией которых является защита клеток от ксенобиотиков и продуктов ПОЛ посредством их восстановления [25]. Снижение активности фермента в III стадию развития заболевания может иметь негативные последствия в плане реализации его многочисленных детоксикационных эффектов. Для работы глутатионзависимых ферментов необходим восстановленный глутатион, который синтезируется преимущественно в печени глутатионсинтетазой или восстанавливается в реакции с глутатионредуктазой [22]. В нашем исследовании показано планомерное снижение данного антиоксиданта к III стадии развития патологического процесса при отсутствии изменений в уровне активности глутатионредуктазы. Являясь субстратом для глутатионзависимых ферментов, глутатион выступает «донором» атомов водорода для перекиси водорода и липидных перекисей, поддерживает в восстановленном состоянии SH-группы мембранных белков, способствуя сохранению целостности мембраны, нормальному осуществлению транспорта [26]. Глутатион помимо основной может выполнять коферментные функции, участвовать в обмене эйкозаноидов, выступать в качестве резерва цистеина, влиять на биосинтез нуклеиновых кислот и белка, защищать от ксенобиотиков, повышать резистентность клеток к вредным воздействиям [24]. Выраженное снижение концентрации GSH может быть связано со снижением активности глутатионредуктазы. Кроме того, данные изменения можно объяснить повышением активности глутатионпероксидазы, которая обеспечивает окисление глутатиона и инактивацию перекисей. В настоящее время в комплексной терапии варикозной болезни вен малого таза широко используются препараты, способствующие улучшению венозного кровотока, обладающие противовоспалительными, антитромботическими, антиоксидантными, эндотелиопротекторными и вазорелаксирующими свойствами [4, 5, 14]. Полученные нами результаты позволяют рекомендовать использовать препараты антиоксидантного действия в комплексной терапии варикозной болезни вен малого таза соответственно стадии патологического процесса.

#### Ограничения исследования

Не представлялась возможной комплексная оценка состояния системы антиоксидантной защиты у пациен-

ток с варикозной болезнью вен малого таза, включающая также анализ содержания параметров неферментативного звена — водо- и жирорастворимых витаминов, уровня общей антиокислительной активности крови и т.д., что связано с дополнительными финансовыми затратами по выполнению данного исследования.

### Заключение

Таким образом, результаты ранее проведенных исследований относительно изменений в системе ПОЛ-АОЗ у женщин, больных первичной варикозной болезнью вен малого таза, носят фрагментарный характер и не отражают изменений в данной системе в зависимости от стадии прогрессирования процесса. Результаты нашего исследования показывают усиление дисбаланса в системе ПОЛ-АОЗ на фоне развития болезни. Так, на I стадии заболевания на фоне увеличения уровня токсичных продуктов липопероксидации отмечается компенсаторное повышение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы), на III стадии имеет место снижение активности большинства факторов антиоксидантной защиты (активности супероксиддисмутазы, уровня каталазы, глутатион-S-трансферазы, восстановленной формы глутатиона) как относительно контрольных значений, так и начальных стадий болезни. Можно предположить, что контроль антиоксидантной активности у пациенток с варикозной болезнью вен малого таза является важной составляющей патогенетического лечения и профилактики морфофункциональных расстройств, имеющих место при прогрессировании заболевания, в частности на III стадии развития варикозной болезни вен малого таза.

### Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственной бюджетной темы ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья се-

ми и репродукции человека» «Основные детерминанты и механизмы формирования нарушений репродуктивного здоровья семьи в различных гендерных и возрастных группах» № 0542-2014-0004.

### Конфликт интересов

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

### Участие авторов

**Л.И. Колесникова** — постановка цели и задач исследования, анализ полученных в работе результатов и формулирование выводов проведенного исследования; **А.А. Семендяев** — общеклиническое и гинекологическое обследование пациенток, проведение ультразвукового исследования с дуплексным ангиосканированием, формирование групп, написание статьи; **Д.А. Ступин** — общеклиническое и гинекологическое обследование пациенток, проведение ультразвукового исследования с дуплексным ангиосканированием, формирование групп, написание статьи; **М.А. Даренская** — анализ полученных в работе результатов и формулирование выводов проведенного исследования, написание статьи; **Л.А. Гребёнкина** — проведение биохимических анализов параметров системы ПОЛ-АОЗ в контрольной группе и у пациенток с ВРВМТ; **Л.В. Натяганова** — проведение биохимических анализов параметров системы ПОЛ-АОЗ в контрольной группе и у пациенток с ВРВМТ; статистическая обработка результатов; **И.Н. Данусевич, М.А. Черепанова** — общеклиническое и гинекологическое обследование пациенток; **С.И. Колесников** — постановка цели и задач исследования, анализ полученных в работе результатов и формулирование выводов проведенного исследования. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку рукописи, прочли и одобрили финальную версию текста перед публикацией.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Фомин В.С., Фомина М.Н. Варикозное расширение вен малого таза как причина синдрома хронических тазовых болей: взгляд на проблему // *Фарматека*. — 2017. — №18 — С. 14–19. [Fomin VS, Fomina MN. Pelvic varicities as a cause of the syndrome of chronic pain. *Pharmateca*. 2017;(18):14–19. (In Russ).]
2. Серяпина Ю.В., Севостьянова К.С., Тулупов А.А., и др. Генетические предикторы варикозной болезни малого таза: пилотное исследование // *Флебология*. — 2018. — Т.12. — №1 — С. 25–29. [Seryapina YuV, Sevostyanova KS, Tulupov AA, et al. The genetic predictors of varicose veins of small pelvis: a pilot study. *Flebologiya*. 2018;12(1):25–29. (In Russ).] doi: 10.17116/flebo201812125-29.
3. Гаврилов С.Г., Сажин А.В., Темирболатов М.Д. Тактика лечения больных сочетанной варикозной болезнью вен таза и нижних конечностей // *Флебология*. — 2017. — Т.11. — №3 — С. 120–130. [Gavrilov SG, Sazhin AV, Temirbolatov MD. The strategy for the treatment of the patients with concomitant pelvic varicose veins and varicose veins of the lower extremities. *Flebologiya*. 2017;11(3):120–130. (In Russ).] doi: 10.17116/flebo2017113120-130.
4. Лакно И.В. Ведение пациенток гинекологического профиля с варикозной болезнью // *Здоровье женщины*. — 2017. — №2 — С. 103–105. [Lakno IV. The management of gynecological patients with varicose veins disease. *Zdorov'e zhenshchiny*. 2017;(2):103–105. (In Russ).]
5. Гус А.И., Хамошина М.Б., Черепанова М.А., и др. *Диагностика и лечение варикозной болезни вен малого таза у женщин*. / Под ред. А.И. Гуса. — Новосибирск: Наука; 2014. — 132 с. [Gus AI, Chamochina MB, Cherepanova MA, et al. *Diagnostika i lechenie varikoznoi bolezni ven malogo taza u zhenshchin*. Novosibirsk: Nauka; 2014.132 p. (In Russ).]
6. Kistner RL, Eklöf B. *Classification and etiology of chronic venous disease*. In: Gloviczki P, editor. *Handbook of venous disorders*. 3rd ed. London: Hodder Arnold; 2009. p. 37–46.
7. Khatiri G, Khan A, Raval G, Chhabra A. Diagnostic evaluation of chronic pelvic pain. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2017;28(3):477–500. doi: 10.1016/j.pmr.2017.03.004.
8. Daniels JP, Champaneria R, Shah L, et al. Effectiveness of embolization or sclerotherapy of pelvic veins for reducing chronic pelvic pain: a systematic review. *J Vasc Interv Radiol*. 2016;27(10):1478–1486. doi: 10.1016/j.jvir.2016.04.016.
9. Жук С.И., Григоренко А.М., Шляхтина А.О. Этиопатогенетический подход к консервативному лечению варикозного расширения вен малого таза у женщин // *Здоровье женщины*. — 2017. — №2 — С. 77–82. [Zhuk SI, Grigorenko AM, Shlyahitina AO. Etiopathogenetic approach to conservative treatment of pelvic congestion syndrome. *Zdorov'e zhenshchiny*. 2017;(2):77–82. (In Russ).]
10. Toledo RR, Santos ME, Schnaider TB. Effect of pycnogenol on the healing of venous ulcers. *Ann Vasc Surg*. 2017;38:212–219. doi: 10.1016/j.avsg.2016.04.014.

11. Kolesnikova LI, Darenskaya MA, Grebenkina LA, et al. Activity of lipid peroxidation in infertile women from different populations. *Bull Exp Biol Med.* 2012;154(2):203–205. doi: 10.1007/s10517-012-1912-4.
12. Kolesnikova LI, Kolesnikov SI, Darenskaya MA, et al. Activity of LPO processes in women with polycystic ovarian syndrome and infertility. *Bull Exp Biol Med.* 2017;162(3):320–322. doi: 10.1007/s10517-017-3605-5.
13. Tassdelen Fisgin N, Aydin BK, Sarikaya H, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis B. *Clin Lab.* 2012;58(3–4):273–280.
14. Pietrzycka A, Kózka M, Urbanek T, et al. Effect of micronized purified flavonoid fraction therapy on endothelin-1 and TNF- $\alpha$  levels in relation to antioxidant enzyme balance in the peripheral blood of women with varicose veins. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015;13(6):801–808. doi: 10.2174/1570161113666150827124714.
15. Castro-Ferreira R, Cardoso R, Leite-Moreira A, Mansilha A. The role of endothelial dysfunction and inflammation in chronic venous disease. *Ann Vasc Surg.* 2018;46:380–393. doi: 10.1016/j.avsg.2017.06.131.
16. Рымашевский Н.В., Маркина В.В., Волков А.Е., Казарян М.С. *Варикозная болезнь и рецидивирующий флебит малого таза у женщин.* — Ростов-на-Дону; 2000. — 163 с. [Rymashevskii NV, Markina VV, Volkov AE, Kazaryan MS. *Varikoznaya bolezni i retsidiviruyushii flebit malogo taza u zhenshchin.* Rostov-on-Don; 2000. 163 p. (In Russ).]
17. Патент РФ на изобретение №2646563/ 05.03.2018. Семендяев А.А., Ступин Д.А., Черепанова М.А., и др. *Способ определения функционального состояния венозной системы малого таза у женщин.* [Patent RUS №2646563/ 05.03.2018. Semendyaev AA, Stupin DA, Cherepanova MA, et al. *Sposob opredeleniya funktsionalnogo sostoyaniya venoznoi sistemy malogo taza u zhenshchin.* (In Russ).] Доступно по: <http://www.findpatent.ru/patent/264/2646563.html>. Ссылка активна на 12.05.2018.
18. Камышников В.С. *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике.* 3-е изд. — М.: МЕДпресс-информ; 2009. — 896 с. [Kamyshnikov VS. *Spravochnik po kliniko-biokhimitskim issledovaniyam i laboratornoi diagnostike.* 3rd ed. Moscow: MEDpress-inform; 2009. 896 p. (In Russ).]
19. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога // *Бюллетень сибирской медицины.* — 2017. — Т.16. — №4 — С. 16–29. [Kolesnikova LI, Darenskaya MA, Kolesnikov SI. Free radical oxidation: a pathophysiological's view. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017;16(4):16–29. (In Russ).] doi: 10.20538/1682-0363-2017-4-16-29.
20. Гус А.И., Семендяев А.А., Ступин Д.А., и др. Значение перекисного окисления липидов в развитии варикозной болезни вен малого таза у женщин. // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* — 2015. — Т.133. — №2 — С. 122–125. [Guss AJ, Semendyaev AA, Stupin DA, et al. The value of lipid peroxidation in the development of varicose veins of small pelvis in women. *Siberian Medical Journal (Irkutsk).* 2015;133(2):122–125. (In Russ).]
21. Darenskaya MA, Kolesnikov SI, Grebenkina LA, et al. The correlation between antioxidant deficiency and reproductive disorders in women with HIV-infection. *Free Radical Biol Med.* 2017;112(S1):129. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.194.
22. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Современные подходы при анализе окислительного стресса, или как измерить неизмеримое // *Бюллетень восточно-сибирского научного центра сибирского отделения российской академии медицинских наук.* — 2016. — Т.1. — №3–2 — С. 174–180. [Menshchikova EB, Zenkov NK. *Sovremennye podkhody pri analize oksiditel'nogo stressa, ili kak izmerit' neizmerimoe.* *Bull Vost Sib Nauch Sent.* 2016;1(3–2):174–180. (In Russ).]
23. Максименко А.В., Ваваев А.В. Ферментные антиоксиданты — следующий этап фармакологического противостояния окислительному стрессу? // *Молекулярная медицина.* — 2010. — №2 — С. 9–14. [Maksimenko AV, Vavaev AV. *Enzymatic antioxidants - the next step for pharmacological counterwork against oxidative stress?* *Molecular medicine.* 2010;(2):9–14. (In Russ).]
24. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., и др. *Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания.* — Новосибирск: АРТА; 2008. — 284 с. [Menshchikova EB, Zenkov NK, Lankin VZ, et al. *Oksiditel'nyi stress: patologicheskie sostoyaniya i zabolevaniya.* — Novosibirsk: ARTA; 2008. 284 p. (In Russ).]
25. Беляева Е.В., Ершова О.А., Астахова Т.А., Бугун О.В. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в этнических группах, проживающих на территории Восточной Сибири // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* — 2017. — Т.21. — №5 — С. 576–580. [Belyaeva EV, Ershova OA, Astakhova TA, Bugun OV. *Glutathione S-transferase polymorphism in ethnic groups living in Eastern Siberia.* *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(5):576–580. (In Russ).] doi: 10.18699/VJ17.274
26. Zhang H, Forman HJ. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(7):722–728. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.03.017.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\**Даренская Марина Александровна*, д.б.н. [*Marina A. Darenskaya*, PhD];

Адрес: 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16 [address: 16 Timiryazeva street, 664003 Irkutsk, Russia],

тел.: +7 (3952) 20-73-67, e-mail: [marina\\_darenskaya@indox.ru](mailto:marina_darenskaya@indox.ru), SPIN-код: 3327-4213,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3255-2013>

*Колесникова Любовь Ильинична*, д.м.н., профессор, академик РАН [*Lyubov' I. Kolesnikova*, MD, PhD, Professor];

e-mail: [iph@sbamsr.irk.ru](mailto:iph@sbamsr.irk.ru), SPIN-код: 1584-0281, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3354-2992>

*Семендяев Андрей Александрович*, д.м.н., профессор [*Andrey A. Semendyaev*, MD, PhD, Professor];

e-mail: [ismupriem@mail.ru](mailto:ismupriem@mail.ru), SPIN-код: 3598-8817, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4107-6285>

*Ступин Дмитрий Андреевич*, аспирант [*Dmitriy A. Stupin*, MD]; e-mail: [stupindima@rambler.ru](mailto:stupindima@rambler.ru), SPIN-код: 6459-1703,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0687-4804>

*Гребенкина Людмила Анатольевна*, д.б.н. [*Lyudmila A. Grebenkina*, PhD]; e-mail: [greblud@mail.ru](mailto:greblud@mail.ru),

SPIN-код: 6194-5785, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1263-5527>

*Натяганова Лариса Викторовна*, к.б.н. [*Larisa V. Natyaganova*, PhD]; e-mail: [irklara@yandex.ru](mailto:irklara@yandex.ru), SPIN-код: 5956-1754,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9315-2307>

*Данусевич Ирина Николаевна*, д.м.н. [*Irina N. Danusevich*, MD, PhD]; e-mail: [irinaemails@gmail.com](mailto:irinaemails@gmail.com),

SPIN-код: 6289-3358, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8862-5771>

*Черепанова Мария Андреевна*, к.м.н. [*Mariya A. Cherepanova*, MD, PhD]; e-mail: [batontchik@yandex.ru](mailto:batontchik@yandex.ru),

SPIN-код: 7850-1633, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6891-3338>

*Колесников Сергей Иванович*, д.м.н., профессор, академик РАН [*Sergey I. Kolesnikov*, MD, PhD, Professor];

e-mail: [iph@sbamsr.irk.ru](mailto:iph@sbamsr.irk.ru), SPIN-код: 1752-6695, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>

А.В. Красюков<sup>1</sup>, Е.В. Машковский<sup>2</sup>, Е.Е. Ачкасов<sup>2</sup>, Е.М. Кашченко<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Университет Британской Колумбии, Ванкувер, Канада

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

# Нарушения работы сердечно-сосудистой системы у людей с хронической травмой спинного мозга при занятиях адаптивной физической культурой и паралимпийским спортом

*Травма спинного мозга (ТСМ) — это тяжелое состояние, характеризующееся выраженными моторными нарушениям (тетраплегия/параплегия), а также дисфункциями автономной нервной системы, которые отрицательно сказываются на здоровье и влияют на различные аспекты повседневной жизнедеятельности. Физическая культура и спорт — важнейшие средства реабилитации и досуга людей с инвалидностью. Все большее число людей с ТСМ начинают вести активный образ жизни. Физическая активность приводит к дополнительной нагрузке на различные органы и системы организма. В статье подробно описаны нарушения функции сердечно-сосудистой системы, которые могут развиваться у людей с ТСМ, ведущих активный образ жизни, в том числе занимающихся паралимпийскими видами спорта: низкое артериальное давление покоя, ортостатическая гипотензия, нарушения ритма сердца и феномен автономной дисрефлексии (парадоксального сочетания эпизодической гипертонии и брадикардии). Мы также рассматривали вопросы, связанные с самоиндуцированными эпизодами автономной дисрефлексии — явлением, известным как «бустинг», представляющим собой намеренное повышение артериального давления спортсменами с ТСМ. Бустинг позволяет кратковременно улучшить спортивные результаты, но в то же время связан с риском развития серьезных сердечно-сосудистых заболеваний и даже внезапной смерти. Такая практика рассматривается Международным паралимпийским комитетом как нарушение антидопинговых правил, и, следовательно, запрещена. Понимание изменений, происходящих в организме людей после ТСМ, ведущих активный образ жизни, необходимо врачам общей практики, неврологам, а также специалистам в области реабилитации, спортивной медицины, адаптивной физкультуры и спорта.*

**Ключевые слова:** автономная дисрефлексия, травма спинного мозга, нарушения сердечно-сосудистой системы, бустинг, спортсмены-паралимпийцы.

*(Для цитирования:* Красюков А.В., Машковский Е.В., Ачкасов Е.Е., Кашченко Е.М. Нарушения работы сердечно-сосудистой системы у людей с хронической травмой спинного мозга при занятиях адаптивной физической культурой и паралимпийским спортом. *Вестник РАМН.* 2018;73(4):236–243. doi: 10.15690/vramn969)

A.V. Krassioukov<sup>1</sup>, E.V. Mashkovskiy<sup>2</sup>, E.E. Achkasov<sup>2</sup>, E.M. Kashchenko<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> University of British Columbia, Vancouver, Canada

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

## Disturbances of Cardiovascular System in Persons with Chronic Spinal Cord Injury during Exercise and Participation in Paralympic Sports

*Spinal cord injury (SCI) is a devastating condition that affects mostly young and active individuals but also impacts their family members and results in significant challenges for medical care and social integration. In addition to obvious motor impairment (tetraplegia/paraplegia), these individuals also suffer from a variety of less obvious but devastating autonomic nervous system dysfunctions that negatively impact their health and affect various aspects of daily living. Physical training and sports are essential components of rehabilitation and leaser activities for people with disabilities. Number of individuals with SCI who run an active lifestyle is increasing. Physical activity puts an additional stress on various organs and body systems. The presented manuscript describes in detail cardiovascular dysfunctions in physically active individuals with a SCI, including those engaged in Paralympic sports: low resting blood pressure, orthostatic hypotension, arrhythmias, and the phenomenon of «autonomic dysreflexia». We also address issues related to self-induced episodes of autonomic dysreflexia in order to improve athletic performance — a phenomenon known as «boosting». Boosting may improve sports performance in short term but is associated with the risk of serious cardiovascular disorders and even sudden death. This practice is considered as anti-doping rule violation by the International Paralympic Committee and thus prohibited. Understanding of the changes occurring in the body of a physically active individual after SCI is necessary for general practitioners, neurologists, rehabilitation specialists, sports medicine physicians, as well as for specialists of adapted physical education and sports.*

**Key words:** autonomic dysreflexia; spinal cord injury; cardiovascular disease; boosting; Paralympics.

*(For citation:* Krassioukov AV, Mashkovskiy EV, Achkasov EE, Kashchenko EM. Disturbances of Cardiovascular System in Persons with Chronic Spinal Cord Injury during Exercise and Participation in Paralympic Sports. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2018;73(4):236–243. doi: 10.15690/vramn969)

## Введение

Лечение и реабилитация людей с травмой спинного мозга (ТСМ) являются одними из важных направлений клинической медицины. По данным мировой литературы, распространенность ТСМ в Соединенных Штатах Америки составляет 906 случаев на 1 млн жителей, в Австралии — 681 на 1 млн. Ежегодная заболеваемость варьирует от 8 (в Испании) до 49,1 (в Новой Зеландии) случаев на 1 млн жителей. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (World Health Organization), заболеваемость ТСМ в мире варьирует от 250 000 до 500 000 случаев в год [1]. Соотношение мужчин и женщин с ТСМ составляет в среднем 3–4:1, пиковая заболеваемость приходится на возраст до 30 лет [2]. В крупных промышленных российских городах (Москве, Санкт-Петербурге, Нижнем Новгороде, Иркутске) частота ТСМ составляет 580–600 случаев на 1 млн населения [3].

ТСМ приводит к повреждениям сенсомоторной системы и вегетативным расстройствам, что оказывает влияние на функциональные, психологические и социально-экономические аспекты жизни людей с этой патологией [4]. Нарушения нисходящих спинномозговых вегетативных путей приводят к патологическим изменениям в различных системах органов, включая сердечно-сосудистую, дыхательную, желудочно-кишечную, а также сбою некоторых функций, в числе которых мочеиспускание, процессы потоотделения и терморегуляции, сексуальная функция [4].

В современной российской научной литературе имеется малое количество публикаций, посвященных проблеме нарушения вегетативных функций у людей с ТСМ. Так, например, по ключевому слову «автономная дисрефлексия» в Научной электронной библиотеке eLIBRARY.RU можно найти только 4 ссылки. Количество специфических работ, описывающих нарушения вегетативной нервной системы у людей с повреждением спинного мозга, которое нам удалось найти по результатам сложных комбинированных поисковых запросов, не превышает 30. Данные цифры могут косвенно свидетельствовать о низкой информированности клинических специалистов о проблеме лечения вегетативных дисфункций у людей с ТСМ.

Известно, что заболевания сердечно-сосудистой системы развиваются в раннем возрасте при перенесенной травме спинного мозга по сравнению со здоровыми лицами и относятся к наиболее распространенным причинам смерти среди людей с хронической ТСМ [5–7]. Также общепризнанно, что во время физической активности сердечно-сосудистая система испытывает значительную нагрузку, в связи с чем в своей статье мы хотели бы подробно остановиться на рассмотрении изменений в данной системе, возникающих у людей с хронической ТСМ. Наиболее характерными из них являются ортостатическая гипотензия [4, 8, 9], нарушения сердечного ритма [4, 10–15] и автономная дисрефлексия [4, 16].

В ряде исследований было показано, что смертность среди лиц с ТСМ выше по сравнению со здоровой популяцией [5]. По данным исследования, проведенного в Дании, общая выживаемость людей с ТСМ была снижена на 90% [17]. Результаты исследования из США показали увеличение уровня смертности на 47% по сравнению с общей популяцией [5].

Несмотря на более высокий уровень смертности в когорте людей с ТСМ, в настоящее время их ожидаемые продолжительность жизни и выживаемость повышаются, в связи с чем увеличивается потребность в обеспечении

более высокого качества жизни, в том числе за счет регулярных физических нагрузок и активного участия в различных видах спорта [18]. Физическая культура и спорт — важные средства реабилитации инвалидов. Все больше людей с травмой спинного мозга начинают вести активный образ жизни [19].

Ответная реакция человеческого организма на физические нагрузки обусловлена определенными физиологическими реакциями сердечно-сосудистой системы, которые в той или иной степени нарушаются в результате перенесенного поражения спинного мозга. Врачам, а также специалистам в области адаптивной физкультуры и спорта необходимо понимание процессов, происходящих в организме людей с ТСМ, занимающихся физической культурой и спортом.

## Нарушения функций сердечно-сосудистой системы у людей с травмой спинного мозга

К основным нарушениям функций сердечно-сосудистой системы у людей с ТСМ, ведущих к активному физическому образу жизни, относятся низкое артериальное давление покоя, ортостатическая гипотензия, нарушения ритма сердца, феномен автономной дисрефлексии.

### Низкое артериальное давление покоя

У лиц с высоким уровнем поражения грудного и шейного отделов позвоночника часто отмечается значительно более низкое артериальное давление в состоянии покоя, чем у здоровых людей [20]. По клиническим данным, степень и тяжесть гипотонии напрямую связана с уровнем и тяжестью ТСМ [21, 22] (рис. 1, 2). В когорте людей с ТСМ выявлено нарушение цереброваскулярной и когнитивной функций, обусловленное низким артериальным давлением покоя [21, 23]. С этим состоянием связывают ряд симптомов, включающих выраженное головокружение и развитие синкопальных состояний, а также плохое настроение, апатичность и повышенную утомляемость [21, 24, 25].

### Ортостатическая гипотензия

У людей с хронической ТСМ на уровне шейных или верхних грудных сегментов спинного мозга часто выявляется ортостатическая гипотензия, при которой отмечается снижение систолического артериального давления по меньшей мере на 20 мм рт.ст. и увеличение как минимум на 10 мм рт.ст. диастолического артериального давления при перемене положения тела — переходе из положения лежа на спине в вертикальное положение [8].

Факторы, которые могут быть связаны с развитием ортостатической гипотензии, включают:

- 1) чрезмерное венозное депонирование крови в органах и нижних конечностях из-за снижения активности симпатической нервной системы и потерю рефлекторного сужения кровеносных сосудов ниже уровня травмы;
- 2) потерю функции мышц нижней конечности, предотвращающих депонирование венозной крови;
- 3) уменьшение объема плазмы крови вследствие гипонатриемии;
- 4) декомпенсацию сердечно-сосудистой системы в результате длительного постельного режима [9].

Кроме того, ТСМ на шейном уровне характеризуется низким уровнем катехоламинов в покое и отсутствием их

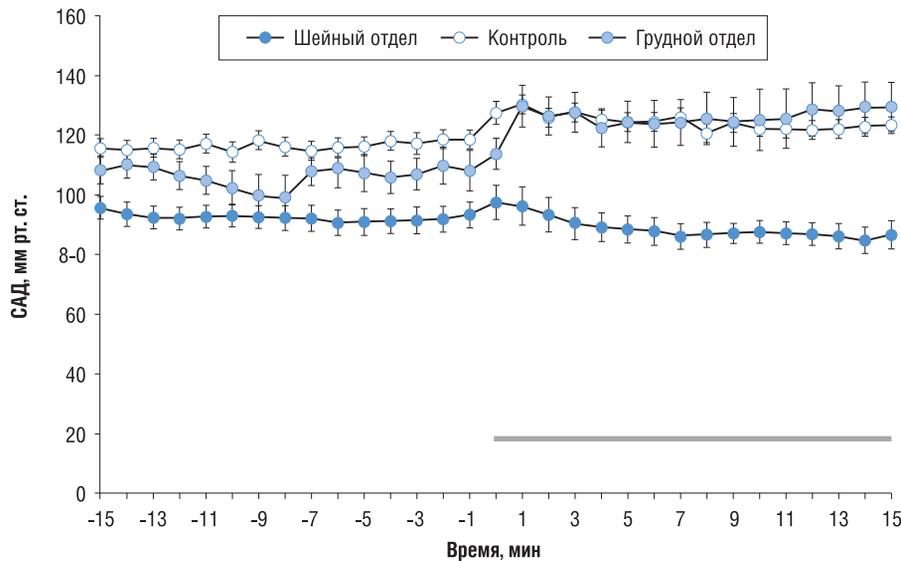


Рис. 1. Изменения систолического артериального давления в ответ на ортостатическую пробу

Примечание. САД — систолическое артериальное давление. Отражены средние значения каждой из групп поминутно в течение всего времени выполнения пробы; черная полоса указывает на пребывание в вертикальном положении [22] (с разрешения журнала «Journal of Neurotrauma»).

238

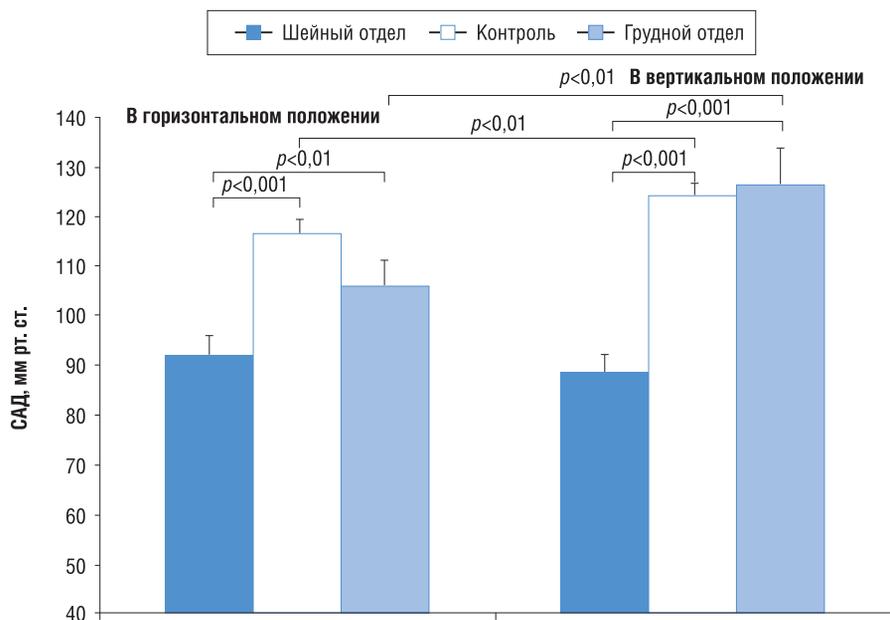


Рис. 2. Изменения систолического артериального давления в ответ на ортостатическую пробу

Примечание. САД — систолическое артериальное давление. Отражено среднее арифметическое каждой из групп в горизонтальном и вертикальном положениях [22] (с разрешения журнала «Journal of Neurotrauma»).

значительного увеличения при супраспинальной симпатической активации, вызванной переходом в вертикальное положение тела [22].

Ортостатическая гипотензия чрезвычайно распространена у лиц с ТСМ: по результатам одного из исследований, выявлена при выполнении ортостатических проб во время лечебной физкультуры и мобилизации у 74% пациентов [25]. Степень ортостатической гипотензии в значительной мере зависит от тяжести и уровня травмы. У людей с тетраплегией данное состояние встречается чаще, чем у людей с параплегией [4, 22] (см. рис. 1, 2).

Эпизоды ортостатической гипотензии могут приводить к нарушению познавательных процессов, обморокам, тошноте, усталости и головокружению, тем самым

значительно препятствуя восстановлению физической работоспособности [26].

Изменение систолического артериального давления у спортсменов с ТСМ во время проведения ортостатической пробы положительно коррелирует с пиковой частотой сердечных сокращений во время физической нагрузки [27] (рис. 3). Это свидетельствует о взаимосвязи функционального состояния вегетативной нервной системы с параметрами уровня частоты сердечных сокращений во время занятий спортом. Функциональные возможности сердечно-сосудистой системы могут быть лимитирующим фактором при занятиях спортом у людей со спинальной травмой, и данные тесты могут быть использованы для предварительной оценки состояния сердечно-сосудистой системы спортсменов [27].

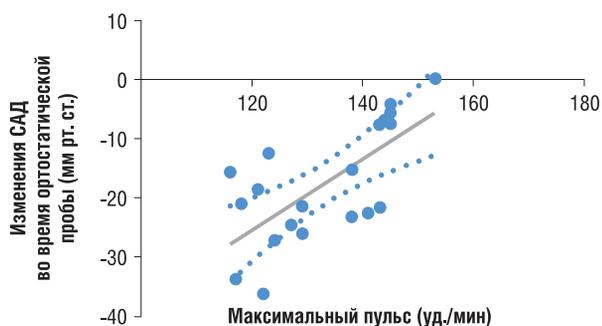


Рис. 3. Изменения в систолическом артериальном давлении во время ортостатической пробы

*Примечание.* САД — систолическое артериальное давление. Изменения в САД во время ортостатической пробы были в значительной степени связаны ( $R^2=0,475$ ;  $p<0,001$ ) с функциональными возможностями сердечно-сосудистой системы во время соревнований (например, с пиковой частотой сердечных сокращений). Реакция САД на ортостатическую пробу оказалась более весомым прогностическим фактором соревновательных возможностей сердечно-сосудистой системы по сравнению с другими тестами вегетативной нервной системы и существующей системой классификации Международной федерации регби на колясках [27] (с разрешения журнала «Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports»).

### Нарушения ритма сердца

Данные по нарушениям ритма сердца у людей с ТСМ противоречивы. Ряд авторов утверждает, что для людей с хронической ТСМ из нарушений ритма сердца наиболее характерны брадикардия, которая встречается у 26–50% лиц с шейным и 13–60% лиц с грудным уровнем повреждения спинного мозга [10–12], и желудочковая экстрасистолия [13]. Однако М. Prakash и соавт., проведя сравнение 654 участников исследования с хронической ТСМ с 26 734 здоровыми людьми, пришли к выводу, что как риск желудочковых экстрасистол, так и риск развития фибрилляции предсердий у лиц с хронической ТСМ аналогичен группе контроля [14]. D. Leaf и соавт. наблюдали за 47 людьми с повреждением спинного мозга на уровне шейного, грудного и поясничного отделов позвоночника в течение 2 лет и не обнаружили каких-либо клинически значимых нарушений ритма сердца [15].

### Автономная дисрефлексия

Автономная дисрефлексия (АДР) — мощный рефлекс симпатической нервной системы, развивающийся из-за массивного высвобождения норадреналина и проявляющийся выраженной вазоконстрикцией дистальнее уровня повреждения спинного мозга в ответ на болевой или иной раздражитель [16]. АДР характеризуется резким повышением артериального и до 300 мм рт.ст. систолического давления [16], а также рефлекторной брадикардией [28]. В ответ на воздействие раздражителя, например перекрытие катетера мочевого пузыря или возникновение пролежней, происходит активация симпатической нервной системы, что приводит к сужению висцеральных сосудов, находящихся ниже уровня травмы, и повышению артериального давления. Однако сохранившиеся рефлексы с барорецепторов активируют парасимпатическую систему, вызывая развитие брадикардии [4]. Нисходящие тормозные супраспинальные сигналы могут влиять на симпатические нейроны выше места повреждения, но не могут обойти уровень

ТСМ [29], в связи с чем артериальное давление остается повышенным. Таким образом, эпизодическая гипертония и брадикардия развиваются одновременно [30]. Чрезмерные парасимпатические влияния выше уровня травмы приводят к расширению кровеносных сосудов в верхней части тела, вызывая головные боли, одышку, покраснение кожных покровов, потливость, заложенность носа, возбуждение или повышенную тревожность [4, 31].

АДР может развиваться как в течение первых нескольких недель, так через несколько месяцев после ТСМ [4, 32]. Основываясь на последних экспериментальных данных на животных и клинических наблюдениях, основными механизмами, ответственными за развитие проявлений АДР, являются следующие:

- первичная симпатическая гиподисфункция в связи с утратой супраспинального симпатического тонического возбуждения [33, 34];
- изменения в морфологии симпатических преганглионарных нейронов [35, 36];
- регенеративные изменения спинномозговых путей (например, прорастание афферентов задних корешков, возможное образование aberrantных синапсов [37] или аномальные входные импульсы в спинномозговых вставочных нейронах [38]);
- измененная симпатосенсорная пластичность [39];
- измененная периферическая нейроваскулярная реактивность [40, 41];
- накопительные эффекты третичных факторов [42].

Кроме того, исследования на грызунах с моделью полной ТСМ («А» по шкале Американской ассоциации спинальной травмы) показали, что реорганизация нейронных путей в поврежденном спинном мозге — основной фактор развития АДР [4]. Тяжесть АДР во многом зависит от «полноты» травмы спинного мозга: только у 27% обследованных с тетраплегией на фоне неполного повреждения спинного мозга проявлялись симптомы этого состояния по сравнению с 91% больных с тетрапарезом на фоне полной ТСМ [43].

Большинство людей с АДР имеют травму на уровне шейного или верхнего грудного отделов позвоночника (до 90% людей с поражением выше Т6), но иногда симптомы, сходные с АДР, возникают у лиц с повреждением на уровне Т10 [4].

В мировой литературе описано семь случаев осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы на фоне АДР, включавших 1 (14%) эпизод остановки сердца, 5 (71%) случаев, связанных с аритмией, и 1 (14%) случай, приведший к развитию немого инфаркта миокарда, однако ни один из них не закончился смертью [44].

### Особенности развития автономной дисрефлексии у людей, занимающихся спортом

На когорте здоровых людей было доказано, что более высокий уровень физической подготовки связан с улучшением вегетативного контроля сердечно-сосудистой системы, а гиподинамия связана со снижением вегетативного тонуса сердечно-сосудистой системы [45]. У спортсменов с ТСМ на фоне регулярного выполнения физических упражнений были также отмечены улучшения функции кардиоваскулярной системы [18, 46, 47]. Однако известно, что если физические упражнения проводятся без соблюдения должного контроля интенсивно-

сти, и уровень нагрузки превышает индивидуально допустимый, существует риск развития сердечно-сосудистых осложнений [18]. Это относится как к спортсменам без физической инвалидности, так и к спортсменам с ТСМ. Одна из проблем спортивной медицины состоит в том, что существующие системы классификации Международного паралимпийского комитета учитывают только прямое влияние поражения на физическую активность (двигательные нарушения), но не оценивают косвенного влияния, например работу сердечно-сосудистой системы, у спортсменов с разным уровнем поражения. Также плохо разработаны допустимые безопасные уровни показателей сердечно-сосудистой системы при нагрузке у спортсменов с ТСМ.

Одним из факторов, обеспечивающих повышение физической активности, является способность сердечно-сосудистой системы и мозгового вещества надпочечников адекватно реагировать на изменения, происходящие в организме на фоне физических нагрузок. Реакция сердечно-сосудистой системы после перенесенной травмы спинного мозга меняется в зависимости от уровня поражения. ТСМ на уровне шеи приводит к наиболее выраженным изменениям реакции сердечно-сосудистой системы в состоянии покоя и в ответ на физические нагрузки из-за нарушения нисходящих симпатических влияний на органы-мишени ниже уровня травмы [48]. Известно, что сердечная функция находится под контролем как симпатической, так и парасимпатической нервных систем. При ТСМ в верхнем шейном отделе парасимпатический контроль не нарушается, тогда как симпатическая нервная система теряет свою автономную тонизирующую функцию. Однако у людей с травмой ниже Т6 симпатический и парасимпатический контроль сердечной функции не нарушен [4]. Было доказано, что у людей с параплегией в отличие от людей с тетраплегией отмечается частичное или полное сохранение нисходящих симпатических влияний на сердце, гладкие мышцы сосудов и мозговое вещество надпочечников, в связи с чем они могут достигать соответствующей возрасту реакции сердечно-сосудистой системы во время физических нагрузок [49].

Кардиоваскулярная система спортсмена с поражением спинного мозга имеет ряд особенностей: интенсивная физическая нагрузка приводит к периферической вазодилатации, которая не сопровождается адекватным увеличением сердечного выброса, что угрожает развитием гипотензии во время и после выполнения физических упражнений [50]. Артериальное давление во время физической нагрузки в большей степени снижается у людей с тетраплегией по сравнению с лицами с параплегией [51], а также при травме на уровне шейного отдела позвоночника в сравнении с грудным уровнем поражения [52].

Это можно объяснить тем, что у людей с тетраплегией в физической активности участвует меньшая мышечная масса, что приводит к более низким потребностям в кислороде и, следовательно, меньшей адаптации сердечно-сосудистой системы. Кроме того, тренировка, вовлекающая в физическую работу только верхние конечности, может характеризоваться более низким ответом обмена веществ, чем при работе всех групп мышц, включающей нижние конечности, когда поглощение кислорода тканями нормализуется работающей мышечной массой [52]. В связи с этим при разработке комплексов упражнений для людей с ТСМ на шейном уровне за основу следует брать принципы облегчения процесса кровообращения [53].

### Проблема «бустинга» в паралимпийском спорте

Неспособность регулировать артериальное давление и частоту сердечных сокращений становится значительной проблемой в отношении физической работоспособности у спортсменов высокого уровня. Как и для большинства людей с ТСМ, для паралимпийцев характерны низкое артериальное давление покоя и ортостатическая гипотензия, что приводит к ухудшению снабжения напряженных мышц кровью и кислородом во время физических нагрузок по сравнению со здоровыми людьми. Во время соревнований ритм сердца спортсменов с ТСМ, особенно шейного и верхнегрудного отделов, не может повышаться в соответствии с требованиями их организма, что может приводить к низкому артериальному давлению, повышенной утомляемости, часто плохим результатам во время выступлений и снижению выносливости [54]. Нарушенная симпатическая иннервация сердца позволяет достичь максимальной частоты сердечных сокращений на уровне 110–130 уд./мин [55].

Некоторые спортсмены с ТСМ стремятся увеличить свою работоспособность в соревнованиях, повышая артериальное давление. Они часто прибегают к самоиндукции АДР [56], что также известно под термином «бустинг» (от англ. boosting — улучшение), с целью получения преимуществ от выраженного ответа симпатической нервной системы [57]. Исследование Y. Bhamhani и соавт. выявило, что более 15% спортсменов с ТСМ на уровне выше Т6 прибегали к индукции АДР [58] с помощью инициирующего стимула ниже уровня поражения, вызывающего генерализованный эфферентный симпатический ответ, что в свою очередь приводило к вазоконстрикции ниже уровня поражения спинного мозга [59]. Следовательно, повышаются артериальное давление и кровотоков к работающим мышцам, и тем самым улучшаются результаты. Также состояние дисрефлексии снижает субъективную оценку интенсивности нагрузки и повышает максимальную скорость [60]. Показано, что бустинг приводит к улучшению результата во время соревнований по лыжным гонкам до 9,7% [61]. В одном из исследований участники указали на то, что АДР давала преимущество в гонках на средние (78,6%) и дальние (71,4%) дистанции, марафоне (64,3%) и в соревнованиях по регби на колясках (64,3%) [58].

Мочевой пузырь, кишечник и кожа — основные триггерные точки для произвольной индукции АДР [30], а раздражение этих органов часто приводит к развитию этого феномена. Наиболее частыми способами индукции АДР являются плотное закрепление ножных ремней (например, сжимание ног, стоп, мошонки или яичек), использование воздействия электрического тока на мышцы, перелом кости (обычно пальцев ног) или закупорка катетера для вызывания отека мочевого пузыря [57].

Эпизоды повышения артериального давления до критических цифр могут приводить к временному улучшению спортивных результатов спортсменов, но они имеют и негативные последствия для спортсмена. Кроме того, что АДР может приводить к развитию сердечно-сосудистых, неврологических, зрительных, легочных, вегетативных и метаболических осложнений, многие из провоцирующих это состояние факторов могут вызывать заболевания, часто требующие хирургического вмешательства (например, гидронефроз) или инфекционные болезни кожи [57].

Параспортсмены находятся в группе риска развития серьезных сердечно-сосудистых нарушений, связанных

с бустингом, поэтому Международный паралимпийский комитет официально запретил эту практику [4, 62].

В руководстве Международного паралимпийского комитета сказано, что АДР выявляется в случае, когда систолическое давление составляет 180 мм рт.ст. или выше. Спортсмен, имеющий симптомы, характерные для АДР, будет повторно обследован через 10 мин после его выявления. Если артериальное давление останется неизменным, спортсмен будет отстранен от соревнований. Если у спортсмена с ТСМ на уровне Т6 и выше имеется артериальная гипертензия, она должна быть задокументирована как существовавшая ранее, с данными уровня артериального давления в покое как минимум за 14 дней до соревнований и указанием текущей терапии по поводу этого заболевания [63].

Как отмечалось выше, в научной литературе проблеме АДР и бустинга у спортсменов уделяется мало внимания. Найденное количество ссылок в eLIBRARY (4 ссылки) и PubMed (863 ссылки) по ключевому слову «автономная дисрефлексия» косвенно свидетельствует, что врачи и тренеры, работающие с параспортсменами, мало знают о данном феномене. Можно предположить, что это будет иметь отражение и в клинической практике, в частности при выборе неправильной тактики купирования данного состояния. Ряд исследований напрямую показал, что спортсмены с ТСМ, их родственники, тренеры и реабилитологи не осведомлены о причинах возникновения, симптомах, опасностях и последствиях, а также мерах первой помощи при развитии АДР [58]. Один из возможных путей решения данной проблемы — проведение образовательных программ для врачей, людей с ТСМ и их родственников. Не вызывает сомнений, что ранняя диагностика и своевременная коррекция изменений со стороны сердечно-сосудистой системы имеют решающее значение в жизни людей с ТСМ. Необходимо помнить, что артериальное давление у лиц с ТСМ ниже, чем у здоровых людей (примерно на 15–20 мм рт.ст.), следовательно, повышение давления на 20–40 мм рт.ст. должно считаться «красным флагом», указывающим на неотложное состояние. Симптомы АДР обычно кратковременны, но если они вызваны определенными специфическими стимулами, синдром может длиться в течение нескольких дней или недель [43].

Консорциум по лечению повреждений спинного мозга (Consortium for spinal cord medicine) Американской организации «Парализованные ветераны Америки» рекомендует, чтобы в случае неэффективности нелекарственных мер и сохранения артериального давления 150 мм рт.ст. или выше проводилась фармакологическая терапия. Было предложено несколько лекарственных препаратов (например, нифедипин, нитраты, каптоприл, теразозин, празозин, феноксифензамин, простагландин E<sub>2</sub>, силденафил) для лечения эпизодов АДР [59]. Однако в связи с тем, что АДР может быть вызвана многими факторами, вероятно, наиболее эффективным методом лечения является комбинированный подход, включающий фармакологические препараты, нейрональную защиту, аксональную регенерацию и аберрантную пластичность [4].

Особенно важна проблема АДР в спортивной среде, т.к. спортсмены намеренно используют ее. Бустинг, который стал очевидной проблемой на Паралимпийских играх в Атланте в 1996 г., до сих пор не включен в список Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) как один из методов допинга [59]. Несмотря на это, тестирование на АДР у паралимпийских спортсменов с ТСМ до соревнований начали проводить во время нескольких крупных

международных соревнований. Тестирование проводилось у спортсменов по паралегкой атлетике и гонкам на колясках. Положительных результатов наличия АДР получено не было [63]. В связи с очень ограниченными данными пока невозможно оценить реальную распространенность феномена среди спортсменов, хотя имеющиеся в настоящее время данные могут служить отправной точкой для разработки исследований, направленных на то, чтобы разобраться в этом вопросе [64].

Было выяснено, что около 40% спортсменов-паралимпийцев с высоким уровнем поражения спинного мозга не знают о природе и рисках бустинга, в связи с чем должны быть разработаны образовательные программы с целью расширения знаний и осведомленности об этом феномене [58, 65].

## Заключение

В последнее десятилетие значительное число исследований затрагивало проблемы, связанные с дисфункциями вегетативной нервной и сердечно-сосудистой систем у людей с ТСМ. Однако требуется дальнейшее изучение патофизиологических механизмов их развития, в том числе такого уникального феномена, как автономная дисрефлексия. Учитывая тот факт, что это состояние опасно для жизни, необходимо разрабатывать и внедрять образовательные программы для врачей, среднего и младшего медицинского персонала, тренеров, людей с ТСМ и лиц, осуществляющих уход за ними, с акцентом на предотвращение развития АДР и оказание первой помощи при ней. Также должны быть определены шаги для сокращения смертности среди лиц с ТСМ. Необходимо проведение международной методологической работы для включения бустинга в список запрещенных методов ВАДА для обеспечения честной конкуренции. Несмотря на то, что АДР четко определена и запрещена правилами Международного паралимпийского комитета, необходима дополнительная работа по признанию дисфункций вегетативной нервной системы лимитирующими факторами спортивной подготовки и рассмотрение вопроса о возможном включении оценки параметров автономной нервной системы при проведении медико-функциональной классификации по правилам Международного паралимпийского комитета.

## Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа и подготовка статьи осуществлены на средства международного гранта Blusson Integrated Cures Partnership.

## Конфликт интересов

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

## Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. who.int [Internet]. Spinal cord injury [updated 2013 Nov 19; cited 2018 Apr 12]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs384/en/>.
2. Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, et al. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol.* 2014;6:309–331. doi: 10.2147/clep.s68889.
3. Морозов И.Н., Млявях С.Г. Эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы (обзор). // *Медицинский альманах*. — 2011. — №4 — С. 157–159. [Morozov IN, Mlyavykh SG. The epidemiology of vertebral-cerebrospinal trauma. *Meditinskii al'manakh.* 2011;(4):157–159. (In Russ).]
4. Partida E, Mironets E, Hou S, Tom VJ. Cardiovascular dysfunction following spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2016;11(2):189–194. doi: 10.4103/1673-5374.177707.
5. Garshick E, Kelley A, Cohen SA, et al. A prospective assessment of mortality in chronic spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2005;43(7):408–416. doi: 10.1038/sj.sc.3101729.
6. Cragg JJ, Noonan VK, Krassioukov A, Borisoff J. Cardiovascular disease and spinal cord injury: results from a national population health survey. *Neurology.* 2013;81(8):723–728. doi: 10.1212/wnl.0b013e3182a1aa68.
7. Wu JC, Chen YC, Liu L, et al. Increased risk of stroke after spinal cord injury: a nationwide 4-year follow-up cohort study. *Neurology.* 2012;78(14):1051–1057. doi: 10.1212/wnl.0b013e31824e8eaa.
8. Grigorean VT, Sandu AM, Popescu M, et al. Cardiac dysfunctions following spinal cord injury. *J Med Life.* 2009;2(2):133–145.
9. Wecht JM, De Meersman RE, Weir JP, et al. Cardiac autonomic responses to progressive head-up tilt in individuals with paraplegia. *Clin Auton Res.* 2003;13(6):433–438. doi: 10.1007/s10286-003-0115-5.
10. Winslow EB, Lesch M, Talano JV, Meyer PR. Spinal cord injuries associated with cardiopulmonary complications. *Spine (Phila Pa 1976).* 1986;11(8):809–812. doi: 10.1097/00007632-198610000-00014.
11. Claydon VE, Hol AT, Eng JJ, Krassioukov AV. Cardiovascular responses and postexercise hypotension after arm cycling exercise in subjects with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2006;87(8):1106–1114. doi: 10.1016/j.apmr.2006.05.011.
12. Claydon VE, Elliott SL, Sheel AW, Krassioukov A. Cardiovascular responses to vibrostimulation for sperm retrieval in men with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2006;29(3):207–216. doi: 10.1080/10790268.2006.11753876.
13. Hector SM, Biering-Sorensen T, Krassioukov A, Biering-Sorensen F. Cardiac arrhythmias associated with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2013;36(6):591–599. doi: 10.1179/2045772313y.0000000114.
14. Prakash M, Raxwal V, Froelicher VF, et al. Electrocardiographic findings in patients with chronic spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81(8):601–608. doi: 10.1097/00002060-200208000-00008.
15. Leaf DA, Bahl RA, Adkins RH. Risk of cardiac dysrhythmias in chronic spinal cord injury patients. *Paraplegia.* 1993;31(9):571–575. doi: 10.1038/sc.1993.92.
16. Красюков А.В. Расстройства вегетативной нервной системы, связанные с повреждением спинного мозга. Научный обзор. // *Вестник восстановительной медицины*. — 2014. — №3 — С. 94–109. [Krassioukov AV. Disorders of autonomic nervous system caused by spinal cord injury. Scientific review. *Vestnik vosstanovitel'noi meditsiny.* 2014; (3):94–109. (In Russ).]
17. Hartkopp A, Brønnum-Hansen H, Seidenschur A-M, Biering-Sorensen F. Survival and cause of death after traumatic spinal cord injury. A long-term epidemiological survey from Denmark. *Spinal Cord.* 1997;35(2):76–85. doi: 10.1038/sj.sc.3100351.
18. Lee YH, Lee JH, Kim SH, et al. Hemodynamic adaptations to regular exercise in people with spinal cord injury. *Ann Rehabil Med.* 2017;41(1):25–33. doi: 10.5535/arm.2017.41.1.25.
19. Gass GC, Watson J, Camp EM, et al. The effects of physical training on high level spinal lesion patients. *Scand J Rehabil Med.* 1980;12(2):61–65.
20. West CR, Mills P, Krassioukov AV. Influence of the neurological level of spinal cord injury on cardiovascular outcomes in humans: a meta-analysis. *Spinal Cord.* 2012;50(7):484–492. doi: 10.1038/sc.2012.17.
21. Wecht JM, Bauman WA. Decentralized cardiovascular autonomic control and cognitive deficits in persons with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2013;36(2):74–81. doi: 10.1179/2045772312y.0000000056.
22. Claydon VE, Krassioukov AV. Orthostatic hypotension and autonomic pathways after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(12):1713–1725. doi: 10.1089/neu.2006.23.1713.
23. Phillips AA, Warburton DE, Ainslie PN, Krassioukov AV. Regional neurovascular coupling and cognitive performance in those with low blood pressure secondary to high-level spinal cord injury: improved by alpha-1 agonist midodrine hydrochloride. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(5):794–801. doi: 10.1038/jcbfm.2014.3.
24. Phillips AA, Krassioukov AV, Ainslie PN, Warburton DE. Perturbed and spontaneous regional cerebral blood flow responses to changes in blood pressure after high-level spinal cord injury: the effect of midodrine. *J Appl Physiol (1985).* 2014;116(6):645–653. doi: 10.1152/jappphysiol.01090.2013.
25. Illman A, Stiller K, Williams M. The prevalence of orthostatic hypotension during physiotherapy treatment in patients with an acute spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2000;38(12):741–747. doi: 10.1038/sj.sc.3101089.
26. Phillips AA, Krassioukov AV. Contemporary cardiovascular concerns after spinal cord injury: mechanisms, maladaptations, and management. *J Neurotrauma.* 2015;32(24):1927–1942. doi: 10.1089/neu.2015.3903.
27. Squair JW, Phillips AA, Currie KD, et al. Autonomic testing for prediction of competition performance in Paralympic athletes. *Scand J Med Sci Sports.* 2017;28(1):311–318. doi: 10.1111/sms.12900.
28. Krassioukov AV, Warburton DE, Teasell R, et al. A systematic review of the management of autonomic dysreflexia after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2009;90(4):682–695. doi: 10.1016/j.apmr.2008.10.017.
29. Krassioukov AV. Which pathways must be spared in the injured human spinal cord to retain cardiovascular control? *Prog Brain Res.* 2006;152:39–47. doi: 10.1016/s0079-6123(05)52003-x.
30. Karlsson AV. Autonomic dysreflexia. *Spinal Cord.* 1999;37(6):383–391. doi: 10.1038/sj.sc.3100867.
31. Milligan J, Lee J, McMillan C, et al. Autonomic dysreflexia: recognizing a common serious condition in patients with spinal cord injury. *Can Fam Physician.* 2012;58(8):831–835.
32. Krassioukov AV, Furlan JC, Fehlings MG. Autonomic dysreflexia in acute spinal cord injury: an under-recognized clinical entity. *J Neurotrauma.* 2003;20(8):707–716. doi: 10.1089/089771503767869944.
33. Mayorov DN, Adams MA, Krassioukov AV. Telemetric blood pressure monitoring in conscious rats before and after compression injury of spinal cord. *J Neurotrauma.* 2001;18(7):727–736. doi: 10.1089/089771501750357663.
34. Maiorov DN, Weaver LC, Krassioukov AV. Relationship between sympathetic activity and arterial pressure in conscious spinal rats. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 2):H625–631. doi: 10.1152/ajpheart.1997.272.2.h625
35. Krassioukov AV, Bunge RP, Pucket WR, Bygrave MA. The changes in human spinal sympathetic preganglionic neurons after spinal cord injury. *Spinal Cord.* 1999;37(1):6–13. doi: 10.1038/sj.sc.3100718.
36. Krassioukov AV, Weaver LC. Reflex and morphological changes in spinal preganglionic neurons after cord injury in rats. *Clin Exp Hypertens.* 1995;17(1–2):361–373. doi: 10.3109/10641969509087077.

242

37. Krenz NR, Meakin SO, Krassioukov AV, Weaver LC. Neutralizing intraspinal nerve growth factor blocks autonomic dysreflexia caused by spinal cord injury. *J Neurosci*. 1999;19(17):7405–7414. doi: 10.1523/jneurosci.19-17-07405.1999.
38. Krassioukov AV, Johns DG, Schramm LP. Sensitivity of sympathetically correlated spinal interneurons, renal sympathetic nerve activity, and arterial pressure to somatic and visceral stimuli after chronic spinal injury. *J Neurotrauma*. 2002;19(12):1521–1529. doi: 10.1089/089771502762300193.
39. Ramer LM, van Stolk AP, Inskip JA, et al. Plasticity of TRPV1-expressing sensory neurons mediating autonomic dysreflexia following spinal cord injury. *Front Physiol*. 2012;3:257. doi: 10.3389/fphys.2012.00257.
40. Arnold JM, Feng QP, Delaney GA, Teasell RW. Autonomic dysreflexia in tetraplegic patients: evidence for  $\alpha$ -adrenoceptor hyperresponsiveness. *Clin Auton Res*. 1995;5(5):267–270. doi: 10.1007/bf01818891.
41. Phillips AA, Matin N, Frias B, et al. Rigid and remodelled: cerebrovascular structure and function after experimental high-thoracic spinal cord transection. *J Physiol*. 2016;594(6):1677–1688. doi: 10.1113/jp270925.
42. Phillips AA, Cote AT, Bredin SS, et al. Aortic stiffness increased in spinal cord injury when matched for physical activity. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(11):2065–2070. doi: 10.1249/mss.0b013e3182632585.
43. Legg D, Mason DS. Autonomic dysreflexia in wheelchair sport: a new game in the legal arena? *Marq Sports L*. 1998;8(2):225–237.
44. Wan D, Krassioukov AV. Life-threatening outcomes associated with autonomic dysreflexia: a clinical review. *J Spinal Cord Med*. 2013;37(1):2–10. doi: 10.1179/2045772313y.00000000098.
45. Yamamoto K, Miyachi M, Saitoh T, et al. Effects of endurance training on resting and post-exercise cardiac autonomic control. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(9):1496–1502. doi: 10.1097/00005768-200109000-00012.
46. Otsuka Y, Shima N, Moritani T, et al. Orthostatic influence on heart rate and blood pressure variability in trained persons with tetraplegia. *Eur J Appl Physiol*. 2008;104(1):75–78. doi: 10.1007/s00421-008-0783-x.
47. Wecht JM, Marsico R, Weir JP, et al. Autonomic recovery from peak arm exercise in fit and unfit individuals with paraplegia. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38(7):1223–1228. doi: 10.1249/01.mss.0000227306.34149.ba.
48. Krassioukov AV. Autonomic function following cervical spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;169(2):157–164. doi: 10.1016/j.resp.2009.08.003.
49. Currie KD, West CR, Krassioukov AV. Differences in left ventricular global function and mechanics in paralympic athletes with cervical and thoracic spinal cord injuries. *Front Physiol*. 2016;7:110. doi: 10.3389/fphys.2016.00110.
50. Krediet CT, Wilde AA, Wieling W, Halliwill JR. Exercise related syncope, when it's not the heart. *Clin Auton Res*. 2004;14 Suppl 1:25–36. doi: 10.1007/s10286-004-1005-1.
51. Dela F, Mohr T, Jensen CM, et al. Cardiovascular control during exercise: insights from spinal cord-injured humans. *Circulation*. 2003;107(16):2127–2133. doi: 10.1161/01.cir.0000065225.18093.e4.
52. Calbet JA, Holmberg HC, Rosdahl H, et al. Why do arms extract less oxygen than legs during exercise? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(5):R1448–1458. doi: 10.1152/ajpregu.00824.2004.
53. Machač S, Radvanský J, Kolář P, Kříž J. Cardiovascular response to peak voluntary exercise in males with cervical spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2015;39(4):412–420. doi: 10.1080/10790268.2015.1126939.
54. Moreno MA, Zamunér AR, Paris JV, et al. Effects of wheelchair sports on respiratory muscle strength and thoracic mobility of individuals with spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil*. 2012;91(6):470–477. doi: 10.1097/phm.0b013e3182adcb0.
55. Bhambhani Y. Physiology of wheelchair racing in athletes with spinal cord injury. *Sports Med*. 2002;32(1):23–51. doi: 10.2165/00007256-200232010-00002.
56. Mills PB, Krassioukov AV. Autonomic function as a missing piece of the classification of Paralympic athletes with spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2011;49(7):768–776. doi: 10.1038/sc.2011.2.
57. Mazzeo F, Santamaria S, Iavarone A. «Boosting» in Paralympic athletes with spinal cord injury: doping without drugs. *Funct Neurol*. 2015;30(2):91–98. doi: 10.11138/fneur/2015.30.2.091.
58. Bhambhani Y, Mactavish J, Warren S, et al. Boosting in athletes with high-level spinal cord injury: knowledge, incidence and attitudes of athletes in Paralympic sport. *Disabil Rehabil*. 2010;32(26):2172–2190. doi: 10.3109/09638288.2010.505678.
59. Blackmer J. Rehabilitation medicine: 1. Autonomic dysreflexia. *CMAJ*. 2003;169(9):931–935.
60. Webborn AD. «Boosting» performance in disability sport. *Br J Sports Med*. 1999;33(2):74–75.
61. Bhambhani Y, Forbes S, Forbes J, et al. Physiologic responses of competitive Canadian cross-country skiers with disabilities. *Clin J Sport Med*. 2012;22(1):31–38. doi: 10.1097/jsm.0b013e3182432f0c.
62. International Paralympic Committee. *Position statement on autonomic dysreflexia and boosting*. In: *IPC Handbook* [Internet]. Bonn, Germany: International Paralympic Committee; 2006 [cited 2018 May 14]. Available from: [https://www.paralympic.org/sites/default/files/document/180726114334276\\_IPC+Handbook\\_Chapter+4\\_2\\_Position+Statement+on+Autonomic+Dysreflexia+and+Boosting.pdf](https://www.paralympic.org/sites/default/files/document/180726114334276_IPC+Handbook_Chapter+4_2_Position+Statement+on+Autonomic+Dysreflexia+and+Boosting.pdf).
63. Blauwet CA, Benjamin-Laing H, Stomphorst J, et al. Testing for boosting at the Paralympic games: policies, results and future directions. *Br J Sports Med*. 2013;47(13):832–837. doi: 10.1136/bjsports-2012-092103.
64. Lippi G, Longo UG, Maffulli N. Genetics and sports. *Br Med Bull*. 2009;93(1):27–47. doi: 10.1093/bmb/ldp007.
65. Krassioukov AV. Autonomic dysreflexia: current evidence related to unstable arterial blood pressure control among athletes with spinal cord injury. *Clin J Sport Med*. 2012;22(1):39–45. doi: 10.1097/JSM.0b013e3182420699.

### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\***Кащенко Елена Михайловна**, врач-ординатор [**Elena M. Kashchenko**, MD];  
 Адрес: 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 9 [address: 2 build. 9, Bolshaya Pirogovskaya street, 119435 Moscow, Russia], тел.: +7 (499) 248-76-66, e-mail: kashchenko.elena@mail.ru, SPIN-код: 8242-0045, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5181-4379>

**Красюков Андрей Васильевич**, д.м.н., профессор [**Andrei V. Krassioukov**, MD, PhD, Professor];  
 e-mail: krassioukov@icord.org, SPIN-код: 3732-5282, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0022-7972>

**Машковский Евгений Владимирович**, к.м.н., доцент [**Evgeny V. Mashkovskiy**, MD, PhD];  
 e-mail: emash@me.com, SPIN-код: 6546-6314, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5675-3488>

**Ачкасов Евгений Евгеньевич**, д.м.н., профессор [**Evgeny E. Achkasov**, MD, PhD, Professor];  
 e-mail: 2215.g23@rambler.ru, SPIN-код: 5291-0906, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9964-5199>

О.Ю. Манзенюк\*, В.В. Фирстова, Т.Н. Мухина, И.Г. Шемякин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,  
п. Оболенск, Российская Федерация

# Молекулярные системы регулирования формирования биопленок бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

В настоящее время внутрибольничные инфекции, обусловленные бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, продолжают оставаться актуальной проблемой ввиду устойчивости этого микроорганизма к широкому спектру антибактериальных препаратов и способности формировать биопленки, которые в 1000 раз менее чувствительны к воздействию антибиотиков, нежели свободноживущие (планктонные) культуры. Формирование биопленок *P. aeruginosa* регулируется коммуникационной системой «чувство кворума» (quorum sensing, QS), которая находится под контролем ингибиторов системы (QSIs). Важную роль в формировании биопленок играет внеклеточная ДНК (eDNA), структурный полианионный полимер, что само по себе является уникальным свойством, поскольку роль генетического носителя информации в данном случае не применима. Формирование биопленок *P. aeruginosa* регулируется также внутренними сигнальными молекулами *c-di-GMP* и каскадом киназ *Gac/Rsm*. В обзоре дано описание молекулярных механизмов действия ингибиторов сигнальных молекул системы QS, а также соединений, модулирующих сигналы QS.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, биопленки, сигналы «чувство кворума», ингибиторы системы «чувство кворума».

(Для цитирования: Манзенюк О.Ю., Фирстова В.В., Мухина Т.Н., Шемякин И.Г. Молекулярные системы регулирования формирования биопленок бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2018;73(4):244–251. doi: 10.15690/vramn1010)

244

## Проблема множественной лекарственной устойчивости, факторы патогенности и персистенции бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

Возбудитель синегнойной инфекции бактерии *Pseudomonas aeruginosa* впервые был обнаружен в 1862 г. [1]. В 1882 г. синегнойная палочка (*Bacillus pyocyaneus*) была выделена в «чистой» культуре [2, 3]. Последующие 130 лет ознаменовались интенсивным развитием микробиологии, эпидемиологии и медицинских наук, однако на сегодняшний день ситуация с лечением инфекций, обусловленных *P. aeruginosa*, усугубилась с появлением штаммов с множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам: в ряде случаев эту внутрибольничную инфекцию невозможно лечить с помощью современных антибиотиков из-за устойчивости бактерии к этим препаратам [4]. Так, например, в США в 2013 г. в абсолютных цифрах зарегистрирована 51 000 госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, из которых 13% случаев были обусловлены мультирезистентными штаммами, а летальность от инфекции составила 440 случаев за год [5].

Возможной причиной недооценки клинической значимости этой инфекции, на наш взгляд, могла служить

теоретическая предпосылка, которая главенствовала до 1970-х годов прошлого века. Тогда считалось, что бактерии и в частности псевдомонады живут в окружающей среде в виде одиночных организмов (планктонный образ жизни). Однако позднее было показано, что иные формы жизни бактерий широко распространены там, где присутствуют антибиотики и факторы иммунной защиты. Начиная с 90-х годов прошлого века основное внимание исследователей было сфокусировано на изучении механизмов выживания патогенных микроорганизмов во внешней среде в виде монобинарных/мультивидовых биопленок и феномена множественной лекарственной устойчивости к широкому спектру антибактериальных препаратов [6, 7].

*P. aeruginosa* — граммотрицательный факультативный (оппортунистический) патоген человека, редко являющийся причиной инфекционных заболеваний у здоровых людей, однако часто ассоциированный с нозокомиальными (внутрибольничными) инфекциями: в 16% случаев вызывает легочные инфекции, в 12% — инфекции мочевыводящих путей, в 8% — хирургические раневые и ожоговые инфекции, в 10% — генерализованные инфекции крови [8].

O.Yu. Manzenyuk\*, V.V. Firstova, T.N. Mukhina, I.G. Shemyakin

FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

## Molecular Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms

Nowadays healthcare-associated infections caused *Pseudomonas aeruginosa* remain actual problem due to *P. aeruginosa* resistance to a wide range of antimicrobials and its ability to form biofilms that are 1000 times more resistant to antibiotics than free-living (plankton) cultures. *P. aeruginosa* biofilms forming is regulated by Quorum Sensing (QS) communication system which is controlled by inhibitors (Quorum sensing inhibitors, QSIs). An essential role in stabilization of biofilms belongs to extracellular DNA (eDNA) as a structural polyanionic polymer whereas its genetic function is not applicable. In addition, internal signal molecules *c-di-GMP*, cascade *Gac/Rsm* also participate in formation of *P. aeruginosa* biofilms. A review provides a detailed description of the biofilm molecular regulation by means of QS inhibitors and QS modulators of signaling molecules QS.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms, Quorum Sensing (QS) signals, Quorum Sensing inhibitors (QSIs).

(For citation: Manzenyuk OYu, Firstova VV, Mukhina TN, Shemyakin IG. Molecular Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2018;73(4):244–251. doi: 10.15690/vramn1010)

Возбудитель псевдомоноза занимает первое место в структуре гнойно-септических инфекций в родовспомогательных учреждениях Российской Федерации. Так, например, ретроспективный анализ медицинских карт новорожденных детей в 2015 г. в одном из регионов РФ, нацеленный на поиск клинических форм гнойно-септических инфекций, показал превышение показателей заболеваемости более чем 3 раза по сравнению с официальными статистическими показателями. В акушерских стационарах эти показатели, по данным ретроспективного анализа документации, превышали официальную статистику более чем в 4 раза [9].

Высокая лекарственная устойчивость псевдомонад обусловлена R-плазмидами — кольцевыми двуспиральными внехромосомными ДНК, передающимися от штамма к штамму путем конъюгации, трансформации или трансдукции. R-плазмиды могут нести 10 и более маркеров резистентности. Такая возможность обмена генетической информацией об антибиотикоустойчивости внутри вида и рода способствует появлению полирезистентных штаммов. *P. aeruginosa* обладает природной чувствительностью к  $\beta$ -лактамам антибиотикам (цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему), аминогликозидам и фторхинолонам, которые обычно являются эффективными при терапии псевдомонозов. Особую опасность представляет резистентность синегнойной палочки к карбапенемам — меропенему и имипенему, которые наряду с другими антисинегнойными средствами являются препаратами выбора в терапии тяжелых инфекций, вызванных *P. aeruginosa*. Мутации, обуславливающие блокирование поступления антибиотика в клетку, являются основным механизмом резистентности к карбапенемам. Ферментная инактивация обычно реализуется с помощью бета-лактамаз, принадлежащих к молекулярным классам A (GES, KPC), D (OXA-50), а также металло-бета-лактамазы класса B (VIM, IMP). Для *P. aeruginosa* описано пять основных групп металло-бета-лактамаз: они содержат по два атома цинка и отличаются друг от друга аминокислотными последовательностями [10, 11].

Факторы патогенности *P. aeruginosa* обусловлены секретруемыми веществами, связанными с клеткой, или веществами, секретруемыми экстрацеллюлярно, — адгезинами, экзотоксинами S и A, липополисахаридами. Наиболее важную роль в патогенности *P. aeruginosa* играет экзотоксин A — экстрацеллюлярный белок, который продуцируют более 90% клинических штаммов псевдомонад. Механизм функционирования экзотоксина подобен механизму функционирования дифтерийного токсина и основан на блокаде синтеза белка. Экзотоксин A *P. aeruginosa* обуславливает гибель лабораторных животных при парентеральном введении через 48 ч. Патологоморфологическое изучение печени животных через 4 ч после введения экзотоксина A показывало частичный некроз клеток. Полный некроз клеток наблюдался спустя двое суток после введения очищенного препарата экзотоксина A [12].

В работе Р. Gilbert и А. McVain были идентифицированы гены *P. aeruginosa*, ответственные за синтез факторов патогенности: ферменты эластазы, кодируемая геном *lasB*; протеаза, кодируемая *lasA*; экзотоксин A, кодируемый *toxA*; щелочная фосфатаза, кодируемая геном *aprA* [13]. Кроме того, сюда входит белковый комплекс RhlR с аутоиндуктором C4-HSL, который индуцирует экспрессию генов вирулентности *lasB* и *aprA* [13, 14].

Бактерии *P. aeruginosa* могут образовывать несколько типов биопленок. Бактерии, дефектные по признаку

ауторегуляции, формируют на границе твердой и жидкой фаз биопленку, представляющую собой слой клеток без морфологической дифференциации, т.е. присутствуют только внутренняя и наружная части [15]. Показано, что микробные клетки передвигаются по поверхности раздела сред [16], затем теряют подвижность. Некоторые из них слипаются друг с другом и начинают выделять внеклеточные полимеры (липополисахариды, гликопротеины, полисахариды, экстрацеллюлярную (внеклеточную) ДНК (extracellular DNA, eDNA), которые называют внеклеточными полимерными субстанциями (extracellular polymeric substances, EPS) [17]. Они в свою очередь формируют внеклеточный полимерный матрикс. В результате деления клеток возникают компактные микроколонии, объединенные матриксом. При неблагоприятных условиях наступает стадия деградации, и часть клеток гибнет, высвобождаясь в окружающую среду в виде планктонных свободноплавающих *P. aeruginosa* [18]. Характерной особенностью *P. aeruginosa* являются бинарные биопленки, в которых бактерии сохраняют жизнеспособность и высокую численность совместно с быстрорастущей культурой *Klebsiella pneumoniae* [19, 20].

Таким образом, «биопленочная конструкция» представляет собой микроколонию, окруженные внеклеточным полимерным матриксом из внеклеточных полимерных субстанций. Внеклеточный полимерный матрикс может деградировать под влиянием бактерий матрикса на полисахариды, белки и eDNA [21, 22].

### Молекулярные механизмы регулирования формирования биопленок *Pseudomonas aeruginosa*

Первая аргументированная концепция ингибирования коммуникационной клеточной системы «чувство кворума» (quorum sensing, QS) была изложена в работе М. Hentzer и соавт. [23]. В ее основе лежал принцип антибактериального лечения псевдомонозов бромированными фуранонами. Впервые лечение инфекции не влияло на активность возбудителя инфекции *in vivo*. Этот феномен послужил основанием для последующих исследований ингибиторов клеточной системы QS (quorum sensing inhibitors, QSIs), которые в перспективе могли бы быть использованы в «антибиопленочной» терапии.

Идея воздействия на биопленку и факторы патогенности без учета гибели возбудителя инфекции приобрела большую популярность при разработке противомикробной стратегии и в свою очередь повлекла за собой исследования малых соединений QSIs, способных ингибировать клеточные регуляторные системы QS, — внутренние сигнальные молекулы (internal signal molecule c-di-GMP), некодирующие регуляторные малые РНК RsmY и RsmZ (RNAs RsmY, RNAs RsmZ), каскад киназ Gac/Rsm (табл. 1) [24, 25].

### Ингибирующее действие микробных полисахаридов на формирование биопленок

При изучении влияния микробных полисахаридов на рост бактерий было обнаружено явление конкуренции между биопленками различных бактерий. Другими словами, полисахариды, входящие в состав внеклеточного полимерного матрикса биопленок одного микроорганизма, могут ингибировать формирование биопленок

**Таблица 1.** Межклеточные регуляторные системы, участвующие в жизненном цикле биопленки *P. aeruginosa*

Система «чувство кворума», QS	Внутренние сигнальные дигуанозинмонофосфаты, c-di-GMP	РНК Gac/Rsm каскад
Экстрацеллюлярная ДНК	Экзополисахариды	Экзополисахариды
Рамнолипид	Адгезины	Подвижность
Пиоцианин	Подвижность	Система AHL: N-ацил-L-гомосерин лактон
-	Дисперсия с высвобождением бактерий	-

другими бактериями. Так, например, было показано, что капсульные полисахариды группы II уropатогенного штамма *Escherichia coli* подавляли формирование биопленок *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae* [26].

Экзополисахариды обеспечивают структурную стабильность при формировании биопленок за счет продукции альгинатов Psl (polysaccharide synthesis locus) и Pel (от pellicule; полисахарид с высоким содержанием глюкозы). В обычных условиях окружающей среды альгинаты не продуцируются. Накопление экзополисахаридов Pel и Psl обусловлено влиянием каскада киназ Gac/Rsm [27]. Таким образом, внеклеточный полисахарид способствует формированию биопленки с помощью уникальной схемы регулирования положительной обратной связи, которая может играть роль при отборе планктонных бактерий для присоединения к существующей биопленке.

### Защита от макроорганизма: внеклеточная (экстрацеллюлярная) ДНК

Продукция eDNA, контролируемая QS [18], обеспечивает как структурную устойчивость биопленки, так и увеличение антимикробной устойчивости. Более того, было показано, что eDNA является фактором, способствующим, в частности, блокированию дыхательных путей больных муковисцидозом (кистозный фиброз; cystic fibrosis) вследствие секреции мокроты с высокой вязкостью. У таких больных содержание eDNA составляло 3–14 мг/мл по сравнению с контрольной группой, у которой eDNA отсутствовала. ДНК — высокоанионный полимер; считается, что ее роль в увеличении антибиотикоустойчивости осуществляется за счет связывания положительно заряженных антибиотиков, таких как аминогликозиды, и антимикробных пептидов. Также было показано, что большие количества ДНК обладали катион-хелатирующим свойством, вызывающим клеточный лизис, который в свою очередь приводил к высвобождению клеточного содержимого, включая внутриклеточную ДНК [28]. eDNA, внедряемая в биопленку, может поступать из лизированных клеток иммунной системы организма-хозяина. Последние исследования подтверждают факт экзогенного продуцирования eDNA как основного фактора микробной защиты [29]. Заслуживает внимания тот факт, что лизис полиморфноядерных лейкоцитов (polymorphonuclear leukocytes, PMNs) приводил к ускорению образования биопленки за счет высвобождения ДНК PMNs, которая затем функционировала как eDNA. Это означает, что если «биопленочная» инфекция не устраняется иммунной системой, то последующее включение eDNA, высвобождаемой из PMNs в матрице биопленки, способствует дальнейшему повышению структурной стабильности «биопленочной» колонии, а также увеличению устойчивости по отношению к положительно заряженным антибиотикам [30].

### Феназины и рамнолипиды

Феназины — это группа молекул пигментов, продуцируемых *Pseudomonas spp.* Многие из феназинов оказывают токсическое действие в отношении клеток прокариот и эукариот. Наиболее изученным из них является пиоцианин (pyocyanin), который присутствует исключительно у бактерий *P. aeruginosa*. Продукция пиоцианина регулируется сигнальной системой PQS (*Pseudomonas* quinolone signal). Пиоцианин считается одним из основных факторов патогенности *P. aeruginosa* при острых и хронических инфекциях: он повреждает эпителиальные клетки, подавляет пролиферацию лимфоцитов и инактивирует ингибитор протеазы альфа, что приводит к повреждению тканей из-за повышенного уровня эндогенных протеаз. Помимо этого, пиоцианин ингибирует продукцию простациклина легочными эндотелиальными клетками и ограничивает рост Т-лимфоцитов вследствие высвобождения интерлейкина 2. Прямое связывание пиоцианина с парами азотистых оснований ДНК влияет на гидрофобность клеточной поверхности и таким образом на агрегацию клеток, повышающих структурную стабильность биопленки [31].

Другим считающимся ключевым QS-регулируемым фактором патогенности являются рамнолипиды (rhamnolipids) — рамнозосодержащий гликолипидный биосурфактант. Бактерии *P. aeruginosa* продуцируют два основных класса рамнолипидов — моно- и дирамнолипиды, которые кодируются тремя генами на двух разных оперонах. Один оперон несет гены *rhlAB* (*rhlA*, *PA3479*) и *rhlB* (*rhlB*, *PA3478*), другой — *rhlC* (*PA1131*). Оперон *rhlAB* кодирует фермент рамносилтрансферазу (rhamnolytransferase), который принимает участие в синтезе монорамнолипида (mono-rhamnolipid), а *rhlC* кодирует вторую рамносилтрансферазу, которая преобразует монорамнолипид в дирамнолипид.

Рамнолипид является термостабильным гемолизинем с множеством свойств: он ускоряет лизис нейтрофилов, макрофагов клеток животных; принимает участие в обеспечении ротационной подвижности клеток; влияет на формирование биопленок; обладает антимикробной активностью в отношении различных бактерий, таких как *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* (минимальная ингибирующая концентрация в диапазоне от 0,5 до 32 мкг/мл), а также в отношении грибов *Penicillium funiculosum* и *Fusarium solani* (минимальная ингибирующая концентрация 16 и 75 мкг/мл соответственно) [32].

Уничтожая PMNs, бактерия защищается от иммунной системы «хозяина», тем самым увеличивая собственный потенциал выживания. Эта функция была названа «щитом рамнолипидов» (rhamnolipid shield). Так, например, было продемонстрировано увеличение содержания рамнолипида в биопленке под воздействием PMNs. Предполагается, что биопленка *P. aeruginosa* может реагировать

на присутствие PMNs путем установки рамнолипидного «щита» [33]. Продукция рамнолипида и пиоцианина находится под контролем интегрированной системы QS (integrated QS system), которая идентифицирована J. Lee и соавт. как новый класс сигнальной QS *P. aeruginosa* [33]. Также было показано, что система IQS контролируется геном *las* при нормальных условиях роста. В условиях ограничения фосфатов система IQS берет на себя функции *las*-системы и активирует систему PQS [34]. Поскольку мутации в генах *lasI* или *lasR* часто обнаруживались в клинических изолятах *P. aeruginosa* [35], было высказано предположение, что система IQS может функционировать как альтернативный сигнальный механизм поддержания экспрессии генов вирулентности *P. aeruginosa* при хронических формах инфекции.

### Сигнальные молекулы — нуклеотиды c-di-GMP

Нуклеотиды c-di-GMP играют важную роль внутриклеточных вторичных сигнальных молекул при переключении сигналов между режимом роста и подвижностью компонентов биопленки. Молекулы c-di-GMP являются положительным регулятором продукции нескольких адгезинов *P. aeruginosa* (табл. 2). Переключение сигналов зависит от внутриклеточной концентрации c-di-GMP. Низкие уровни c-di-GMP благоприятствуют экспрессии факторов, обуславливающих подвижность клеток, а высокие уровни, напротив, способствуют «сидячему стилю жизни» биопленки (sessile lifestyle) за счет увеличения экспрессии факторов адгезии и фрагментов внеклеточного матрикса [36]. Количество молекул c-di-GMP находится в зависимости от двух ферментов:

- дигуанилатциклаза (diguanylate cyclase, DGC) синтезирует c-di-GMP из двух молекул гуанозинтрифосфата (guanosine triphosphate, GTP);
- фосфодиэстераза (phosphodiesterase, PDE) расщепляет c-di-GMP до линейного динуклеотида pGpG.

В настоящее время определено более 100 белков, такие как WspR, DGC, BifA, участвующих в хемотаксисе с помощью жгутиков [37]. Однако специфическая функция c-di-GMP-связывающих белков до сих пор неизвестна. Так, например, синтез пилей IV типа регулируется

**Таблица 2.** Основные компоненты, находящиеся под контролем C-di-GMP и GAC систем

C-di-GMP	Gac-система: RetS, GacS, LadS
Белки PilZ, FimX (пили IV типа)	Малая РНК RsmZ
Белки WspR, MогA (фимбрии)	Малая РНК RsmY
Белок CdrA поверхностный	Сигнальная молекула C4-HSL (AHL-компонент)
Белок Alg 44	Сигнальная молекула 3-оксо-C12HSL (LasR-компонент)
Полисахарид Psl	Система секреции III типа
Фенотип «мелкие колонии» (RSCV)	Система секреции VI типа

ется c-di-GMP и зависит от белков PilZ и FimX, которые в свою очередь имеют c-di-GMP-связывающие домены. Было обнаружено, что экспрессия гена *cupA* фимбрий зависит от белков WspR, MогA и PA1120. Показано, что PDE RocR участвует в синтезе CupB и CupC фимбрий. При этом экспрессия поверхностного белка CdrA, который связывает клетки *P. aeruginosa* с полисахаридом Psl, положительно контролируется c-di-GMP на транскрипционном уровне. Повышенные концентрации c-di-GMP приводят к увеличению продукции Psl и других компонентов матрицы биопленки [38].

Синтез альгината также положительно регулируется c-di-GMP. Мембранозаякоренный белок Alg44, который является частью альгинатсинтазы, содержит c-di-GMP-связывающий домен PilZ. Стимуляция активности Alg44 через домен PilZ, по-видимому, происходит путем связывания c-di-GMP с мембранозаякоренным белком MucR. Некоторые данные указывают на то, что нуклеотиды c-di-GMP участвуют в изменении инфекционного процесса в сторону хронического состояния. Мукоидный фенотип при хронических инфекциях в определенной степени регулируется c-di-GMP. Более того, изоляты *P. aeruginosa* кистозного фиброза, которые проявляют фенотип диссоциантов мелких колоний (rough small colony variant, RSCV), имеют повышенные уровни экспрессии генов *pel* и *psl*. Было высказано предположение, что данный фенотип RSCV может способствовать увеличению уровней лекарственной устойчивости при инфекции дыхательных путей [39].

### Gac-система

В проксимальной части генома перед AHL и PQS системами, которые можно назвать центральными частями системы QS, находится система трансдукции Gac. Gac-система состоит из трансмембранной киназы GacS, которая аутофосфорилирует консервативный гистидиновый остаток, затем этот фосфат переносится на собственный регулятор GacA. Последний влияет на транскрипцию двух малых РНК (sRNAs) — RsmZ и RsmY. Эти две sRNAs связываются с CsrA — гомологом RsmA, посттранскрипционным регуляторным белком, который подавляет различные гены-мишени, ответственные за подвижность бактерий. RsmA оказывает отрицательное влияние на синтез сигнальных молекул — компонентов факторов патогенности C4-HSL и 3-оксо-C12-HSL. RsmY и RsmZ оказывают противоположное действие, что приводит к увеличению продукции факторов патогенности.

В дополнение к GacS были идентифицированы две другие сенсорные киназы для регулирования экспрессии гена через GacA: RetS — регулятор экзополисахарида и секреции III типа и LadS (lost adherence sensor). В работе A. Goodman и соавт. [40] было показано, что эффект достигается за счет образования гетеродимеров между RetS и GacS, что в свою очередь приводит к блокированию аутофосфорилирования GacS и служит указанием на то, что RetS является антагонистом GacS. Функция LadS имеет противоположную направленность: он активирует экспрессию RsmY и RsmZ через GacA [41, 42]. Эти и другие данные *in vitro* позволяют сделать вывод, что острые инфекции обычно связаны с высоким уровнем вирулентности и секреции, обусловленной системой секреции III типа (type III secretion system, T3SS), тогда как хронические инфекции, вероятнее всего, связаны с режимом биопленки, когда вирулентность бактерий

низкая в силу экспрессии системы VI типа (type VI secretion system, T6SS) [43].

### Взаимосвязи между регулируемыми системами

Недавние исследования позволили установить, что каскад Gac/Rsm регулирует гены, кодирующие поглощение железа, и тем самым продукцию сидерофора посредством модуляции внутриклеточного уровня c-di-GMP. Активированная система Gac, как правило, связана со снижением вирулентности и экспрессии системы T6SS за счет непосредственного взаимодействия между каскадом Gac/Rsm и системой c-di-GMP. Так, например, в работе I. Vente была показана связь между c-di-GMP и RetS-путями и переключение с системы T3SS на T6SS [44]. Более того, экспрессию T3SS и T6SS можно переключать с помощью изменения количества c-di-GMP в присутствии функциональных RsmY и RsmZ. Позднее эта исследовательская группа обнаружила взаимосвязь между системами, показав, что DGC SadC (surface attachment defective) супрессируется RsmA [44, 45].

происходят из аллиина (alliin) в результате ферментативного процесса, возникающего при измельчении чеснока и/или нагревании. Соединение аджоен представляет собой смесь двух изомеров — E и Z. Недавно было показано, что мишенью аджоен является Gac/Rsm — часть системы QS, угнетающей экспрессию двух малых регуляторных РНК — RsmY и RsmZ [53], тем самым устраняющей изолирующее влияние малых РНК на RsmA. Кроме того, результаты демонстрировали уменьшение экспрессии системы секреции VI (T6SS), что указывает на свойство соединения аджоен обуславливать переключение в направлении острого инфекционного состояния.

Скрининг 69 других различных источников натурального сырья показал, что высоким уровнем ингибирующей QSI-активности в отношении *P. aeruginosa* обладал экстракт хрена иберин [54]. Это стало очевидным при лечении иберином мышей, которое, однако, не показало значительного снижения микробной обсемененности на внутрибрюшинной модели мышей. Транскриптомный анализ бактерий, подвергшихся воздействию иберина и азитромицина, демонстрирует существенные различия в количестве генов, регулируемых этими двумя соединениями. Азитромицин в концентрации 2 мкг/мл обуславливает снижение экспрессии 227 генов, 82 из которых являются QS-регулируемыми, в то время как иберин снижает экспрессию 41 гена [55].

248

### Соединения, модулирующие сигналы QS

В одной из работ M. Hentzer и соавт. [46] на примере химически модифицированных галогенированных фуранонов были представлены доказательства концепции ингибирования QS по типу антимикробного действия. Работы по исследованию химически модифицированных фуранонов продолжают в направлении создания менее токсических небромированных фуранонов [47].

Данные о кристаллической структуре белка LasR позволили разработать рациональный дизайн для виртуального скрининга структур новых модуляторов QS [48], таких как, например, салициловая кислота, нифуроказид и хлорзоксазон. При высокопроизводительном скрининге 200 000 малых соединений были найдены два наиболее активных QSI — ингибитора LasR, которые содержали 12-углеродный алкильный «хвост» и таким образом напоминали 3-оксо-C12-HSL. Первое соединение, обозначенное PD12, имело ингибирующую концентрацию IC50 равную 30 нМ. Второе соединение, обозначенное V-06-018, имело ингибирующую концентрацию IC50 10 мкМ. Оба соединения ингибировали продукцию эластазы и пиоцианина [49, 50]. В работе T. Rasmussen был проведен скрининг различных природных источников: показано, что экстракт чеснока (*Allium sativum*) обладал выраженным ингибирующим действием на QS-систему бактерий *P. aeruginosa*. Сначала на модели хронической инфекции нематод было доказано, что экстракт *Allium sativum* снижал смертность нематод до 5% и, кроме того, повышал восприимчивость биопленки *P. aeruginosa* при лечении тобрамицином [51]. Также была показана ускоренная элиминация *P. aeruginosa* на «легочной модели» мыши при обработке экстрактом *Allium sativum* [52]. Оказалось, что он содержит ряд активных соединений QSI, многие из которых теряются при фракционировании и очистке. Основным активным соединением-ингибитором (QSI) было идентифицировано сероорганическое соединение в виде бесцветной жидкости, содержащее сульфоксидные и дисульфидные функциональные группы — аджоен (ajoene). Соединение состоит из двух молекул аллицина, которые

### Малые РНК (sRNAs) — «кандидаты» регулирования механизма формирования биопленки

Кандидатом регулирования формирования биопленки являются посттранскрипционные регуляторы — малые РНК. В настоящее время в литературе описано более 200 небольших РНК в геноме *P. aeruginosa*; однако об их биологических функциях в клетке известно мало. Так, малая РНК, обозначенная как SrbA локус, повышала уровень экспрессии SrbA в 45 раз в культурах биопленки штамма *P. aeruginosa* PA14. Потеря экспрессии SrbA в делеционном штамме приводила к 66%-му уменьшению массы биопленки. При этом потеря экспрессии SrbA не оказывала влияния на устойчивость к антибиотикам ципрофлоксацину, гентамицину и тобрамицину. По-видимому, малая РНК SrbA важна для образования биопленки *P. aeruginosa* [56, 57].

### Соединения, модулирующие c-di-GMP сигналы

Эбселен (ebselen) — синтетическое селеноорганическое соединение, которое модифицирует остатки цистеина и, кроме того, обладает противовоспалительной и антиоксидантной активностью. Недавнее исследование показало, что эбселен ингибирует связывание c-di-GMP с DGC и белком WspR в низких концентрациях (мкМ), влияет на c-di-GMP фенотип, обеспечивающий дисперсию клеток и уменьшение образования биопленки [58].

Бензотиазолинон — пример идентификации специфического ингибитора c-di-GMP, регулирующего степень вирулентности *P. aeruginosa*. Соединение было получено недавно в результате высокопроизводительного скрининга 250 000 соединений. Последующий тест *in silico* показал, что он, однако, не влиял на формирование биопленки, хотя и ингибировал PDE RocR *P. aeruginosa* [59].

## Заключение

Приведенные в обзоре данные заболеваемости и смертности, обусловленные бактериями *P. aeruginosa*, свидетельствуют о серьезности проблемы, связанной с лечением послеоперационных осложнений у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии с высоким риском внутрибольничного инфицирования резистентными штаммами *P. aeruginosa*, формирующими биопленки. Данные о том, насколько распространена в России устойчивость к отдельным антибиотикам, практически отсутствуют. В создавшейся в настоящее время ситуации чрезвычайно важной является разработка адекватных методов лечения, применимых в условиях отделений реанимации и интенсивной терапии, а также сдерживающих мер по ограничению распространения возбудителя синегнойной инфекции.

На примере описания молекулярных механизмов резистентности *P. aeruginosa* и формирования «биопленочного» фенотипа нами сделана попытка анализа возможных подходов к регулированию формирования биопленок *P. aeruginosa* в микробных сообществах.

Отличительным свойством бактерий *P. aeruginosa* является широкий набор факторов патогенности — белковых молекул (адгезинов, гемолизинов, экзотоксинов, протеаз), липополисахаридов и др. Наличие плазмид, несущих множественные маркеры устойчивости к антибактериальным препаратам, придают клеткам *P. aeruginosa* уникальную способность чрезвычайно быстрой модификации генома и преодоления защитных механизмов организма-хозяина.

Доказано, что патогенные псевдомонады, обитающие в биопленках, широко распространены в среде, где присутствуют антибиотики и другие факторы антимикробной защиты. Изучение механизмов формирования защитных форм выживания патогенных микроорганизмов во внешней среде в виде монобинерных-мультивидовых биопленок позволили установить основные (но далеко не все) структурные и функциональные элементы биопленок.

Показано, что «биопленочная структура» состоит из микроколоний, которые окружены внеклеточным полимерным матриксом, состоящим из EPS, которые деградируют под влиянием бактерий матрикса на полисахариды, белки, жиры, eDNA.

В последнее время значительное число работ посвящено исследованию путей ингибирования компонентов биопленки *P. aeruginosa* без уничтожения возбудителя

инфекции. Это направление включает в себя исследования ингибиторов системы QS, способных подавлять активность клеточной регуляторной системы QS. Прежде всего, это внутренние сигнальные молекулы c-di-GMP, некодирующие регуляторные малые РНК RsmY и RsmZ, каскад киназ Gac/Rsm. Открытие ингибиторов клеточной системы QS инициировало исследования на транскрипционном уровне регуляторов клеточной системы QS и других мишеней-кандидатов, которые могли бы быть использованы в перспективе в медицине.

Вместе с тем следует отметить, что изучение различных химических соединений с ингибирующей активностью при высокопроизводительном скрининге не дает точных данных о нежелательных побочных эффектах активного соединения. Вследствие этого эксперименты *in vivo* на лабораторных животных остаются важным звеном в процессе отбора кандидатов лекарств, эффективных в отношении полирезистентных штаммов *P. aeruginosa*.

## Источник финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

## Конфликт интересов

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

## Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

## Выражение признательности

Авторы выражают признательность В.К. Плакунову и М.В. Журиной за весьма полезные замечания при обсуждении экспериментальных и теоретических аспектов формирования биопленок у различных видов бактерий.

## ЛИТЕРАТУРА

- Arivett BA, Ream DC, Fiester SE, et al. Draft genome sequences of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from wounded military personnel. *Genome Announc.* 2016;4(4):e00829-16. doi: 10.1128/genomeA.00829-16.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2000;2(9):1051–1060. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01259-4.
- Bergey DH, Holt JG. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
- World Health Organization. *Antibacterial agents in clinical development. An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*. Geneva: World Health Organization; 2017.
- cdc.gov [Internet]. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Report. pp. 69–71. [cited 2018 Aug 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322–332. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):551–560. doi: 10.3201/eid0404.980405.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- Захарова Ю.А. Гнойно-септическая заболеваемость новорожденных при различных формах эпидемиологического наблюдения (выборочные исследования). // *Медицинский алфавит*. — 2015. — Т.1. — №6 — С. 15–18. [Zakharova YuA. Gnoino-septicheskaya zaboлеваemost' novorozhdennykh pri razlichnykh formakh epidemiologicheskogo nablyudeniya

- (vyborochnye issledovaniya). *Meditsinskii alfavit*. 2015;1(6):15–18. (In Russ).]
10. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю., Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. Изучение действия субингибирующих концентраций антибиотиков на экспрессию генов, регулирующих продукцию факторов патогенности у бактерий комплекса Burkholderia cepacia и Pseudomonas aeruginosa. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. — 2005. — №2 — С. 13–16. [Shaginyan IA, Chernukha MY, Zigangirova NA. Izuchenie deistviya subingibiruyushchikh koncentraciy antibiotikov na expressiyu genov, reguliruyushchikh produkciyu faktorov patogenosti u bakteriy kompleksa Burkholderia cepacia i Pseudomonas aeruginosa. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2005;(2):13–16. (In Russ).]
  11. Jacoby GA. Properties of an R plasmid in Pseudomonas aeruginosa producing amikacin (BB-K8), butirosin, kanamycin, tobramycin, and sisomicin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1974;6(6):807–810. doi: 10.1128/aac.6.6.807.
  12. Дзюбак С.Т. Механизм действия экзотоксина Pseudomonas aeruginosa на макроорганизм (экспериментальные исследования) // *Журнал микробиологии*. — 1984. — №3 — С. 35–39. [Dzyubak ST. Mekhanizm deistviya ekzotoksina Pseudomonas aeruginosa na makroorganizm (eksperimental'nye issledovaniya). *Zhurnal mikrobiologii*. 1984;(30):35–39. (In Russ).]
  13. Gilbert P, McBain A. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(2):189–208. doi: 10.1128/CMR.16.2.189-208.2003.
  14. Duan K, Surette MG. Environmental regulation of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J Bacteriol*. 2007;189(13):4827–4836. doi: 10.1128/JB.00043-07.
  15. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280(5361):295–298. doi: 10.1126/science.280.5361.295.
  16. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Mol Microbiol*. 1998;30(2):295–304. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.
  17. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005;13(1):20–26. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.006.
  18. Webb JS, Thompson LS, James S, et al. Cell death in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *J Bacteriol*. 2003;185(15):4585–4592. doi: 10.1128/jb.185.15.4585-4592.2003.
  19. Плакунов В.К., Мартянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты. // *Микробиология*. — 2017. — Т.86. — №4 — С. 402–420. [Plakunov VK, Mart'yanov SV, Teteneva NA, Zhurina MV. Controlling of microbial biofilms formation: anti- and probiofilm agents. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2017;86(4):402–420. (In Russ).] doi: 10.7868/s0026365617040127.
  20. Banks MK, Bryers JD. Bacterial species dominance within binary culture biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57(7):1974–1979.
  21. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. *Mol Microbiol*. 2006;59(4):1114–1128. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x.
  22. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Environ Microbiol*. 2008;10(9):2331–2343. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x.
  23. Hentzer M, Eberl L, Givskov M. Transcriptome analysis of Pseudomonas aeruginosa biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofilms*. 2005;2(1):37–61. doi: 10.1017/s1479050505001699.
  24. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J*. 2003;22(15):3803–3815. doi: 10.1093/emboj/cdg366.
  25. Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(9):4457–4464. doi: 10.1128/aem.68.9.4457-4464.2002.
  26. Bernal P, Llamas MA. Promising biotechnological applications of antibiofilm polysaccharides. *Microb Biotechnol*. 2012;5(6):670–673. doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00359.x.
  27. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, et al. The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol*. 2012;14(8):1913–1928. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x.
  28. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, et al. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(23):9188–9192. doi: 10.1073/pnas.87.23.9188.
  29. Chiang WC, Nilsson M, Jensen PØ, et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2352–2361. doi: 10.1128/AAC.00001-13.
  30. Das T, Kutty SK, Tavallaie R, et al. Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for Pseudomonas aeruginosa biofilm. *Sci Rep*. 2015;5:8398. doi: 10.1038/srep08398.
  31. Habu E, Pinazo A, Jauregui O, et al. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng*. 2003;81(3):316–322. doi: 10.1002/bit.10474.
  32. Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen PØ, et al. Pseudomonas aeruginosa recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology*. 2009;155(Pt 11):3500–3508. doi: 10.1099/mic.0.031443-0.
  33. Lee J, Wu J, Deng Y, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol*. 2013;9(5):339–343. doi: 10.1038/nchembio.1225.
  34. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Jakobsen TH, et al. Quorum sensing and virulence of Pseudomonas aeruginosa during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2010;5(4):e10115. doi: 10.1371/journal.pone.0010115.
  35. Christen M, Christen B, Folcher M, et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem*. 2005;280(35):30829–30837. doi: 10.1074/jbc.M504429200.
  36. Düvel J, Bertinetti D, Möller S, et al. A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in Pseudomonas aeruginosa. *J Microbiol Methods*. 2012;88(2):229–236. doi: 10.1016/j.mimet.2011.11.015.
  37. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, et al. Pseudomonas aeruginosa uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol*. 2010;75(4):827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.
  38. Oglesby LL, Jain S, Ohman DE. Membrane topology and roles of Pseudomonas aeruginosa Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology*. 2008;154(Pt 6):1605–1615. doi: 10.1099/mic.0.2007/015305-0.
  39. Kay E, Humair B, Dénevaud V, et al. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*. 2006;188(16):6026–6033. doi: 10.1128/JB.00409-06.
  40. Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, et al. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev*. 2009;23(2):249–259. doi: 10.1101/gad.1739009.
  41. Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, et al. The hybrid histidine kinase LadS forms a multicomponent signal transduction

- system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*. 2016;12(5):e1006032. doi: 10.1371/journal.pgen.1006032.
42. Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*. 2006;312(5779):1526–1530. doi: 10.1126/science.1128393.
  43. Frangipani E, Visaggio D, Heeb S, et al. The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*. 2014;16(3):676–688. doi: 10.1111/1462-2920.12164.
  44. Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, et al. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):171–176. doi: 10.1073/pnas.0507407103.
  45. Moscoso JA, Jaeger T, Valentini M, et al. The diguanylate cyclase SadC is a central player in Gac/Rsm-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2014;196(23):4081–4088. doi: 10.1128/JB.01850-14.
  46. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. 2002;148(Pt 1):87–102. doi: 10.1099/00221287-148-1-87.
  47. Read R, Kumar N. Production of Furanones. United States patent 20070032666 A1. 2007 Feb 8.
  48. Zou Y, Nair SK. Molecular basis for the recognition of structurally distinct autoinducer mimics by the *Pseudomonas aeruginosa* LasR quorum-sensing signaling receptor. *Chem Biol*. 2009;16(9):961–970. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.09.001.
  49. Yang L, Rybtke MT, Jakobsen TH, et al. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2432–2443. doi: 10.1128/AAC.01283-08.
  50. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol*. 2005;187(5):1799–1814. doi: 10.1128/jb.187.5.1799-1814.2005.
  51. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, et al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*. 2005;151(Pt 12):3873–3880. doi: 10.1099/mic.0.27955-0.
  52. Pratt DA. Garlic and other alliums. The lore and the science. By Eric Block. *Angew Chem Int Ed*. 2010;49(40):7162. doi: 10.1002/anie.201004351.
  53. Jakobsen TH, Warming AN, Vejborg RM, et al. A broad range quorum sensing inhibitor working through sRNA inhibition. *Sci Rep*. 2017;7(1):9857. doi: 10.1038/s41598-017-09886-8.
  54. Jakobsen TH, Bragason SK, Phipps RK, et al. Food as a source for quorum sensing inhibitors: Iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(7):2410–2421. doi: 10.1128/AEM.05992-11.
  55. Tan SY, Liu Y, Chua SL, et al. Comparative systems biology analysis to study the mode of action of the isothiocyanate compound iberin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(11):6648–6659. doi: 10.1128/AAC.02620-13.
  56. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3648–3663. doi: 10.1128/AAC.01230-07.
  57. Taylor PK, Van Kessel ATM, Colavita A, et al. A novel small RNA is important for biofilm formation and pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182582. doi: 10.1371/journal.pone.0182582.
  58. Lieberman OJ, Orr MW, Wang Y, Lee VT. High-throughput screening using the differential radial capillary action of ligand assay identifies ebselen as an inhibitor of diguanylate cyclases. *ACS Chem Biol*. 2014;9(1):183–192. doi: 10.1021/cb400485k.
  59. Zheng Y, Tsuji G, Opoku-Temeng C, Sintim HO. Inhibition of *P. aeruginosa* c-di-GMP phosphodiesterase RocR and swarming motility by a benzothiazolinone derivative. *Chem Sci*. 2016;7(9):6238–6244. doi: 10.1039/c6sc02103d.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\*Манзенок Оксана Юрьевна, к.м.н. [Oksana Y. Manzenyuk, MD, PhD];

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск [address: Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russia], e-mail: macebarron2013@gmail.com, SPIN-код: 6871-5381, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8641-8517>

Фирстова Виктория Валерьевна, д.б.н. [Victoria V. Firstova, PhD]; e-mail: firstova@obolensk.org, SPIN-код: 9166-9151, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9898-9894>

Мухина Татьяна Николаевна, к.б.н. [Tatiana N. Mukhina, PhD]; e-mail: cecile98@rambler.ru, SPIN-код: 6858-5052, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5829-0512>

Шемякин Игорь Георгиевич, д.б.н., профессор [Igor G. Shemyakin, PhD, Professor]; e-mail: shemyakin@obolensk.org, SPIN-код: 3180-1459, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9667-1674>

Э.А. Мордовский\*, А.Г. Соловьёв, А.Л. Санников

Северный государственный медицинский университет, Архангельск, Российская Федерация

# Актуальные методические проблемы оценки масштаба негативных последствий потребления алкоголя и пути их решения

Потребление алкоголя является одним из ведущих факторов риска состояния глобального популяционного здоровья, в значительной мере обуславливает характер социальных отношений и достигнутый уровень общественного благосостояния. Авторы статьи утверждают, что процесс междисциплинарного исследования его негативных последствий (клинических, демографических, социальных и экономических) осложнен рядом нерешенных методических проблем. В их числе отсутствие общепринятой трактовки природы фактора риска («потребление алкоголя» индивидом в любом объеме или «злоупотребление алкоголем») и негативных последствий потребления алкоголя, а также противоречия в теориях, описывающих механизм их взаимосвязи с фактором риска. Использование специалистами альтернативных подходов к количественной оценке масштаба негативных последствий потребления алкоголя при выполнении научных исследований не позволяет проводить сравнительный анализ их результатов. На основе обзора методов и результатов ряда отечественных и зарубежных клинических, эпидемиологических, социальных и экономических исследований авторы статьи раскрывают содержание основных методических проблем оценки масштаба негативных последствий потребления алкоголя, формулируют пути их решения. Результаты представленного научного обзора, предметом которого являются негативные последствия потребления алкоголя, критический анализ результатов ранее выполненных исследований, а также коррекция мероприятий, реализуемых в рамках государственной политики по снижению масштабов злоупотребления алкоголем и профилактике алкоголизма, могут быть использованы для методического обоснования новых моно- и междисциплинарных исследований.

252

**Ключевые слова:** потребление алкоголя, последствия потребления алкоголя, алкоголь-атрибутивная заболеваемость, алкоголь-атрибутивная смертность, достоверность статистических данных.

(Для цитирования: Мордовский Э.А., Соловьёв А.Г., Санников А.Л. Актуальные методические проблемы оценки масштаба негативных последствий потребления алкоголя и пути их решения. Вестник РАМН. 2018;73(4):252–261. doi: 10.15690/vramn908)

## Актуальность

К началу XXI в. научным сообществом идентифицировано большинство факторов риска состояния индивидуального и популяционного здоровья. Их перечень в целом идентичен в большинстве регионов мира, однако степень влияния того или иного фактора риска значительно варьирует в половозрастных, социальных и этни-

ческих группах населения [1]. Формирование системы знаний о распределении факторов риска в популяции, механизме их воздействия на индивидуальное и популяционное здоровье дало возможность разрабатывать качественно новые программы профилактики с прогнозируемой эффективностью. Как следствие, результаты научных исследований по дисциплине «Общественное здоровье» стали одним из инструментов планирования

E.A. Mordovsky\*, A.G. Soloviev, A.L. Sannikov

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation

## Actual Methodical Problems of the Assessment of Negative Consequences of Alcohol Consumption and Ways to Solve them

Alcohol consumption enters the list of risk factors for the global population health. It determines the nature of social relations and achieved level of public welfare. Authors of the article claim that some unsolved methodological problems complicate the process of interdisciplinary research on various negative consequences of alcohol consumption. The absence of generally approved interpretation of the nature of the risk factor («alcohol consumption» by an individual or «alcohol abuse»), negative consequences of alcohol consumption, and logical contradictions in theories describing the mechanism of their interaction can be indicated among these problems. The use of alternative approaches to the quantitative assessment of the scale of the negative consequences of alcohol consumption (even within the same scientific discipline) does not provide opportunities to perform a comparative analysis of research results. Basing on a review of methods and results of series of clinical, epidemiological, social, and economic studies, the authors systematize and explain the methodological problems of assessing the scale of the alcohol consumption negative consequences, formulate the principles of solutions. The review results can be used for methodological rationalization of new mono- and interdisciplinary studies on negative consequences of alcohol consumption, critical analysis of previous study results, and correction of activities implemented within the government policies aimed to reduce the alcohol abuse and alcoholism prevention. The presented academic review can be used in planning the new activities implemented within the government policy on alleviation of alcohol abuse and prevention of alcoholism.

**Key words:** alcohol consumption; consequences of alcohol consumption; alcohol drinking; alcohol-related morbidity; alcohol-related mortality; reliability of statistical data.

(For citation: Mordovsky EA, Soloviev AG, Sannikov AL. Actual Methodical Problems of the Assessment of Negative Consequences of Alcohol Consumption and Ways to Solve them. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2018;73(4):252–261. doi: 10.15690/vramn908)

государственной демографической и социальной политики.

Потребление алкоголя признано одним из важнейших факторов риска состояния индивидуального и популяционного здоровья [2]. Негативное воздействие чрезмерного потребления алкоголя на организм человека доказано в многочисленных лабораторных и клинических исследованиях и не подвергается сомнению. Опосредованно потребление алкоголя и его суррогатов обуславливает характер социальных отношений и в значительной мере достигнутый уровень общественного благосостояния в стране [3, 4]. Таким образом, изучение механизма и параметров взаимосвязи между потреблением алкоголя (как фактором риска) и его многочисленными негативными исходами актуально не только в медицинских, но и в социальных и экономических науках.

Широкая распространенность потребления алкоголя в глобальной популяции, «универсальность» его разнообразных негативных последствий поддерживают интерес научного сообщества к этой сложной проблеме. Так, отечественная электронная библиотечная система eLIBRARY.ru содержит более 68 000 ссылок на научные публикации, в которых упоминается термин «алкоголь», в том числе более 20 000 — на публикации с термином «потребление алкоголя». Американская национальная медицинская библиотека Pubmed (US National Library of Medicine и National Institutes of Health) индексирует более 840 000 публикаций, содержащих упоминание об алкоголе, в том числе более 90 000 с термином «alcohol consumption» (потребление алкоголя). Вместе с тем процесс междисциплинарного исследования негативных последствий потребления алкоголя осложнен рядом нерешенных методических проблем, что подрывает уверенность в достоверности результатов, полученных в ранее выполненных исследованиях. Наиболее актуальными, по мнению авторов, являются следующие три проблемы. Во-первых, несмотря на значительный объем накопленной информации, научное сообщество так и не определилось с природой «фактора риска»: «потребление алкоголя» индивидом в любых дозах или «злоупотребление алкоголем» (содержание данного термина также не эквивалентно в различных исследованиях). Во-вторых, в профессиональной среде отсутствует единое понимание категории «негативные последствия потребления алкоголя». И, наконец, осложняет ситуацию факт, что базой для проведения научных исследований в указанной сфере (по крайней мере, в общественном здоровье и экономике) остаются преимущественно статистические данные (о производстве и продажах алкогольной продукции, заболеваемости и смертности от так называемых алкоголь-атрибутивных состояний, экономических последствиях потребления алкоголя), достоверность которых подвергается сомнению [5–8]. Указанные методические проблемы не позволяют получать сопоставимые результаты в моно- и междисциплинарных исследованиях, что в свою очередь дает повод скептикам усомниться в актуальности проблемы негативных последствий потребления алкоголя на популяционном уровне и необходимости реализации государственной политики по снижению масштабов злоупотребления алкоголем и профилактике алкоголизма.

Целью работы явился анализ содержания актуальных методических проблем оценки масштаба негативных последствий потребления алкоголя на популяционном уровне. Выполнен обзор результатов отечественных и зарубежных научных исследований, в которых «потребление алкоголя» («злоупотребление алкоголем») вы-

ступало фактором риска состояния индивидуального и популяционного здоровья, с описанием различных негативных (в т.ч. клинических, демографических, социальных и экономических) последствий. Опираясь на собственный опыт изучения темы, авторы формулируют пути решения выделенных методических проблем.

### Определение природы фактора риска

Результаты лабораторных и клинических исследований свидетельствуют о том, что даже минимальные дозы алкоголя независимо от его типа могут изменить ритм биохимических процессов в организме человека, а в случае регулярного употребления (особенно при отягощенном состоянии пациента иными факторами риска) — стать условием развития соматических заболеваний [9–11].

Источником методической проблемы идентификации природы фактора риска (проявляет себя преимущественно в немедицинских исследованиях) является исторический приоритет врачей психиатров-наркологов в исследовании его негативных последствий для состояния психического здоровья человека. Несмотря на отсутствие общепринятой терминологии и классификации последних (что было признано экспертами Всемирной организации здоровья «серьезным препятствием» реализации международных проектов в сфере антиалкогольной политики еще в начале 1950-х годов), «воздействием» в наркологии признано потребление алкоголя в объеме, превышающем так называемую «безопасную дозу» (т.е. в объеме, потребление которого не ассоциировано с риском развития зависимости) [12]. Величина последней измеряется в «стандартных порциях алкоголя», или «алкогольных единицах» (alcohol units, AU), но точно не идентифицирована и варьирует в достаточно широких пределах: 4 AU (40–60 г чистого алкоголя) 5 дней в неделю в любом порядке для мужчин и 2 AU (20–30 г чистого алкоголя) для женщин [2]. К сожалению, указанная концепция не учитывает индивидуальную (гендерную, возрастную, этническую) чувствительность организма к различным типам спиртных напитков. По сути, внедрение в практику термина «безопасная доза алкоголя» было призвано «оправдать» национальные традиции регулярного его употребления в малых дозах.

Потребление алкоголя в объеме, превышающем «безопасную дозу», рассматривается в медико-биологических дисциплинах как «злоупотребление». Так, в действующей в настоящее время Международной классификации заболеваний, болезней, травм и негативных факторов, приводящих к смерти без лечения, 10-го пересмотра (МКБ-10) используется термин «пагубное употребление» (harmful use / alcohol abuse, F10.1), под которым понимается «способ употребления психоактивного вещества <...>, который является причиной физического или психического ущерба здоровью» [13]. В Руководстве по диагностике и статистике психических расстройств 5-го пересмотра (DSM-5) от 2013 г. ранее используемые термины «злоупотребление» (alcohol abuse) и «зависимость» (alcohol dependence) объединены в рубрику «Расстройство, связанное с употреблением психоактивных веществ» (Substance Use Disorder), само определение которой исключает эффект дозы воздействия [14]. Вместе с тем в социальных и экономических исследованиях «злоупотребление алкоголем» или «пагубное употребление алкоголя» как «воздействие» довольно часто ассоциируется не с объемом потребляемых спиртных напитков (или способом их потребления),

а с уже сформированными клиническими исходами — «синдромом зависимости» (dependence syndrome / alcohol dependence, F10.2) или «психотическими расстройствами» (psychotic disorder, F10.5) [4]. Последние, в свою очередь, являются «исходами» собственно «пагубного употребления алкоголя», но в механизме их формирования принимают участие и иные «факторы риска» (социально-экономические условия; результативность национальной политики по снижению масштабов злоупотребления алкоголем и профилактических программ, реализуемых системой здравоохранения, и пр.). К сожалению, перечень сопутствующих «факторов риска» остается неполным, а сила их влияния практически не учитывается в указанных исследованиях.

Таким образом, процесс изучения негативных последствий потребления алкоголя в рамках отдельных научных дисциплин нуждается в унификации подходов к определению природы фактора риска, учитывая необходимость обеспечения сопоставимости результатов, генерируемых в моно- и междисциплинарных исследованиях.

### **Определение категории «негативные последствия потребления алкоголя» и механизма взаимосвязи между потреблением алкоголя («воздействием») и негативными последствиями («исходом»)**

Специалисты Института социологии РАН оценивают степень вовлеченности россиян в потребление алкоголя в начале XXI в. как «чрезвычайно высокую»: «каждый пятый <...> употребляет спиртное <...>, чтобы опьянеть; каждый четвертый <...> периодически бывает в состоянии сильного алкогольного опьянения» [15]. Столь широкое распространение фактора риска в большинстве половозрастных групп населения страны обуславливает универсальный характер его негативных последствий, которые составляют предмет научных исследований в медицине, биологии, социальных и экономических дисциплинах [16]. Вместе с тем междисциплинарный консенсус в вопросе о содержании указанной категории, описании механизма взаимосвязи между «воздействием» и его возможными «исходами» отсутствует, что составляет важную методическую проблему.

Широко используемая в медико-биологических исследованиях четырехкомпонентная классификация негативных последствий потребления алкоголя (обозначаемых термином «вред, связанный с алкоголем», alcohol-related harm) разработана экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [2]. Ее первый компонент («последствия для здоровья лиц, потребляющих алкоголь») образован более чем 200 состояниями (заболеваниями; травмами, полученными в состоянии алкогольного опьянения; отравлениями, а также случаями смерти от них), возникновение которых ассоциировано с потреблением спиртных напитков. «Социально-экономические последствия для лиц, потребляющих алкоголь» (второй компонент) складываются из случаев потери постоянного места работы, прочих источников дохода, проблем в семье, а также связанной с ними низкой доступностью медицинской помощи. К «вреде, связанному с алкоголем» (третий компонент) относят «негативные (социально-экономические, клинические и пр.) последствия для третьих лиц» (членов семьи злоупотребляющего алкоголем), в том числе фетальный алкогольный синдром. «Последствия для общества» (четвертый компонент) определяются как

ущерб для популяционного здоровья, обусловленный указанными выше алкоголь-атрибутивными заболеваниями, а также случаями потери трудоспособности. Следует отметить, что эксперты ВОЗ при составлении Глобальных отчетов об алкоголе (Global status report on alcohol) уделяют основное внимание идентификации и количественной оценке медико-демографических потерь от фактора риска. Негативные социальные и экономические последствия из-за дефицита фактических данных детально не анализируются.

В России при проведении эпидемиологических исследований довольно часто используется принцип группировки «алкогольных потерь», предложенный А. Немцовым и соавт. [17, 18]. Многочисленные «исходы» употребления алкоголя («воздействия») предлагаются стратифицировать на «прямые алкогольные потери», которые «непосредственно» связаны с фактором риска (например, случаи заболеваний или летальных исходов от ряда «алкогольных» состояний, в т.ч. суициды преднамеренные и непреднамеренные; бытовые и криминальные травмы, произошедшие в состоянии алкогольного опьянения), и «непрямые алкогольные потери», в развитии которых «алкоголь является не единственным, но ведущим или очень важным фактором» [18]. Отметим, что перечень «алкогольных» состояний авторами метода точно не идентифицирован и продолжает пополняться при обнаружении достоверной статистической взаимосвязи между их инцидентностью и объемом оптовых или розничных продаж спиртосодержащей продукции. Способ стратификации «алкогольных потерь» на «прямые» и «косвенные» принят рядом других исследователей. Вместе с тем механизм взаимосвязи между «воздействием» (природа которого различная) и «исходами» ими, как правило, не раскрывается, а классификации последних содержат ряд существенных отличий, в отдельных случаях — противоречий.

В социальных и экономических дисциплинах медицинские последствия потребления алкоголя остаются популярным объектом исследований. Их результаты, в целом, свидетельствуют об игнорировании специалистами проблемы идентификации типа взаимосвязи между фактором риска и предполагаемым «исходом» (табл.). Оригинальная классификация негативных последствий фактора риска предложена авторами доклада Общественной палаты Российской Федерации «Злоупотребление алкоголем в Российской Федерации: социально-экономические последствия и меры противодействия» (обратим внимание, что «воздействием», или «фактором риска», признано «злоупотребление алкоголем», т.е. уже сформированный синдром зависимости) [20]. Она в значительной мере отличается от аналогов, используемых в медико-биологических дисциплинах, прежде всего тем, что ряд компонентов (например, «деградация социальной и духовно-нравственной среды», в т.ч. «преступность, насилие в семьях и разводы, утрата родительских функций и сиротство» или «разрушение человеческого потенциала») носит довольно абстрактный характер и практически не поддается количественной оценке. В методе, предложенном С. Игумновым и соавт., «воздействием» является не только «злоупотребление алкоголем» (под которым авторы понимают, скорее, объем потребления спиртных напитков), но и «пьянство», соотносимое с диагностическими рубриками МКБ-10 «алкогольная зависимость» и «употребление алкоголя с вредными последствиями» [21]. В результате, содержание категории «последствия (зло-)употребления алкоголем» (авторы

Таблица. Характеристика факторов риска, негативных последствий потребления алкоголя и типа взаимосвязи между ними в некоторых классификациях

Источник классификации	«Воздействие»*	Тип взаимосвязи между «Воздействием» и «Исходом»	«Исход»**
<i>Медико-биологические исследования</i>			
Всемирная организация здравоохранения [2]	Потребление алкоголя в любом объеме (в отношении последствий для здоровья лиц, потребляющих алкоголь). Потребление алкоголя, злоупотребление алкоголем (в отношении социально-экономических последствий для лиц, потребляющих алкоголь)	Прямая и/или опосредованная (косвенная) взаимосвязь	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Последствия для здоровья лиц, потребляющих алкоголь (случаи алкоголь-атрибутивных заболеваний / травм / отравлений и смерти от них)</li> <li>• Социально-экономические последствия для лиц, потребляющих алкоголь</li> <li>• Последствия для третьих лиц</li> <li>• Последствия для общества</li> </ul>
Метод Е. Кошкиной и соавт. [16]	«Злоупотребление алкоголем» / «алкогольная зависимость»	В отношении медицинских и социальных потерь — не идентифицирован. В отношении экономических потерь — «прямая» и «непрямая»	<ul style="list-style-type: none"> <li>• «Соматическая патология у больных с алкогольной зависимостью» (алкогольный гепатит, алкогольный цирроз печени, &lt;...&gt; болезни сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта и пр.)</li> <li>• «Расстройства личности»</li> <li>• «Смертность, обусловленная употреблением алкоголя»</li> <li>• «Социальный ущерб» в форме «преступлений, связанных с алкогольным опьянением, и дорожно-транспортных происшествий, совершенных в опьянении» и «явления детской беспризорности и безнадзорности»</li> <li>• «Экономические потери и вынужденные прямые затраты»</li> <li>• «Потери неимущественного характера» («непрямые» и «прямые» затраты)</li> </ul>
Метод А. Немцова и соавт. [17, 18]	«Употребление алкоголя»	«Прямые алкогольные потери» <...> «непосредственно связаны с употреблением алкоголя». «Непрямые алкогольные потери» — «алкоголь является не единственным, но ведущим или очень важным фактором»	<ul style="list-style-type: none"> <li>• «Прямые алкогольные потери»: — заболеваемость и смертность от ряда («алкогольных») состояний, в т.ч. суициды преднамеренные и непреднамеренные; бытовые и криминальные травмы</li> <li>• «Непрямые алкогольные потери»: — заболеваемость и смертность от ряда («алкогольных») состояний, в механизме развития которых «алкоголь является не единственным, но ведущим или очень важным фактором»</li> </ul>
Метод Е. Кошкиной и соавт. [19]	«Алкоголизм»		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Проблемы для пьющего, включая последствия разового неумеренного потребления алкоголя, повышенный риск развития ряда заболеваний, недостаточность питания, потеря трудоспособности, преждевременная смерть</li> <li>• Проблемы для семьи пьющего, в т.ч. материальные трудности, внутрисемейное поражение плода, педагогическая запущенность детей, юношеский алкоголизм и преступность</li> <li>• Проблемы для общества (нарушение общественного порядка, дорожно-транспортные происшествия, несчастные случаи, снижение производительности труда и пр.)</li> </ul>

Таблица. Характеристика факторов риска, негативных последствий потребления алкоголя и типа взаимосвязи между ними в некоторых классификациях (Ожонание)

Источник классификации	«Воздействие»*	Тип взаимосвязи между «Воздействием» и «Исходом»	«Исход»**
<i>Социальные и экономические исследования</i>			
Метод А. Дёмина и соавт. [20]	«Злоупотребление алкоголем»	Не идентифицирован	<ul style="list-style-type: none"> <li>• «Демографические, социальные и экономические последствия злоупотребления алкоголем»:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>— «избыточная смертность, снижение продолжительности жизни и потери здоровья»</li> <li>— «деградация социальной и духовно-нравственной среды» (преступность, насилие в семьях и разводы, утрата родительских функций и сиротство, снижение рождаемости, алкоголизация подростков и женщин)</li> <li>— «экономические потери»</li> <li>— «разрушение человеческого потенциала»</li> </ul> </li> </ul>
Метод С. Игумнова и соавт. [21]	«Злоупотребление алкоголем», «Пьянство», «алкоголизм» («алкогольная зависимость» и «употребление алкоголя с вредными последствиями» по МКБ-10)	«Прямой» и «косвенный»	<ul style="list-style-type: none"> <li>• «Социально-экономические последствия потребления алкоголя»: прямые и косвенные макро- и микроэкономические затраты, возникающие вследствие:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>— явления, обусловленных способом потребления алкоголя («злоупотреблением алкоголем»)</li> <li>— клинических состояний («пьянство и алкоголизм», «металкогольные заболевания»)</li> <li>— ряда «социальных» последствий</li> </ul> </li> </ul>
Метод А. Соловьёва [22]	«Производство и оборот алкогольной продукции»	Не идентифицирован	<ul style="list-style-type: none"> <li>• «Смертность и уменьшение продолжительности жизни»:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>— убийства и самоубийства, дорожно-транспортные происшествия, алкоголизация населения, проблема брошенных детей, разводы, лечение от злоупотребления алкоголем, экономический ущерб от нелегального производства и фальсификации продукции</li> </ul> </li> <li>• «Другие социальные последствия»:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>— насилие в семьях, разводы, проблема брошенных детей, &lt;...&gt;</li> <li>— болезни матерей и перинатальные состояния, сахарный диабет, рак, психоневрологические расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, цирроз печени, неумышленные и умышленные травмы</li> </ul> </li> </ul>
Метод Н. Лебелевой-Несвери и соавт. [23]	«Алкоголизм» / «злоупотребление алкоголем»	Не идентифицирован	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ущербы, вызванные преждевременной смертностью населения (в т.ч. населения трудоспособного возраста) от злоупотребления алкоголем</li> <li>• Ущербы, вызванные неловыпуском продукции в результате вовлечения населения в алкоголизм</li> <li>• Реальный и потенциальный ущерб от противоправных действий потребителей психоактивных веществ, в т.ч. состоящих на профилактическом учете</li> <li>• Расходы на лечение больных наркотическими расстройствами</li> <li>• Расходы на профилактические программы, реализуемые с целью противодействия распространению алкоголизма</li> </ul>

Примечание. «Воздействие»\* — факторы риска развития негативных последствий потребления алкоголя; «Исход»\*\* — негативные последствия потребления алкоголя.

используют также термины «общая величина потерь», «социально-экономические последствия») и классификация самих последствий довольно противоречивые. Более того, в механизме развития некоторых, как предполагается, алкоголь-обусловленных процессов и явлений нельзя исключить решающее влияние третьих причин (прежде всего употребление иных, в т.ч. наркотических, веществ). Соответственно, применение на практике данного метода классификации негативных последствий фактора риска может дать искаженные оценки их масштаба и распределения в популяции.

Таким образом, в биологии и медицине негативные последствия потребления алкоголя рассматриваются преимущественно как результат воздействия фактора риска («потребления алкоголя» или «злоупотребления алкоголем») на состояние индивидуального и популяционного здоровья по принципу «прямой» или «опосредованной» взаимосвязи. Иные (социальные, экономические и пр.) последствия если и анализируются, то как «косвенные» по отношению к ущербу, нанесенному здоровью. В социальных и экономических дисциплинах природе фактора риска и механизму его взаимосвязи с негативными исходами уделяется значительно меньше внимания, либо они вовсе не учитываются. Противоречия между имеющимися классификациями последствий потребления алкоголя обусловлены преимущественно «смещением» при их разработке природы «воздействия» («потребление алкоголя» в минимальной дозе и «злоупотребление алкоголем» в форме алкогольной зависимости или употребления алкоголя с вредными последствиями).

#### **Определение метода оценки взаимосвязи между потреблением алкоголя и его негативными последствиями и выбор источника данных**

Разнообразие негативных последствий потребления алкоголя обуславливает необходимость применения различных методов оценки их масштаба и параметров распределения в популяции. Однако, несмотря на высокую практическую значимость этой задачи (особенно принимая во внимание цели реализуемой государственной политики по снижению масштабов злоупотребления алкоголем и профилактике алкоголизма [24], научно обоснованный междисциплинарный подход к ее решению до настоящего времени не разработан. Как следствие, результаты многочисленных отечественных и зарубежных медицинских, социальных, экономических исследований в указанном направлении остаются практически несопоставимыми [3, 5]. Косвенно этот тезис подтверждается содержанием упомянутых выше Глобальных отчетов по алкоголю ВОЗ (2011; 2014) и Доклада Общественной палаты России (2013), которые, по сути, представляют собой несистематизированные обзоры публикаций. Наиболее критично данная методическая проблема проявляет себя в эпидемиологии.

Как известно, современная эпидемиология, помимо решения сугубо практических задач («поиска детерминант событий и состояний, относящихся к здоровью»), формирует методологию исследований процессов на популяционном уровне [25]. Перечень методов (дизайнов) эпидемиологических исследований достаточно широк, и в специальной литературе можно найти примеры использования большинства из них при изучении количественных характеристик ущерба от потребления алкоголя. Вместе с тем подходы отечественных и зару-

бежных специалистов к решению этой задачи заметно отличаются. В этом можно убедиться, выполнив обзорный анализ научных публикаций по указанной теме, индексированных в международных и национальных поисковых системах. Так, за рубежом оценка параметров взаимосвязи (относительного риска, отношения шансов) между потреблением алкоголя и его негативными последствиями для популяционного здоровья реализуется преимущественно в рамках исследований, основанных на индивидуальных данных, например когортных исследованиях, исследованиях по типу «случай-контроль». Их результаты, в свою очередь, суммируются в систематических и несистематических обзорах [2]. В России, напротив, многоцентровые исследования, основанные на индивидуальных данных, выполняются достаточно редко. Отечественные специалисты оценивают взаимосвязь между потреблением алкоголя и его негативными последствиями преимущественно в рамках «экологических» исследований и исследований «статуса здоровья», базой которых являются популяционные статистические данные. Все исследования объединяет поиск математико-статистической взаимосвязи (преимущественно с использованием процедуры анализа временных рядов) между объемом воздействия фактора риска (чаще всего это данные о розничных продажах алкогольной продукции) и частотой встречаемости (инцидентности) того или иного состояния. Предполагается, что наличие статистической взаимосвязи в динамике за несколько лет косвенно «доказывает» алкогольную этиологию инцидентности.

В рамках данного обзора не ставилась задача раскрыть положительные и отрицательные стороны отдельных методов эпидемиологических исследований в указанных двух группах (для этого можно обратиться к специальной литературе). Отметим лишь тот факт, что степень достоверности получаемых с их помощью результатов в значительной степени зависит от качества первичных данных. В «экологических» исследованиях, исследованиях статуса здоровья его контроль, как правило, невозможен [25].

Обратим внимание, что статистические данные представляют собой весьма удобную базу для проведения научных исследований: финансовые и временные издержки на их сбор и анализ минимальные. Учитывая широкий функционал современных программных комплексов (SPSS, STATA, STATISTICA и пр.), у специалиста практически всегда имеется возможность подобрать такую методику статистического анализа, которая позволит получить статистически значимые и самое важное — желаемые результаты. Вопросы их достоверности и практической значимости достаточно редко поднимаются в научной литературе.

Рассмотрим проблему использования статистических данных для оценки параметров взаимосвязи между потреблением алкоголя («воздействием») и его негативными последствиями («исходами») с позиции эпидемиологии. Во-первых, следует отметить тот факт, что статистики потребления алкогольной и спиртосодержащей продукции в России (а также в других странах) не существует (как нет и валидных для российской популяции методов точной оценки объема индивидуального потребления спиртных напитков). Вместо них специалисты оперируют данными по производству и продажам алкогольной продукции Федеральной службы государственной статистики (Росстат) или (что еще крайне редко) Федеральной службы по регулированию алко-

гольного рынка (Росалкогольрегулирование). Росстат вплоть до 2017 года учитывал производство этилового спирта и спиртосодержащей продукции (сведения подавались организациями через статистическую Форму № 1-алкоголь «Сведения о производстве и отгрузке этилового спирта, спиртосодержащей, алкогольной продукции и розливе алкогольной продукции»); оптовые продажи алкогольной продукции (Форма № 1-алкоголь (опт) «Сведения об оптовой продаже алкогольной продукции») и розничные продажи алкогольной продукции (Форма № 1-учет «Учет объема розничной продажи алкогольной продукции»). В последнее десятилетие все указанные статистические формы, а также порядок заполнения и предоставления в Росстат менялись практически ежегодно. Как следствие, качество генерируемой на их основе информации вполне справедливо подвергается сомнению. Однако проблема не ограничивается лишь отсутствием возможности строить временные ряды ввиду частичной несопоставимости строк статформ. Основной причиной низкой достоверности статистической информации следует считать намеренные и непреднамеренные ошибки в оформлении учетной документации, которые было невозможно исключить ни на этапе производства, ни при оптовой или розничной продаже алкогольной продукции [26].

258

К основным источникам искажения статистической информации об объеме производства этилового спирта и спиртосодержащей продукции можно отнести не учитываемый Федеральной таможенной службой легальный импорт алкоголя для личного потребления граждан (при осуществлении ими заграничных поездок), а также производство контрафактной (с незаконно размещенным товарным знаком), фальсифицированной (умышленно измененной, подделанной, имеющей скрытые свойства и качество) и суррогатной спиртосодержащей продукции. По некоторым оценкам, в 2000-е годы объем такого «неучтенного» алкоголя в России достигал 20–40% от общего оборота [27]. Главный нарколог Министерства здравоохранения Е. Брюн отмечал, что объем потребляемого россиянами нелегального алкоголя в принципе невозможно определить [28]. Именно по этой причине данные по производству этилового спирта и спиртосодержащей продукции достаточно редко используются специалистами при оценке масштаба негативных последствий фактора риска (несмотря на тот факт, что Форма № 1-алкоголь — наиболее подробная и позволяет учитывать производство около 30 видов алкогольных напитков).

Источники искажения статистической информации Росстата об оптовых и розничных продажах алкоголя также хорошо известны. В основном это были непреднамеренные ошибки учета, которые возникали вследствие особенностей организации самой системы сбора первичных данных. До внедрения Единой государственной автоматизированной информационной системы учета объема производства и оборота этилового спирта, алкогольной и спиртосодержащей продукции (ЕГАИС) в большинстве торговых предприятий существовал лишь «суммовой» учет реализованной спиртосодержащей продукции: бухгалтерской службой контролировалась стоимость поступившего на реализацию и реализованного алкоголя, и уже на основе этих данных ретроспективно рассчитывался его объем. В дальнейшем именно эти «вторичные» по своей природе сведения (далеко не всегда соответствовавшие действительности) поступали в Росстат. Следует также отметить, что в указанном федеральном статистическом

наблюдении участвовали не все торговые организации, а лишь их репрезентативная выборка. Более того, как таковая ответственность за качество поданных сведений в Росстат практически отсутствовала: административным штрафом каралось только нарушение сроков предоставления статистических данных. В целом, только полномасштабное внедрение ЕГАИС (которое планировалось с 01.07.2017 г., когда к системе должны были быть подключены организации, реализующие алкоголь в сельских поселениях с численностью населения менее 3000 человек) позволит получать достоверные сведения о производстве и реализации алкогольной продукции в стране (хотя полностью исключить возможность производства и реализации контрафакта и фальсификата, вероятно, невозможно). Однако и в этом случае возникнет проблема сопоставимости данных Росалкогольрегулирования и Росстата, так как применяемые ведомствами коды алкогольных напитков в статистических формах отличаются.

Во-вторых, статистические данные о клинических (алкоголь-атрибутивная заболеваемость) и демографических (алкоголь-атрибутивная смертность) исходах потребления алкоголя, формируемые Росстатом, региональными медицинскими информационно-аналитическими центрами или бюро медицинской статистики, также искажены. В выполненном ранее авторами данной статьи исследовании были выявлены многочисленные ошибки в организации межучрежденческого документооборота в системе здравоохранения, ведущие к количественному недоучету так называемых алкоголь-атрибутивных причин смерти и качественной трансформации структуры алкоголь-атрибутивной смертности [5]. Ошибки имеют место при переносе данных из одних учетных форм в другие (в т.ч. в Медицинские свидетельства о смерти по форме 106/у-08, на основе которых генерируется статистическая информация о смертности населения). Оба явления актуальны для ситуации, когда проведено как патологоанатомическое, так и судебно-медицинское исследование (экспертиза) трупа умершего, и, как правило, являются непреднамеренными. Также доказано, что статистические данные о случаях смерти от острых отравлений этанолом (или суррогатами этанола), которые ранее считались наиболее точными вследствие обязательного выполнения судебно-медицинской экспертизы, искажены, преимущественно вследствие предоставления уточненных форм медицинских свидетельств о смерти («окончательное взамен предварительного» и «окончательное взамен окончательного») позднее сроков оформления квартальных и годовых статистических отчетов. Необходимо отметить, что проблема низкого качества статистических данных о здоровье населения (в т.ч. о заболеваемости и смертности) признана не только научным сообществом, но и на уровне федерального Министерства здравоохранения (см. Письмо заместителя министра № 13-2/10/2-4396 от 18.07.2016 «О совершенствовании службы статистики») [29].

Суммируя обозначенные выше факты, следует признать, что степень искажения статистических данных о розничных продажах алкогольной продукции (которые заменяют специалистам информацию о потреблении алкоголя) и его негативных клинических и демографических последствиях («воздействиях» и «исходах» с позиции эпидемиологии) в масштабе страны в целом неизвестна (малоизученными остаются и факторы, ее определяющие). Вместе с тем в исследованиях, опирающихся на построение моделей временных рядов для оценки

взаимосвязи между «воздействием» и возможными «исходами» (напомним, что в настоящее время именно этот подход чаще всего используется для решения указанной задачи), данные параметры являются критически важными. Такие модели демонстрируют эффективность и позволяют делать достоверный прогноз масштаба негативных «исходов» только в том случае, если исходные данные собраны за достаточно длительный (десяtkи лет) промежуток времени. Однако, невозможно представить, что в течение столь длительного срока факторы, снижающие степень достоверности статистических данных, действовали с одинаковой силой, и степень их искажения оставалась постоянной. Соответственно, слишком высока вероятность того, что обнаруженная ранее исследователями математическая взаимосвязь между объемами «воздействия» и «исходов» является случайной, обусловленной не вариацией их масштаба, а вариацией в динамике силы влияния факторов, искажающих статистические данные. По крайней мере, попыток доказать обратное специалисты ранее не предпринимали. В этой связи не кажутся удивительными очевидные противоречия в результатах ряда эпидемиологических исследований: Россия, где объем среднего подушевого потребления алкоголя далеко не самый высокий, и проживает всего около 2% населения Земли, якобы «ответственна» за 20% масштаба глобальной алкоголь-атрибутивной смертности [2].

### Пути решения методических проблем оценки масштаба негативных последствий потребления алкоголя

Опираясь на собственный опыт изучения негативных последствий потребления алкоголя, авторы предлагают следующие пути решения обозначенных в данной статье методических проблем количественной оценки их масштаба.

Во-первых, в дальнейшем при проведении моно- и междисциплинарных исследований в качестве «первичного» фактора риска (с позиции эпидемиологии — «воздействия»), ассоциированного с более высокой вероятностью развития большей части негативных последствий (медицинских, в т.ч. травм, полученных в состоянии алкогольного опьянения; демографических, социальных и экономических) на индивидуальном и популяционном уровнях, следует считать факт потребления алкоголя индивидом в любом объеме. Клинический подход к определению фактора риска (потребление алкоголя в объеме, превышающем условную «безопасную дозу») является уместным только в отношении таких медицинских последствий, как алкоголь-атрибутивные психические и поведенческие расстройства, а также соматические заболевания (например, алкогольная кардиомиопатия, алкогольная болезнь печени и т.д.). В то же время указанные алкоголь-атрибутивные заболевания можно считать самостоятельным фактором риска формирования ряда иных «вторичных» по своей природе медицинских (клинических), демографических, социальных и экономических последствий. Использование категории «злоупотребление алкоголем» в качестве фактора риска при планировании исследований следует считать нецелесообразным ввиду неопределенности ее трактовки в разных научных дисциплинах.

Во-вторых, количественная оценка параметров механизма взаимосвязи между потреблением алкоголя («воздействием» / «фактором риска») и его разнообразными негативными «исходами» должна строиться исключительно

но на принципах современной эпидемиологии. Так, при планировании исследований следует исходить из того, что потребление алкоголя («первичный» фактор риска), а также ассоциированные с ним алкоголь-атрибутивные соматические заболевания, психические и поведенческие расстройства (которые одновременно являются «исходами» по отношению к потреблению алкоголя и самостоятельными «факторами риска» по отношению к прочим негативным последствиям) лишь изменяют (повышают или снижают) вероятность наступления тех или иных «исходов». Мерами взаимосвязи между «воздействием(-ями)» и «исходами» на популяционном уровне следует считать «риск» («вероятность») и популяционную алкоголь-атрибутивную фракцию — долю инцидентности «исхода» в изучаемой популяции, соотношенной с воздействием фактора риска. Использование таких категорий, как «причина» и «следствие», не является уместным в научных исследованиях, поскольку в механизме формирования негативных последствий потребления алкоголя (под которыми следует понимать уменьшение потенциала популяционного здоровья, социального и экономического благополучия, ассоциированного с данным фактором риска) вовлечены и другие факторы риска. Усилия профессионального сообщества должны быть направлены на их идентификацию и оценку параметров взаимосвязи между ними и возможными исходами. Решение указанной задачи должно предварять построение междисциплинарной классификации последних.

В-третьих, в медико-биологических исследованиях, организованных с целью количественной оценки параметров взаимосвязи между потреблением алкоголя и его негативными последствиями, следует использовать методы, основанные на анализе индивидуальных данных — проспективные и ретроспективные когортные исследования, исследования по типу «случай-контроль». Именно их результаты должны стать источником информации для оценки значения популяционной алкоголь-атрибутивной фракции. Поиск оптимальных методов оценки взаимосвязи между объемом потребления алкоголя индивидами («первичным фактором риска») и/или ассоциированными с ним алкоголь-атрибутивными соматическими заболеваниями, психическими и поведенческими расстройствами («вторичный фактор риска»), с одной стороны, и их негативными социальными, экономическими последствиями, с другой, должен вестись в рамках соответствующих научных дисциплин. Целесообразность разработки «универсального» междисциплинарного метода решения этой задачи очевидна, но в настоящее время он отсутствует.

### Заключение

Подводя итог, отметим, что в настоящее время достоверная оценка масштаба негативных последствий потребления алкоголя, параметров их распределения в половозрастных, социальных и этнических группах населения отсутствует ввиду наличия ряда нерешенных методических проблем. В статье приведены положения, которые, по мнению авторов, позволят в перспективе построить междисциплинарную теоретическую модель механизма взаимосвязи между потреблением алкоголя и его разнообразными негативными исходами. Учитывая задачи реализуемой в нашей стране государственной политики по снижению масштабов злоупотребления алкоголем и профилактике алкоголизма, предполагаемая модель даст возможность осуществлять прогнозирование пара-

метров распределения в популяции негативных медицинских (клинических), демографических, социальных и экономических последствий потребления алкоголя и, соответственно, более эффективно распределять между профильными службами, государственными целевыми программами ограниченные общественные ресурсы.

### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

### Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа по подготовке статьи проведена на личные средства авторского коллектива.

### Конфликт интересов

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

### ЛИТЕРАТУРА

1. Institute for Health Metrics and Evaluation. *The global burden of disease: generating evidence, guiding policy*. Seattle, WA: IHME; 2013.
2. World Health Organization. Department of Mental Health and Substance Abuse. *Global status report on alcohol and health 2014*. Geneva: World Health Organization; 2014.
3. Соловьев А.Г., Мордовский Э.А., Санников А.Л. Количественная оценка совокупного ущерба от злоупотребления алкоголем на популяционном уровне // *Наркология*. — 2016. — Т.15. — №1 — С. 16–32. [Soloviev AG, Mordovsky EA, Sannikov AL. Quantitative assessment of cumulative damage from alcohol abuse at population level. *Narkologiya*. 2016;15(1):16–32. (In Russ).]
4. Одинокова В.А. Теоретическое и эмпирическое определение проблемного потребления алкоголя // *Теория и практика общественного развития*. — 2014. — №10 — С. 59–63. [Odiokova VA. Theoretical and empirical definition of problematic alcohol consumption. *Teoriya i praktika obshchestvennogo razvitiya*. 2014;(10):59–63. (In Russ).]
5. Соловьев А.Г., Вязмин А.М., Мордовский Э.А., и др. Анализ достоверности статистики смертности по причинам на примере случаев смерти от алкоголь-атрибутивных состояний // *Вопросы наркологии*. — 2014. — №6 — С. 10–26. [Soloviev AG, Vyazmin AM, Mordovsky EA, et al. Analysis of reliability of statistics on mortality by cause by example of deaths from alcohol-attributable conditions. *Voprosy narkologii*. 2014;(6):10–26. (In Russ).]
6. Чеченин Г.И., Жилина Н.М., Дуреев В.Н., Крипальский Л.Н. Проблемы достоверности медико-статистических данных о смертности и общей заболеваемости населения по компьютерным базам данных // *Социальные аспекты здоровья населения*. — 2016. — Т.52. — №6 — С. 1. [Chechenin GI, Zhilina NM, Dureev VN, et al. Problems related to validity of population mortality and morbidity statistics in computer databases. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya*. 2016;52(6):1. (In Russ).]
7. Иванова А.Е., Сабгайда Т.П., Семенова В.Г., и др. Факторы искажения структуры причин смерти трудоспособного населения России // *Социальные аспекты здоровья населения*. — 2013. — Т.32. — №4 — С. 1. [Ivanova AE, Sabgayda TP, Semenova VG, et al. Factors distorting death causes structure in working population in Russia. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya*. 2013;32(4):1. (In Russ).]
8. Кошкина Е.А., Павловская Н.И., Вышинский К.В., и др. Оценка характера и масштабов потребления неучтенного алкоголя в некоторых областях средней полосы России // *Наркология*. — 2013. — Т.12. — №8 — С. 28–36. [Koshkina EA, Pavlovskaya NI, Vyshinski KV, et al. Evaluation of the character and size of illegal alcohol consumption in some regions of middle Russia. *Narkologiya*. 2013;12(8):28–36. (In Russ).]
9. Mokdad AH, Forouzanfar MH, Daoud F, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016;387(10036):2383–2401. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00648-6.
10. Колоснищина М.Г., Хоркина Н.А., Волков А.Ю. Влияние мер алкогольной политики на динамику дорожно-транспортных происшествий в регионах России // *Вопросы статистики*. — 2016. — №5 — С. 50–62. [Koloslitsyna MG, Khorkina NA, Volkov AYU. Influence of alcohol policy on the dynamics of road accidents in Russian regions. *Voprosy statistiki*. 2016;(5):50–62. (In Russ).]
11. Brenn T. The Tromsø heart study: alcoholic beverages and coronary risk factors. *J Epidemiol Community Health*. 1986;40(3):249–256. doi: 10.1136/jech.40.3.249.
12. emedmd.com [Internet]. Alcohol Dependence and Alcohol Problems [cited 2017 Sep 15]. Available from: <http://emedmd.com/content/alcohol-dependence-and-alcohol-problems>.
13. cdc.gov [Internet]. International Classification of Diseases, Tenth Revision, Clinical Modification (ICD-10-CM) [cited 2017 Sep 15]. Available from: <https://www.cdc.gov/nchs/icd/icd10cm.htm>.
14. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* [Internet]. 5th ed.. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013 [cited 2017 Sept 15]. Available from: <https://www.psychiatry.org/psychiatrists/practice/dsm>.
15. Позднякова М.Е., Заиграев Г.Г., Рыбакова Л.Н., и др. Потребление алкоголя в России. Социологический анализ // *Информационно-аналитический бюллетень Института социологии Российской академии наук*. — 2011. — №1 — С. 4–102. [Pozdnyakova ME, Zaigraev GG, Rybakova LN, et al. Potreblenie alkogolya v Rossii. Sotsiologicheskii analiz. *Informatsionno-analiticheskii byulleten' Instituta sotsiologii Rossiiskoi akademii nauk*. 2011;(1):4–102. (In Russ).]
16. Кошкина Е.А., Павловская Н.И., Ягудина Р.И., и др. Медико-социальные и экономические последствия злоупотребления алкоголем в России // *Социальные аспекты здоровья населения*. — 2010. — Т.14. — №2 — С. 3. [Koshkina EA, Pavlovskaya NI, Yagudina RI, et al. Health and social and also economic consequences of alcohol abuse in the Russian Federation. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya*. 2010;14(2):3. (In Russ).]
17. Немцов А.В. Алкогольная смертность в России и пути снижения алкогольных потерь / Всероссийская научно-практическая конференция «Демографические перспективы России и задачи демографической политики»; Апрель 6–8, 2010; Москва. [Nemtsov AV. Alkogol'naya smertnost' v Rossii i puti snizheniya alkogol'nykh poter'. (Conference proceedings) Vserossiiskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Demograficheskie perspektivy Rossii i zadachi demograficheskoi politiki»; 2010 apr 6–8; Moscow. (In Russ).]
18. Немцов А.В., Школьников В.М. Потери в связи с алкогольной смертностью в России в 1980-х–1990-х годах // *Новости науки и техники. Серия: Медицина. Алкогольная болезнь*. — 1999. —

- №5 — С. 1–15. [Nemtsov AV, Shkolnikov VM. Losses due to alcohol mortality in Russia in the 1980s–1990s. *Novosti nauki i tekhniki. Seriya: Meditsina. Alkogolnaya bolezni*. 1999;(5):1–15. (In Russ).]
19. Кошкина Е.А., Спектор Ш.И., Сенцов В.Г., Богданов С.И. *Медицинские, социальные и экономические последствия наркомании и алкоголизма*. — М.: Пер Сэ; 2008. — 288 с. [Koshkina EA, Spektor ShI, Sentsov VG, Bogdanov SI. *Meditsinskie, sotsial'nye i ekonomicheskie posledstviya narkomanii i algokolizma*. Moscow: Per Se; 2008. 288 p. (In Russ).]
  20. *Злоупотребление алкоголем в Российской Федерации: социально-экономические последствия и меры противодействия*. Доклад Общественной палаты Российской Федерации. — М.; 2009. — 84 с. [*Zloupotreblenie algokolem v Rossiiskoi Federatsii: sotsial'no-ekonomicheskie posledstviya i mery protivodeistviya*. Doklad Obshchestvennoi Palaty Rossiiskoi Federatsii. Moscow; 2009. 84 p. (In Russ).]
  21. Игумнов С.А., Петрович М.В., Осипчик С.И. Социально-экономические последствия потребления алкоголя в Республике Беларусь // *Проблемы управления (Минск)*. — 2011. — №3 — С. 104–115. [Igumnov SA, Petrovich MV, Osipchik SI. Social and economic consequences of consumption of alcohol in the Republic of Belarus. *Problemy upravleniya (Minsk)*. 2011;(3):104–115. (In Russ).]
  22. Соловьев А.М. Социальные последствия потребления алкогольной продукции в России // *Экономический анализ: теория и практика*. — 2010. — №31 — С. 58–63. [Soloviev AM. Sotsialnye posledstviya potrebleniya algokolnoi produktsii v Rossii. *Ekonomicheskii analiz: teoriya i praktika*. 2010;(31):104–115. (In Russ).]
  23. Лебедева-Несевря Н.А., Алексеев В.Б., Зайцева Н.В., Кирьянов Д.А. Социально-экономические последствия алкоголизма в Пермском крае // *Здоровье населения и среда обитания*. — 2011. — №10 — С. 19–21. [Lebedeva-Nesevrya NA, Alekseev VB, Zaitseva NV, Kiryanov DA. Socio-economic consequences of alcoholism in Perm region. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2011;(10):19–21. (In Russ).]
  24. Распоряжение Правительства Российской Федерации № 2128-р от 30 декабря 2009 г. «Концепция реализации государственной политики по снижению масштабов злоупотребления алкогольной продукцией и профилактике алкоголизма среди населения Российской Федерации на период до 2020 года». [Order of the Government of the Russian Federation № 2128-р «*Kontsepsiya realizatsii gosudarstvennoi politiki po snizheniyu masshtabov zloupotrebleniya algokol'noi produktsiei i profilaktike algokolizma sredi naseleniya Rossiiskoi Federatsii na period do 2020 goda*» dated 30 December 2009. (In Russ).] Доступно по: [http://fsrar.ru/policy\\_of\\_sobriety/konceptcia](http://fsrar.ru/policy_of_sobriety/konceptcia). Ссылка активна на 15.06.2018.
  25. Szkló M, Nieto FJ. *Epidemiology: beyond the basics*. 3rd ed. Burlington, Mass: Jones & Bartlett Learning; 2012. 515 p.
  26. Ишак Е.Р., Худякова О.Д. Проблемы законодательного регулирования оборота алкогольной продукции в субъектах Российской Федерации // *Проблемы современной экономики*. — 2013. — №2 — С. 77–79. [Ishchak ER, Khudiakova OD. To the issue of legislative regulation of alcoholic production turnover in the subjects of the Russian Federation. *Problemy sovremennoi ekonomiki*. 2013;(2):77–79. (In Russ).]
  27. Пузырев Д. Росалкоголь поспорил с Росстатом о контрафактном алкоголе // *РБК daily. Ежедневная деловая газета* [интернет]. 04.04.2012:[1 стр.]. [Puzyrev D. Rosalkogol' posporil s Rosstatom o kontrafaktnom algokole. *RBK daily. Ezhednevnyaya delovaya gazeta*. 2012 Apr:[about 1 p.] (In Russ).] Доступ по ссылке: <http://www.cifra.info/upload/iblock/dfd/ivc%20daily%20-%20cwiuwp%20hhejilg%20ucl%20o%20qlbdpk%20c%20t%20tmbp.pdf>. Ссылка активна на 18.04.2018.
  28. Иванов А. Можно ли верить Росстату, что россияне стали меньше пить? // *Биржевой лидер* [интернет]. 16.10.2016:[1 стр.]. [Ivanov A. Mozhno li verit' Rosstatu, chto rossiyane stali men'she pit'? *Birzhevoi lider*. 2016 Aug:[about 1 p.] (In Russ).] Доступ по ссылке <http://www.profi-forex.org/novosti-rossii/entry1008299973.html>. Ссылка активна на 18.04.2018.
  29. Письмо заместителя министра здравоохранения № 13-2/10/2-4396 от 18.07.2016 «О совершенствовании службы статистики». [Pismo zamestitelya ministra zdravookhraneniya № 13-2/10/2-4396 «*O sovershenstvovanii sluzhby statistiki*» dated 18 July 2016. (In Russ).]

261

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\***Мордовский Эдгар Артурович**, к.м.н., доцент [**Edgar A. Mordovsky**, MD, PhD];  
**Адрес:** 163000, Архангельск, Троицкий пр., д. 51 [address: 51 Troitsky proezd, 163000 Arkhangelsk, Russia];  
**тел.:** +7 (8182) 28-57-84, **e-mail:** ulimwengumea@gmail.com, **SPIN-код:** 2548-5695,  
**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2346-9763>

**Соловьев Андрей Горганьевич**, д.м.н., профессор [**Andrey G. Soloviev**, MD, PhD, Professor];  
**e-mail:** ASoloviev1@yandex.ru, **SPIN-код:** 2952-0619, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0350-1359>

**Санников Анатолий Леонидович**, д.м.н., профессор [**Anatoliy L. Sannikov**, MD, PhD, Professor];  
**e-mail:** jsannikov@yandex.ru, **SPIN-код:** 7418-0025, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5856-8051>

Ф.М. Кипкеева<sup>1\*</sup>, Т.А. Музаффарова<sup>1</sup>, М.П. Никулин<sup>2</sup>, П.В. Апанович<sup>1</sup>, А.В. Карпухин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Медико-генетический научный центр, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Москва, Российская Федерация

## Перспективные гены-мишени таргетной терапии и прогностические биомаркеры рака желудка

*Представление о молекулярно-генетических особенностях рака желудка (РЖ), и в первую очередь функционировании сигнальных каскадов, задействованных в его возникновении и развитии, имеет определяющее значение для выявления наиболее перспективных генов-мишеней таргетной терапии. На этой основе проводится разработка, а затем и внедрение в практику эффективных препаратов и схем лечения. В статье подробно рассматриваются индукторы сигнальных путей и их функционирование. mTOR является основным сигнальным каскадом при многих типах рака, в том числе при РЖ. Индукторы mTOR — факторы ангиогенеза, эпидермальный фактор роста и их рецепторы — наиболее активно исследуются в качестве терапевтических мишеней. Особое внимание уделяется стимулированию и развитию лимфангиогенеза, при этом участвующие в нем гены не все пока еще вскрыты и исследованы. Приводится информация о возможном достижении существенного терапевтического эффекта при одновременном ингибировании действия генов ангио- и лимфангиогенеза. Сообщается о таргетных препаратах для терапии РЖ, как уже используемых в протоколах лечения, включая иммунотерапию, так и проходящих стадию клинических испытаний. Рассматриваются одновременная активация нескольких генов и их возможное взаимодействие при развитии опухолевого процесса, что предполагает комбинированный эффект совместного влияния двух и более факторов. Учтена также возможность сохранения активированного сигнального каскада при блокировании одного из активированных рецепторов в результате действия экспрессируемого рецептора. Сообщается о разработке препаратов, ориентированных одновременно на несколько мишеней, а также об эффективности комбинированного применения разных таргетных препаратов. Существенное значение для улучшения качества терапии РЖ может иметь персонализация лечения, в том числе с использованием молекулярной классификации. Обсуждается прогностическое значение экспрессии генов-мишеней и некоторых других генов, а также подтипов РЖ по молекулярной классификации.*

**Ключевые слова:** рак желудка, гены, таргетная терапия.

**(Для цитирования:** Кипкеева Ф.М., Музаффарова Т.А., Никулин М.П., Апанович П.В., Карпухин А.В. Перспективные гены-мишени таргетной терапии и прогностические биомаркеры рака желудка. *Вестник РАМН.* 2018;73(4):262–272. doi: 10.15690/vramn999)

262

F.M. Kipkeeva<sup>1\*</sup>, T.A. Muzaffarova<sup>1</sup>, M.P. Nikulin<sup>2</sup>, P.V. Apanovich<sup>1</sup>, A.V. Karpukhin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> NN Blokhin Russian Cancer Research Centre, Moscow, Russian Federation

## Promising Targeted Therapies Genes and Prognostic Biomarkers of Gastric Cancer

*Understanding the molecular genetic features of gastric cancer (GC) and principally the functioning of signaling cascades involved in its occurrence and development is determining for identifying the most promising genes for targeted therapy. On this basis, development and consequent implementation of effective drugs and treatment regimens is conducted. The inductors of signaling paths, the main one of which is the mTOR pathway, and the functioning of the pathway are considered in details. mTOR inductors (angiogenesis factors, epidermal growth factor and their receptors) are most actively studied as therapeutic targets. Particular attention is paid to the consideration of stimulation and development of lymphangiogenesis where not all genes are discovered and examined yet. The possibility of achieving a significant therapeutic effect with simultaneous inhibition of the action of genes of angi- and lymphangiogenesis is considered. The review covers the administered target drugs and pharmaceuticals under investigation for GC therapy, including immunotherapy. The review provides details on the simultaneous activation of several genes — potential targets of therapy and possible interactions in the development of the tumor process. As a result the combined effect of the simultaneous action of two or more factors can be detected. The possibility of maintaining the activated signaling cascade when one of the activated receptors is blocked in consequence of the action of another expressed receptor is also considered. The article presents information on development of drugs affecting several targets and on effectiveness of combined therapy with different targeted drugs. Essential effectiveness of GC therapy can be achieved by personified treatment including application of molecular classification. The review discusses the prognostic value of target and other genes expression, as well as GC subtypes according molecular classification.*

**Key words:** gastric cancer, genes, target therapy.

**(For citation:** Kipkeeva FM, Muzaffarova TA, Nikulin MP, Apanovich PV, Karpukhin AV. Promising Targeted Therapies Genes and Prognostic Biomarkers of Gastric Cancer. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2018;73(4):262–272. doi: 10.15690/vramn999)

**Введение**

Рак желудка (РЖ) входит в число лидирующих причин смерти от онкозаболеваний. Выживаемость в течение пяти лет среди пациентов с раком желудка составляет только 20–30%. При переходе болезни в метастатический этап, медиана выживаемости больных — всего 9–10 мес [1].

Стандартом лечения при РЖ является хирургическое вмешательство с дополнительной химиотерапией. Но в ряде случаев, когда заболевание выявлено на поздней стадии, основным методом ведения пациентов становится консервативная терапия. В настоящее время применяются комбинированные схемы химиотерапии, что приводит к существенному повышению показателей общей выживаемости по сравнению с терапией одним препаратом или симптоматической поддерживающей терапией. Однако необходимость улучшить понимание патогенеза рака желудка и разработать более эффективные и менее токсичные терапевтические стратегии все еще существует, особенно при поздних стадиях этого заболевания.

В последнее время разрабатываются и внедряются в практику новые противоопухолевые средства. К ним относятся препараты таргетной терапии: чаще всего это ингибиторы тирозинкиназы, способные воздействовать на мишень внутри клетки, и моноклональные антитела (такие как трастузумаб, бевацизумаб и т.д.), связывающиеся на поверхности клетки со специфическими антигенами — своими мишенями. Мишенями обычно являются ростовые факторы и их рецепторы.

Из рассматриваемых в настоящее время терапевтических мишеней РЖ наиболее активно исследуются эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor, EGF), факторы ангио- и лимфангиогенеза, такие как фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor PDGF), и активируемые ими сигнальные пути.

На данный момент в лечении рака желудка используется трастузумаб — моноклональное антитело против

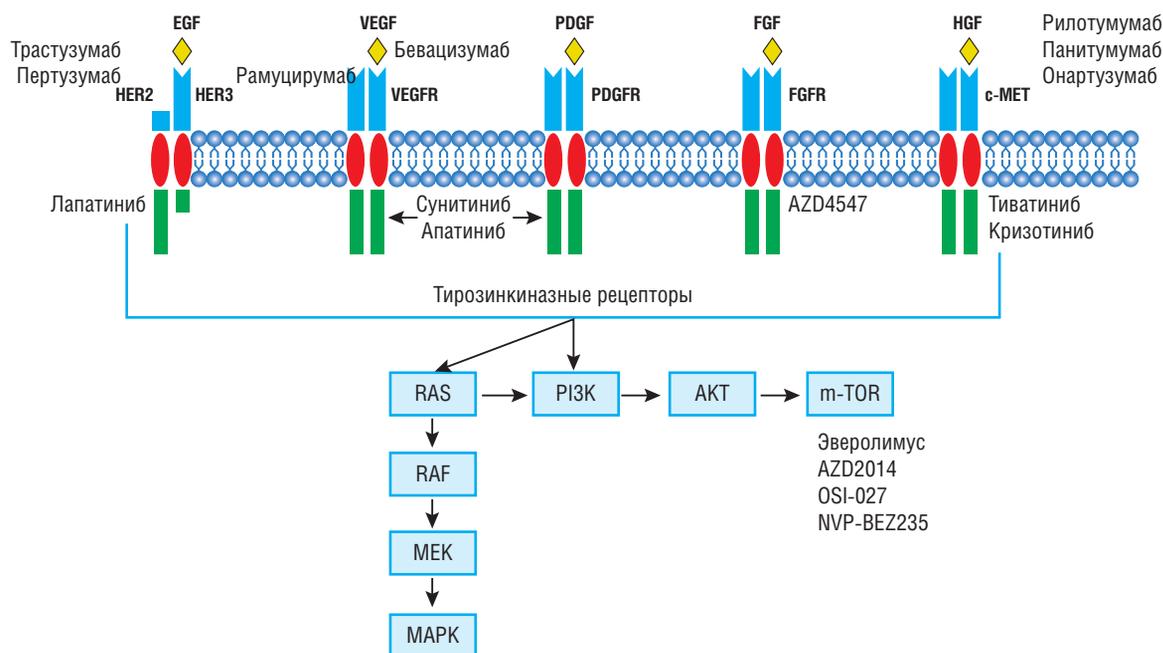
второго рецептора эпидермального фактора роста (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) и рамуцирумаб, мишенью которого является внеклеточный домен VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2). Также исследуются мультитаргетные ингибиторы тирозинкиназы, мишенями которых являются медиаторы ангио- и лимфангиогенеза. Основные сигнальные пути развития РЖ и применяемые или исследуемые для терапии рака желудка таргетные препараты представлены на рис.

**Факторы ангио- и лимфангиогенеза как индукторы развития опухоли и мишени таргетной терапии при раке желудка**

Рак желудка в 95% случаев представлен аденокарциномой [2]. В процессах роста, развития и прогрессирования аденокарциномы желудка, как и других солидных опухолей, немаловажное значение имеет ангио- и лимфангиогенез.

С открытием ангиогенных факторов ингибирование сигнального пути VEGF стало стандартной терапевтической стратегией для многих видов рака. Однако распространение метастазов возможно и лимфогенным путем. В частности, при раке желудка поражение регионарных лимфоузлов на ранних стадиях наблюдается в 10–14% случаев; на поздних стадиях с инвазией в мышечный слой (*muscularis propria*, MP), субсерозу (subserosa, SS), за пределы серозной оболочки (exposed beyond the serosa, SE), в прилежащие структуры (invasion to adjacent organ, SI) лимфоузлы поражаются в 52,2; 66,9; 74,4 и 82,6% соответственно [3]. Учитывая значимость лимфогенного пути метастазирования, в последнее время активно изучаются механизмы нелимфангиогенеза и его ключевые медиаторы.

На ранних стадиях онкогенеза сосудистая сеть начинает формироваться, когда для доставки питательных веществ и кислорода к тканям растущей опухоли простой диффузии уже недостаточно. На более поздних стадиях кровоснабжение необходимо для дальнейшего роста



**Рис.** Основные сигнальные пути развития рака желудка и направленные на ингибирование участвующих в них генов таргетные препараты (применяемые и разрабатываемые)

опухоли и развития метастазов. Ангиогенез регулируется про- и антиангиогенными факторами. VEGF, PDGF и FGF — одни из регуляторов ангио- и лимфангиогенеза. Их взаимодействие было описано как «переключатель ангиогенеза». В норме факторы ангиогенеза находятся в состоянии динамического равновесия. При онкогенезе баланс сдвигается в сторону проангиогенных факторов [4]. Есть предположение, что регуляция лимфангиогенеза имеет тот же механизм. Факторы лимфангиогенеза, так же как факторы ангиогенеза, в нормальных сформированных органах и тканях находятся в состоянии равновесия. При нелимфангиогенезе активируется «лимфангиогенный переключатель» [5].

**Фактор роста эндотелия сосудов**

VEGF — один из ключевых факторов ангиогенеза. Наиболее изучены пять структурно родственных VEGF-лигандов — VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарный ростовой фактор (PlGF). Все лиганды представляют собой гомодимеры. Также существует три тирозинкиназных рецептора VEGF — VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3.

VEGF-A является основным медиатором физиологического и патологического ангиогенеза. Он опосредует свои эффекты путем связывания с двумя поверхностными тирозинкиназными рецепторами — VEGFR1 и VEGFR2. Активация VEGFR2 считается более важной для ангиогенеза. При связывании VEGF с VEGFR2 происходят димеризация и активация этого рецептора, что запускает сигнальные пути (см. рис.), включающие фосфатидилинозитол-3-киназный каскад (mammalian target of rapamycin; путь mTOR) и каскад RAS-RAF-ERK (mitogen-activated protein kinase; путь MAPK), которые способствуют выживаемости клетки и стимулируют пролиферацию [6].

Рак желудка устойчив к анти-VEGF терапии (бевацизумабу). VEGFR2 (второй рецептор фактора роста эндотелия сосудов) рассматривается в качестве более перспективной терапевтической мишени при РЖ. Сообщается об увеличении медианы выживаемости по сравнению с плацебо при применении анти-VEGFR2 терапии. Основываясь на результатах исследования RAINBOW (NCT01170663), гуманизированное моноклональное антитело против внеклеточного домена VEGFR2 рамудирумаб было одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) в качестве второй линии терапии при метастатическом раке желудка и пищеводно-желудочного перехода.

Рассматривается также возможность включения этого препарата в схему первой линии терапии при РЖ. Были опубликованы результаты II фазы рандомизированного исследования, в котором оценивалась эффективность рамудирумаба в сочетании с режимом mFOLFOX6 в качестве первой линии терапии при метастатическом раке пищевода, пищеводно-желудочного перехода и желудка. Комбинация рамудирумаба с режимом mFOLFOX6 не продемонстрировала увеличения показателей выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости на исследуемой выборке. По мнению авторов, это может быть связано с высокой частотой преждевременной отмены лечения среди пациентов экспериментальной группы, вызванной, как предполагается, повышенной токсичностью данной комбинации. Также авторы отметили клинко-морфологическую неоднородность выборки: в данном исследовании у значительной части пациентов

(почти половины) был рак пищевода, тогда как в другие аналогичные исследования пациенты с раком пищевода не включались [7]. В настоящее время той же группой исследователей ведется третья фаза клинических испытаний рамудирумаба в сочетании с режимом цисплатин/фторпиримидин в качестве первой линии терапии при раке желудка и пищеводно-желудочного перехода (RAINFALL, Clinicaltrials.gov identifier: NCT02314117).

VEGF-C — основной активатор лимфангиогенеза и один из активаторов ангиогенеза. В качестве медиатора ангиогенеза VEGF-C выступает, связываясь со вторым рецептором VEGF. Центральный домен VEGF-C (VHD), на 30% сходный по структуре с другими членами VEGF-семейства, имеет C- и N-концевые пропептиды. В результате протеолиза оба пропептида отщепляются, и образуется активная («зрелая») форма VEGF-C, которая способна связываться с основным ангиогенным рецептором VEGFR2 [8].

Было изучено совместное влияние генов VEGF-A и VEGF-C на развитие опухолевого процесса при раке желудка: у пациентов с повышенным уровнем экспрессии VEGF-A и VEGF-C наблюдались увеличение размеров опухоли, плотности перитуморальных лимфатических сосудов, кровеносных микрососудов опухоли, инвазия лимфатических сосудов, а также более высокая степень метастазирования в лимфатические узлы и худший прогноз по сравнению с пациентами со сниженной экспрессией VEGF-A и VEGF-C. В экспериментах, проведенных на культуре клеток рака желудка, одновременное ингибирование VEGF-A и VEGF-C значительно снижало клеточную пролиферацию по сравнению с избирательным подавлением какого-либо одного из этих факторов [9]. Возможно, в будущем это станет эффективной тактикой лечения для пациентов с РЖ.

Непосредственный рецептор VEGF-C — VEGFR3 — активируется при связывании с лигандами VEGF-C и, в меньшей степени, VEGF-D. Этот сигнальный путь задействован в опухолевом лимфангиогенезе и лимфогенном метастазировании. Обнаружена корреляция между экспрессией генов VEGFC, VEGFR3 и наличием метастазов в лимфоузлах при раке желудка [10].

Для терапии рака желудка ограниченно используются многоцелевые ингибиторы тирозинкиназы — телатиниб (telatinib) и маситиниб (masitinib), мишенями которых являются VEGFR2, VEGFR3, PDGFR и KIT. Возможно, их применение к определенному подтипу РЖ в соответствии с молекулярной классификацией позволит достичь большей эффективности.

**Фактор роста тромбоцитов**

PDGF — медиатор ангиогенеза, его активация рассматривается в качестве одного из механизмов адаптации к анти-VEGF терапии. Семейство PDGF включает пять лигандов (гомодимеры PDGF A–D и гетеродимер PDGF-AB) и два тирозинкиназных рецептора PDGFR —  $\alpha$  и  $\beta$ . Рецепторы PDGF экспрессируются главным образом перицитами сосудистой стенки опухоли и, в меньшей степени, эндотелиоцитами. PDGF участвует в ангиогенезе преимущественно путем стимулирования интеграции перицитов в стенку формирующихся сосудов опухоли [11].

**Нейропептиды**

Наряду с ростовыми факторами и их рецепторами в развитии и прогрессировании опухоли принимают участие многофункциональные корцепторы — нейропи-

лины. Роль нейропилинов в туморогенезе обусловлена их взаимодействием с ключевыми сигнальными путями в клетках опухоли. Нейропилины 1 (neuropilin, NRP1) и 2 (NRP2) являются трансмембранными гликопротеинами, участвуют в аксональном росте и VEGF-опосредованном ангиогенезе.

**Нейропилин 1** экспрессируется эндотелиальными клетками артерий.

Комплекс VEGFR2 и NRP1 опосредует направление роста и ветвление кровеносных сосудов. NRP1 также может связываться и модулировать активность разных лигандов, таких как трансформирующий ростовой фактор бета (transforming growth factor beta, TGF $\beta$ ), FGF, PDGF. Выступая в качестве корецептора, NRP1 участвует в инициации, развитии и метастазировании клеток опухоли [12].

NRP1 рассматривается в качестве мишени антиангиогенной терапии. Не исключено, что при терапии рака (в том числе рака желудка) более эффективной стратегией будет одновременное ингибирование экспрессируемой мишени и ее корецептора. Разработанные против NRP1 моноклональные антитела взаимодействуют и с изоформой VEGF165, подавляя рост опухоли и ангиогенез. Также было обнаружено, что при их комбинации с бевацизумабом эффективность препаратов возрастала [13].

**Нейропилин 2** экспрессируется эндотелиальными клетками венозных и лимфатических сосудов [14]. Он специфически связывается с VEGF-A и VEGF-C и взаимодействует с VEGFR2 и VEGFR3, принимая участие в лимфангиогенезе [15]. Обнаружилось, что уровень экспрессии NRP2 в эндотелиальных клетках опухолевой ткани желудка значительно повышен по сравнению с его экспрессией в эндотелиальных клетках нормальной слизистой оболочки, что имеет значение для развития сосудистой сети опухоли при РЖ [16].

### Фактор роста фибробластов

Еще одним регулятором ангиогенеза является основной фактор роста фибробластов (basic FGF, bFGF). Как и VEGF, он обладает проангиогенной активностью. Помимо этого, bFGF способствует пролиферации и миграции клеток. Предполагается, что во время ангиогенеза между bFGF и VEGF возникает перекрестная связь (cross-talk), так как bFGF увеличивает экспрессию NRP1 — корецептора семейства VEGF [17]. Одновременная экспрессия VEGF и bFGF приводит к активному росту опухоли, с высокой плотностью и проходимость сосудов [18].

bFGF также участвует в регуляции и развитии физиологического и патологического лимфангиогенеза. Обнаружено, что bFGF усиливает экспрессию VEGF-C. При одновременной экспрессии генов bFGF и VEGF-C был отмечен аддитивный ангио- и лимфангиогенный эффект [19].

Первый рецептор bFGF (FGFR1) экспрессируется эндотелиальными клетками лимфатических сосудов и опосредует лимфангиогенный эффект bFGF. Этот сигнальный путь активируется при участии VEGFR3. Блокада VEGFR3 подавляет bFGF-индуцированный лимфангиогенез [20].

Второй рецептор фактора роста фибробластов (FGFR2) рассматривается как прогностический признак при раке желудка. Повышение уровня его экспрессии связано с пролиферацией опухолевых клеток и неблагоприятным прогнозом для пациентов с диссеминированным раком желудка [21]. Из всех факторов роста фибробластов FGFR2 преимущественно активируется двумя лигандами — основным (bFGF) и кислым (aFGF, FGF1), повышенный уровень экспрессии которого наблюдался в 56,7% случаев при аденокарциноме желудка [22].

FGFR2 рассматривается в качестве одной из перспективных мишеней таргетной терапии при РЖ. Препараты, разработанные против FGFR2, в настоящее время проходят клинические испытания. Бемаритузумаб (FPA144) — моноклональное антитело, которое избирательно связывается с FGFR2b, препятствуя связыванию лиганда с рецептором и блокируя сигнальный каскад. Первая фаза исследований продемонстрировала приемлемый профиль безопасности и эффективность монотерапии FPA144 при раке желудка. В настоящее время проводится международное рандомизированное двойное слепое плацебоконтролируемое исследование, оценивающее эффективность бемаритузумаба в сочетании с режимом mFOLFOX6 в первой линии терапии пациентов с метастатическим РЖ с FGFR2-положительным статусом [23].

### Трансформирующий фактор роста

TGF $\beta$ , играя существенную роль в развитии гастроинтестинального рака, также представляет собой перспективную терапевтическую мишень. Он участвует в поддержании клеточного гомеостаза и активации фиброза. На ранних стадиях онкогенеза TGF $\beta$  является супрессором опухоли, на поздних — онкогеном. TGF $\beta$  также может самостоятельно выступать в качестве промотора опухоли, поскольку является регулятором эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial-mesenchymal transition, EMT). TGF $\beta$  усиливает инвазивный потенциал опухоли и ангиогенез [24].

Обнаружено, что TGF $\beta$  стимулирует экспрессию гена VEGF, и уровень его продукта в плазме крови коррелирует с васкуляризацией опухоли при гепатоцеллюлярном раке [25].

Проводимые клинические исследования подтвердили эффективность блокаторов TGF $\beta$  в качестве монотерапии или в сочетании с системной химиотерапией при ряде солидных опухолей [26].

Недавние исследования продемонстрировали, что TGF $\beta$  регулирует инфильтрацию опухоли клетками иммунной системы и ассоциированными с опухолью фибробластами, что приводит к изменениям сигнального каскада в опухолевых клетках. Также TGF $\beta$  в значительной степени ингибирует противоопухолевый иммунный ответ [27]. Было показано, что подавление сигнального пути TGF $\beta$  в сочетании с блокадой иммунологических контрольных точек дает мощный и устойчивый терапевтический эффект, вызывая значительную регрессию опухоли и метастазов [28].

### Рецепторы эпидермального фактора роста при раке желудка

Семейство EGF-рецепторов (включает HER1, HER2, HER3 и HER4) также относится к активаторам сигнального пути mTOR (см. рис.). Эти рецепторы имеют сходную с другими тирозинкиназными рецепторами молекулярную структуру: внеклеточный домен, который обычно связывается с лигандом, трансмембранный участок и внутриклеточный домен с тирозинкиназной активностью. В структуре мембраны клетки EGF-рецепторы представлены в виде гомо- и гетеродимеров.

**EGFR** (HER1; ERBB1) — первый из рецепторов EGF-семейства. Неудовлетворительные результаты клинических испытаний продемонстрировали, что EGFR не может быть эффективной терапевтической мишенью при раке желудка.

Из четырех рецепторов EGF-семейства HER2 и HER3 не являются полноценными. Внеклеточный домен HER2 с лигандом не взаимодействует, HER3 может связываться с несколькими лигандами, но его внутриклеточный домен не обладает тирозинкиназной активностью. Это означает, что как функциональные рецепторы сигнального пути они будут действовать только в виде гетеродимеров.

Гиперэкспрессия HER2 наблюдается при разных типах рака, включая рак молочной железы, рак яичников, рак легких, рак толстой кишки и желудка. Частота повышенной амплификации HER2 при раке желудка довольно вариабельна и в среднем составляет 17,9% [29]. Включение ингибитора HER2 — трастузумаба — в схему лечения пациентов с РЖ, у которых наблюдалась гиперэкспрессия HER2, позволило увеличить их общую выживаемость. Медиана общей выживаемости в группе HER2+ пациентов, получавших химиотерапию в комбинации с трастузумабом, составила 13,8 мес по сравнению с 11,1 мес в контрольной группе (без трастузумаба). Частота объективного ответа в экспериментальной группе составила 47% против 35% в группе плацебо [30].

В последнее время обнаружена коэкспрессия HER2 и HER3 при некоторых видах рака, включая рак желудка. Уровень экспрессии HER3 при раке желудка коррелирует с глубиной инвазии опухоли, наличием метастазов в лимфоузлах и неблагоприятным прогнозом. Сообщается, что формирование гетеродимера HER2/HER3 связано со снижением общей выживаемости больных [31].

Несмотря на то, что внеклеточный домен HER2 и внутриклеточный домен HER3 нефункциональны, гетеродимер, образуемый этими рецепторами, наиболее эффективен из всех комплексов EGF-рецепторов. Как предполагается, сигнальный путь mTOR активируется преимущественно HER2/HER3 гетеродимером [32].

Пертузумаб, рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело против HER2, предотвращает его димеризацию с другими рецепторами EGF, и в первую очередь с HER3.

В рандомизированном плацебоконтролируемом исследовании JACOV оценивалась эффективность комбинации трастузумаба с пертузумабом и стандартной химиотерапии (цисплатин/фторпиримидин) при метастатическом раке желудка и кардиоэзофагеальном раке (КЭР) по сравнению с применением одного трастузумаба с тем же режимом (NCT01774786). В сентябре 2017 г. были опубликованы предварительные результаты: наблюдали увеличение медианы общей выживаемости в экспериментальной группе на 3,3 мес, которое не было статистически значимым. В дальнейшем будут представлены конечные результаты исследования [33]. В настоящее время ведутся исследования, оценивающие эффективность комбинации трастузумаба и пертузумаба с системной химиотерапией в качестве неoadъювантной и периоперационной терапии при более ранних стадиях рака желудка [34] и РЖ/КЭР [35].

Последний из рецепторов EGF — HER4 — в настоящее время также активно изучается, но как терапевтическая мишень при раке желудка он не рассматривается.

### Сигнальные пути mTOR и HGF/MET как мишени таргетной терапии при раке желудка

Кроме сигнальных путей, активируемых описанными выше рецепторами, для развития рака желудка существенное значение имеет также сигнальный путь

HGF/MET. Фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor, HGF) является лигандом, который активирует свой единственный известный на данный момент рецептор — тирозинкиназу MET. Этот путь регулирует многие процессы, стимулирующие клеточную пролиферацию, миграцию, инвазию, ангиогенез, апоптоз и метастазирование. При раке желудка, преимущественно на поздних стадиях, гиперэкспрессия HGF отмечается в 73–88%, MET — в 26–82% случаев [36].

Опубликованы результаты третьей фазы рандомизированного плацебоконтролируемого исследования R1LOMET1. Включение рилотумама (моноклональное антитело против HGF) в схему терапии первой линии при РЖ/КЭР не продемонстрировало значимой эффективности среди пациентов с MET-положительным статусом [37]. Как одна из основных причин устойчивости к анти-MET терапии описана активация альтернативных сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и MEK/MAPK. Также отмечено, что в половине случаев MET-позитивного РЖ наблюдается одновременная амплификация HER2, EGFR и MET, что также может быть причиной неэффективности ингибирования сигнального пути HGF/MET [38]. На клеточных линиях глиобластомы и рака желудка была продемонстрирована взаимосвязь MET и EGFR. При гиперэкспрессии MET и EGFR подавление одного из рецепторов приводило к тому, что клетка переключалась на другой онкогенный тирозинкиназный рецептор, сохраняя активированный сигнальный каскад mTOR [39].

Путь mTOR, тесно связан с путем митогенактивированной протеинкиназы (MAPK) и является ключевым внутриклеточным сигнальным каскадом в развитии многих типов рака, в том числе и рака желудка. Его активация индуцирует ангио- и лимфангиогенез [40], трансформацию и пролиферацию клеток, что в конечном итоге ведет к развитию онкологического процесса.

Сигнальный путь mTOR включает фосфоинозитид-3-киназу (PI3K), киназы AKT и mTOR.

Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) активируется множеством различных факторов, включая рецепторы тирозинкиназы семейств EGF, VEGF, FGF, PDGF и др. Существуют два механизма активации пути mTOR. Первый — рецепторы тирозинкиназы активируют PI3K, связываясь с ее регуляторной субъединицей p85; второй — тирозинкиназные рецепторы активируют RAS, который в последующем связывается с субъединицей p110 PI3K [41].

Активация PI3K приводит к конформационному изменению серин-треонинкиназы AKT.

AKT (или протеинкиназа B) имеет два домена — центральный, с треониновым остатком, который связывается с фосфоинозитидзависимой протеинкиназой 1 (PDK1), и терминальный, который связывается со вторым комплексом mTOR (mTORC2). Фосфорилируемый AKT (p-AKT) способствует ангиогенезу и предотвращает апоптоз клетки.

mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих) — серин-треониновая протеинкиназа. В зависимости от чувствительности к рапамицину mTOR формирует два функционально и структурно отличающихся комплекса — мишень рапамицина mTORC1 (включает белок Raptor) и нечувствительный к рапамицину mTORC2 (основной белок Rictor).

Активация сигнального пути mTOR при раке желудка послужила основанием для использования ингибитора mTOR в качестве таргетной терапии. Однако, по результатам клинического исследования, аналог рапамицина

эверолимус оказался недостаточно эффективным. Предполагается, что это связано с воздействием препарата на mTORC1/S6K, в то время как АКТ/mTORC2 не ингибируется. Блокирование mTORC1 дезактивирует обратную связь от S6K с рецептором инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1R). Это приводит к активации АКТ, что может быть причиной резистентности опухолевых клеток к рапамицину [42]. В настоящее время разрабатывается новое поколение селективных ингибиторов mTOR, нацеленных на mTORC1 и mTORC2, и превосходящих рапамицин по эффективности. Ожидается, что ингибирование обоих комплексов mTOR станет эффективной терапевтической стратегией при раке желудка в будущем [43].

### Иммунотерапия рака желудка

Помимо ингибирования генов основных сигнальных путей развития рака, в последнее время активно развивается еще одно направление таргетной терапии, мишенями в которой выступают гены иммунологических контрольных точек (immunological checkpoints). Такой подход является перспективным направлением иммунотерапии, которая подразумевает индукцию эффективного иммунного ответа организма против опухолевых клеток и основана на способности иммунной системы распознавать и устранять чужеродные агенты, в том числе клетки рака. Задействованные в генезе опухоли сигнальные пути с участием иммунологических контрольных точек — одна из причин подавления противоопухолевого иммунитета. Иммунотерапия — метод, направленный на преодоление иммунологической устойчивости опухоли [44]. Иммунологические контрольные точки инициируются взаимодействием рецептор–лиганд. Их активацию можно подавить, в частности, блокируя такое взаимодействие соответствующими антителами. Установлено, что резистентность к противоопухолевому иммунитету связана с активацией цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена (CTLA-4) и белка программируемой смерти-1 (PD-1), а также ассоциированных с ними лигандов и белков. CTLA-4 экспрессируется Т-лимфоцитами, является гомологом CD28, и с большей аффинностью способен связываться с костимуляторными молекулами B7-1 и B7-2 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Но в отличие от CD28, CTLA-4 не активирует, а ингибирует функции Т-клетки.

PD-1 является рецептором Т-клеток и, как и CTLA-4, относится к семейству CD28. PD-1 имеет два лиганда — PD-L1 и PD-L2. Доказано, что лиганды белка PD-1 экспрессируются опухолевыми клетками при многих типах рака, включая рак желудка (экспрессию PD-L1 обнаруживают примерно в 30% опухолей РЖ) [45]. PD-L1 подавляет противоопухолевый иммунитет, инактивируя Т-клетку, когда связывается со своим рецептором PD-1 на ее поверхности [46].

Препараты ипилимумаб и тремелиумаб являются анти-CTLA4 моноклональными антителами. Их эффективность была оценена во второй фазе клинических испытаний при РЖ/КЭР. За исключением единичных случаев, ни один из препаратов не продемонстрировал значимого эффекта [47].

Монотерапия антителами против PD-1/PD-L1, включающая пембролизумаб, ниволумаб, авелумаб, дурвалумаб и атезолизумаб, продемонстрировала частоту эффективного ответа от 7 до 26% при РЖ и КЭР у пациентов в разных популяциях. Эффект от лечения был выше

у пациентов с PD-L1-положительным статусом [48]. Во второй фазе исследования KEYNOTE-059 частота эффективного ответа среди пациентов с РЖ/КЭР (259 человек), получавших пембролизумаб в качестве третьей линии терапии, составила 12%, медиана выживаемости — 5,5 мес [49]. Основываясь на этих результатах, FDA одобрила пембролизумаб в качестве третьей линии терапии пациентов с метастатическим РЖ и КЭР с PD-L1-положительным статусом.

Недавно были опубликованы предварительные результаты третьей фазы исследований, в которых моноклональные антитела против PD-L1 не продемонстрировали значимого эффекта по сравнению с поддерживающей химиотерапией у пациентов с метастатическим РЖ/КЭР [50].

В исследовании KEYNOTE-061, оценивавшем эффективность пембролизумаба по сравнению с паклитакселем при метастатическом РЖ/КЭР в качестве второй линии терапии, в целом статистически значимых различий в эффективности препаратов не обнаружено. Однако на более поздних сроках лечения пембролизумаб продемонстрировал лучший эффект. По мнению авторов, это может свидетельствовать о более позднем развитии иммунного ответа. Анализ подгрупп показал, что опухоли с повышенным уровнем экспрессии PD-L1 и высокой микросателлитной нестабильностью были более чувствительны к анти-PD-L1 терапии. Таким образом, учитывая полученные результаты, а также сравнительно низкую токсичность пембролизумаба, есть вероятность, что для пациентов с положительным PD-L1 статусом и наличием микросателлитной нестабильности опухоли терапия данным препаратом может быть эффективной [51].

В целом, эффективность анти-PD-1/PD-L1 монотерапии редко составляет более 40% и преимущественно это частичный ответ [52]. Для разработки более действенных схем лечения исследуется эффективность комбинирования препаратов иммунотерапии с таргетными препаратами и/или химиотерапией.

Активно разрабатывается терапия ингибиторами иммунологических контрольных точек в сочетании с антиангиогенной терапией. VEGF-A, помимо активации ангиогенеза, участвует в индуцированной опухолью иммуносупрессии: подавляет созревание и дифференцировку дендритных клеток, способствует накоплению в ткани опухоли супрессорных клеток миелоидного происхождения и регуляторных Т-клеток, а также препятствует миграции Т-лимфоцитов в опухоль. Таргетные препараты, преимущественно ориентированные на сигнальный путь VEGF/VEGFR, могут в определенной степени противодействовать иммунорезистентности опухоли, но активировать эффективный иммунный ответ организма против опухоли они не могут. В связи с этим изучается возможность сочетания анти-VEGF терапии и ингибиторов иммунологических контрольных точек при раке желудка [53].

Еще одной исследуемой терапевтической стратегией является сочетание иммунотерапии с подавлением продуктов других гиперэкспрессированных генов-мишеней опухоли. Фаза Ib/2 исследования комбинации пембролизумаба с маркетуксимабом продемонстрировала обнадеживающие предварительные результаты с частотой эффективного ответа 57% среди пациентов с HER2+/PD-L1+ раком желудка [54]. Также продолжают исследовать комбинации пембролизумаба с трастузумабом и дополнительной химиотерапией (NCT02901301).

Как уже отмечалось, перспективно сочетание ингибирования иммунологических контрольных точек с блокадей TGFβ.

Сигнальный путь mTOR также связан с первичной резистентностью к ингибированию контрольной точки PD-1/PD-L1, поскольку PD-1 является одним из медиаторов сигнальных путей mTOR и MAPK. Активация mTOR, обусловленная мутацией в *P TEN*, наблюдается при многих типах рака. В доклинических исследованиях эффективность блокады PD-1/PD-L1 или CTLA4 повышалась при включении в терапию селективных ингибиторов mTOR [52].

### Молекулярная классификация рака желудка и таргетная терапия

Злокачественные опухоли желудка, как и многие другие, являются гетерогенными по молекулярным и гистологическим характеристикам. Эти характеристики могут определять лечебный ответ на те или иные таргетные препараты. Знание особенностей конкретной опухоли позволяет персонализировать терапию и является отправной точкой в поиске эффективных мишеней терапии.

Исследования последних лет позволили классифицировать рак желудка по молекулярным характеристикам и разделить его на четыре подтипа. Широкое распространение получили две молекулярно-генетические классификации РЖ: первая разработана группой Атласа генома рака (The Cancer Genome Atlas, TCGA) [55] (табл. 1), вторая — Азиатской группой исследования рака (Asian Cancer Research Group, ACRG) [56] (табл. 2).

Как нетрудно заметить, указанные классификации в значительной степени соответствуют друг другу. Полностью совпадают молекулярные характеристики подтипа РЖ с микросателлитной нестабильностью

(microsatellite instability, MSI). В значительной мере коррелируют между собой молекулярные характеристики EBV+ и MSS/TP53+, GS и EMT/MSS, CIN и MSS/TP53-, которые имеют и ряд других общих особенностей. Приведенные характеристики подтипов РЖ могут определять их чувствительность к терапии таргетными препаратами, позволяя персонализировать лечение и указывая на пути поиска перспективных лекарственных средств. В частности, подтипы РЖ с MSI и опухоли, ассоциированные с EBV-инфекцией (EBV+, Epstein-Barr Virus), более чувствительны к препаратам иммунотерапии [57]. Возможно, для этих подтипов могут иметь значение и ингибиторы PIK3CA. Подтип CIN потенциально способен чаще, чем другие подтипы, отвечать на ингибирование тирозинкиназных рецепторов и, видимо, циклинзависимых киназ, а GS может нуждаться в создании новых препаратов, направленных на ингибирование пути RHOA [36].

Особо следует выделить высокую частоту мутаций в гене *TP53*, характерную для подтипов CIN/MSS/TP53-. Активация транскрипционного фактора p53 дикого типа при повреждении ДНК или активации онкогенов приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу клетки. Инактивирующая мутация в *TP53* позволяет опухолевым клеткам избежать апоптоза, а самой опухоли — быстро прогрессировать, в связи с чем ген *TP53* рассматривается в качестве перспективной терапевтической мишени. Доклинические исследования продемонстрировали, что активация экспрессии *TP53* дикого типа может вызывать эффективную регрессию опухоли. В настоящее время клинические испытания проводятся по двум препаратам, ориентированным на конверсию мутации в продукте гена *TP53*, — APR-246 (проводится вторая фаза

Таблица 1. Классификация и молекулярная характеристика подтипов рака желудка по TCGA (The Cancer Genome Atlas)

Подтипы рака желудка	Частота, %	Молекулярная характеристика
MSI (опухоль с микросателлитной нестабильностью)	22	Ингибирование экспрессии гена <i>MLH1</i> , высокая частота мутаций в генах <i>PIK3CA</i> , <i>PTEN</i> , <i>HER2</i> , <i>HER3</i> , <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> и других медиаторах онкогенеза
EBV+ (опухоль, ассоциированные с EBV-инфекцией)	8	Высокая частота мутаций в гене <i>PIK3CA</i> , повышенная амплификация генов <i>PDL1/PDL2</i> , ингибирование экспрессии <i>CDKN2A</i>
GS (опухоль без геномной нестабильности)	20	Высокая частота мутаций в генах <i>CDH1</i> и <i>RHOA</i>
CIN (опухоль с хромосомной нестабильностью)	50	Анеуплоидия, амплификация и повышенный уровень экспрессии тирозинкиназных рецепторов или <i>KRAS</i> , транскрипционных факторов, медиаторов клеточного цикла, высокая частота мутаций в гене <i>TP53</i>

Таблица 2. Классификация и молекулярная характеристика подтипов рака желудка по ACRG (The Asian Cancer Research Group)

Подтипы рака желудка	Частота, %	Молекулярная характеристика
MSI (опухоль с микросателлитной нестабильностью)	23	Ингибирование экспрессии гена <i>MLH1</i> , высокая частота мутаций в генах <i>PIK3CA</i> , <i>PTEN</i> , <i>HER2</i> , <i>HER3</i> , <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> и других медиаторах онкогенеза
MSS/TP53+ (опухоль без микросателлитной нестабильности и без мутации в <i>TP53</i> )	26	Ассоциированы с EBV-инфекцией; высокая частота мутаций в <i>PIK3CA</i> , <i>APC</i> , <i>SMAD4</i>
EMT/MSS (опухоль без микросателлитной нестабильности, содержащие клетки мезенхимального типа)	15	Ингибирование экспрессии гена <i>CDH1</i>
MSS/TP53- (опухоль без микросателлитной нестабильности, с инактивирующей мутацией в <i>TP53</i> )	36	Амплификация и повышенный уровень экспрессии тирозинкиназных рецепторов; высокая частота мутаций в гене <i>TP53</i>

клинических испытаний) и молекула СОТ1-2 (исследуется в ходе первой фазы) [58].

### Другие прогностические маркеры

Немаловажное значение имеют маркеры прогноза развития онкозаболевания, а также маркеры, позволяющие прогнозировать эффективность выбранной терапии и подобрать более подходящий для пациента препарат, либо избежать излишнего токсического воздействия препарата на организм в случае его неэффективности. Помимо вышеописанных, имеются и другие потенциальные маркеры прогноза. Определенные возможности прогнозирования открывает в том числе молекулярная классификация рака желудка. Выявленные подгруппы РЖ характеризуются разным прогнозом развития заболевания [36]. Наиболее благоприятный прогноз и низкий риск рецидива имеет подгруппа MSI. Подгруппы EBV+/MSS/TP53+ и CIN/MSS/TP53- занимают среднее положение — промежуточный прогноз и риск рецидива. Неблагоприятный прогноз и высокий риск рецидива характерен для подгруппы GS/EMT.

В то время как молекулярная классификация РЖ основана на определенном наборе молекулярных признаков разных генов, не входящие в такую классификацию гены также могут иметь прогностическое значение.

**Бета-тубулин III класса** экспрессируется в тканях опухолей различного происхождения и является одним из важнейших белков, ассоциированных со сборкой микротрубочек, что важно для многих функций клетки, таких как митохондриальное дыхание и внутриклеточный транспорт. Нарушение функции микротрубочек ингибирует митотические клетки. Это стало причиной для разработки противоопухолевых препаратов — ингибиторов формирования митотического веретена (microtubule targeting agents, MTAs). Для лечения различных солидных опухолей применяются таксаны (паклитаксел, доцетаксел, карбазитаксел). Однако эффективность таксанов и других ингибиторов митоза ограничивается развитием резистентности опухолевых клеток к этим препаратам, а также их токсичностью. В настоящее время нет единого мнения относительно влияния уровня экспрессии гена *TUBB3* на чувствительность опухолевых клеток к терапии МТА. Предполагалось, что белок *TUBB3* отвечает за развитие резистентности опухолевых клеток к таксанам. Согласно данным ранних исследований, высокий уровень экспрессии *TUBB3* указывает на неэффективность терапии таксанами. Более поздние данные о *TUBB3* и эффективности различных ингибиторов митоза противоречивы. В частности, класс III бета-тубулина является чисто прогностическим биомаркером, ассоциированным с неблагоприятным исходом заболевания при некоторых солидных злокачественных опухолях, независимо от выбора химиотерапевтических препаратов [59].

**BRCA1** изначально был описан как ген предрасположенности к раку молочной железы и яичников. В настоящее время этот ген рассматривается как прогностический и предиктивный маркер при многих видах рака. Изучается зависимость терапевтического эффекта препаратов платины и таксанов от уровня экспрессии *BRCA1*. Отмечена корреляция между низким уровнем экспрессии *BRCA1* в первичной опухоли и эффективностью платиносодержащей химиотерапии у пациентов с немелкоклеточным раком легкого, раком яичников [60]. По мнению некоторых авторов, такая корреляция подразумевает,

что низкий уровень экспрессии *BRCA1* и, следовательно, низкий репаративный потенциал ДНК могут обусловить чувствительность опухолевых клеток к терапии препаратами, вызывающими повреждения (кросслинкинг) ДНК этих клеток. И наоборот, при повышенной экспрессии *BRCA1* клетка может устранить повреждения ДНК, вызываемые препаратами платины [61]. Однако *BRCA1* функционирует не только как ген репарации повреждений ДНК, но и принимает участие в регуляции клеточного цикла посредством ассоциации с другими белками. По данным ранее проводившихся исследований, *BRCA1* был локализован в центросомах во время митоза и ассоциировал, согласно результатам коиммунопреципитации, с гамма-тубулином, компонентом центросомы, участвующим в нуклеации микротрубочек. Гамма-тубулин связывался преимущественно с гипофосфорилированной формой *BRCA1* [62]. Выдвинута гипотеза, что повышенный уровень экспрессии *BRCA1* положительно коррелирует с чувствительностью опухолевых клеток к таксанам: в исследованиях, проводившихся на клеточных линиях с индуцированной экспрессией *BRCA1*, обнаружилось, что чувствительность этих клеток к таксанам была резко повышена [63]. У пациентов с РЖ, имеющих повышенную экспрессию *BRCA1*, наблюдались большая частота объективного ответа и выживаемость без прогрессирования при назначении ингибиторов митоза [64].

При раке желудка повышенная экспрессия *BRCA1* коррелировала с общей выживаемостью пациентов и более благоприятным прогнозом. При низком уровне экспрессии *BRCA1* были более эффективны препараты платины [65].

**ERCC1** (excision repair cross-complementing 1) относится к генам эксцизионной репарации. Его продукт — высококонсервативный рестрикционный белок, участвующий в устранении повреждений ДНК, в том числе индуцированных производными платины, что может быть причиной устойчивости опухолевых клеток к этим препаратам. Была обнаружена корреляция между высокой экспрессией *ERCC1* и неэффективностью химиотерапии на основе платины при разных типах рака. По результатам проведенного метаанализа, повышенный уровень экспрессии *ERCC1* был ассоциирован с неблагоприятным прогнозом у пациентов с РЖ, получавших химиотерапию на основе платины [66]. В рандомизированном исследовании оценивалась связь между уровнем экспрессии *ERCC1* и эффективностью платиносодержащей терапии (FOLFOX) при кардиоэзофагеальном раке. Во второй фазе исследования было обнаружено, что у пациентов с низким (<1,7) уровнем экспрессии *ERCC1* отмечалось статистически значимое увеличение безрецидивной выживаемости и частоты ответа при терапии FOLFOX, хотя общая выживаемость статистически значимо не отличалась [67].

### Заключение

В настоящее время на разных стадиях исследования, с точки зрения эффективности терапии РЖ, находится ряд таргетных препаратов для ингибирования генов, функционирующих в основных путях развития рака желудка. К ним относятся новые препараты, разработанные против FGFR2, NRP1, и препараты, ориентированные на сигнальный путь TGF $\beta$ , которые демонстрируют неплохие эффекты на первых фазах клинических исследований. Препарат пертузумаб в сочетании с трастузумабом,

хотя и не продемонстрировал существенной эффективности при метастатическом РЖ, возможно, будет эффективен в качестве неоадьювантной и периоперационной терапии. Следует выделить тенденцию одновременного ингибирования разных мишеней. В частности, показано, что одновременное применение препарата против NRP1 и бевацизумаба повышает эффективность терапии. Как ожидается, новый ингибитор, блокирующий одновременно mTORC1 и mTORC2, может быть эффективным при РЖ.

Помимо ингибирования генов основных сигнальных путей развития рака, в последнее время активно развивается еще одно направление таргетной терапии — иммунотерапия, в качестве мишеней которой выступают гены иммунологических контрольных точек. При РЖ наибольшую эффективность — от 7 до 26% — продемонстрировали ингибиторы PD-1/PD-L1. Эффективность PD-L1 может быть повышена путем персонификации лечения с помощью определения экспрессии PD-L1 и использования молекулярной классификации: подгруппы РЖ с микросателлитной нестабильностью и наличием вируса Эпштейна–Барр демонстрируют повышенную эффективность ответа на иммунотерапию. Результативным может быть сочетание ингибирования генов основных сигнальных путей и иммунотерапии. В этом направлении обнадеживающими являются результаты по ингибированию PD-L1 в сочетании с ингибированием HER2 или TGFβ. Возможно, использование при терапии РЖ многоцелевых ингибиторов тирозинкиназ, таких как телатиниб (telatinib) и маситиниб (masitinib), для подтипа опухоли

с хромосомной нестабильностью по молекулярной классификации повысит их эффективность.

Можно полагать, что разработка новых таргетных препаратов, комбинированное их применение в сочетании с персонификацией терапии приведет к повышению эффективности лечения рака желудка.

### Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России.

### Конфликт интересов

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

### Участие авторов

Ф.М. Кипкеева — написание текста рукописи; Т.А. Музафарова, М.П. Никулин, П.В. Апанович: обзор публикаций по теме статьи; А.В. Карпунин: обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

270

### ЛИТЕРАТУРА

- Ajani JA, Lee J, Sano T, et al. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17036. doi: 10.1038/nrdp.2017.36.
- Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, et al. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg*. 2005;241(1):27–39. doi: 10.1097/01.SLA.0000149300.28588.23.
- Akagi T, Shiraishi N, Kitano S. Lymph node metastasis of gastric cancer. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2):2141–2159. doi: 10.3390/cancers3022141.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353–364. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):735–743. doi: 10.1038/nrc1693
- Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(3):1579–1586. doi: 10.1016/0006-291X(92)90483-2.
- Yoon HH, Bendell JC, Braithel FS, et al. Ramucirumab combined with FOLFOX as front-line therapy for advanced esophageal, gastroesophageal junction, or gastric adenocarcinoma: a randomized, double-blind, multicenter Phase II trial. *Ann Oncol*. 2016;27(12):2196–2203. doi: 10.1093/annonc/mdw423.
- Joukov V, Sorsa T, Kumar V, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J*. 1997;16(13):3898–3911. doi: 10.1093/emboj/16.13.3898.
- Wang X, Chen X, Fang J, Yang C. Overexpression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(4):586–597.
- Yang C, Zhang ZD. The expression of VEGF-C and its receptor VEGFR-3 correlates with lymph node metastasis in gastric cancer. *Open J Gastroenterol*. 2014;4(12):357–377. doi: 10.4236/ojgas.2014.412050.
- Yang Y, Andersson P, Hosaka K. The PDGF-BB-SOX7 axis-modulated IL-33 in pericytes and stromal cells promotes metastasis through tumour-associated macrophages. *Nat Commun*. 2016;7:11385. doi: 10.1038/ncomms11385.
- Djordjevic S, Driscoll PC. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov Today*. 2013;18(9–10):447–455. doi: 10.1016/j.drudis.2012.11.013.
- Xin Y, Li J, Wu J, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of circulating biomarkers of anti-NRP1, a novel antiangiogenesis agent, in two phase I trials in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):6040–6048. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1652.
- Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, et al. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev*. 2001;109(1):115–119. doi: 10.1016/S0925-4773(01)00518-4.
- Favier B, Alam A, Barron P, et al. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood*. 2006;108(4):1243–1250. doi: 10.1182/blood-2005-11-4447.
- Kim WH, Lee SH, Jung MH, et al. Neuropilin2 expressed in gastric cancer endothelial cells increases the proliferation and migration of endothelial cells in response to VEGF. *Exp Cell Res*. 2009;315(13):2154–2164. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.04.018.
- Yamashita-Kashima Y, Fujimoto-Ouchi K, Yorozu K, et al. Biomarkers for antitumor activity of bevacizumab in gastric cancer models. *BMC Cancer*. 2012;12:37. doi: 10.1186/1471-2407-12-37.
- Korc M, Friesel RE. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9(5):639–651. doi: 10.2174/156800909789057006.

19. Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8868–873. doi: 10.1073/pnas.062040199.
20. Cao R, Ji H, Feng N, et al. Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):15894–15899. doi: 10.1073/pnas.1208324109.
21. Kilgour E, Su X, Zhan P, et al. Prevalence and prognostic significance of FGF receptor 2 (FGFR2) gene amplification in Caucasian and Korean gastric cancer cohorts. *J Clin Oncol*. 2012;30(Suppl):4124.
22. Liu N, Zhang J, Sun S, et al. Expression and clinical significance of fibroblast growth factor 1 in gastric adenocarcinoma. *Onco Targets Ther*. 2015;8:615–621. doi: 10.2147/OTT.S79204.
23. Catenacci DV, Enzinger PC, Tesfaye AA, et al. FIGHT: A phase 3 randomized, double-blind, placebo controlled study evaluating (bemarituzumab) FPA144 and modified FOLFOX6 (mFOLFOX6) in patients with previously untreated advanced gastric and gastroesophageal cancer with a dose finding phase 1 lead-in. *J Clin Oncol*. 2018;36(Suppl):TPS4135.
24. Katz LH, Likhter M, Jogunoori W, et al. TGF- $\beta$  signaling in liver and gastrointestinal cancers. *Cancer Lett*. 2016;379(2):166–172. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.033.
25. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, et al. Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2015;147:22–31. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
26. de Gramont A, Faivre S, Raymond E. Novel TGF- $\beta$  inhibitors ready for prime time in onco-immunology. *Oncoimmunology*. 2016;6(1):e1257453. doi: 10.1080/2162402X.2016.1257453.
27. Yang L. TGF $\beta$ , a potent regulator of tumor microenvironment and host immune response, implication for therapy. *Curr Mol Med*. 2010;10(4):374–380. doi: 10.2174/156652410791317039.
28. Ganesh K, Massagué J. TGF- $\beta$  inhibition and immunotherapy: checkmate. *Immunity*. 2018;48(4):626–628. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.037.
29. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: an update. *World J Gastroenterol*. 2016;22(19):4619–4625. doi: 10.3748/wjg.v22.i19.4619.
30. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9742):687–697. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
31. Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):3030–3036. doi: 10.1200/JCO.2010.33.6313.
32. Cao GD, Chen K, Chen B, Xiong MM. Positive prognostic value of HER2-HER3 co-expression and p-mTOR in gastric cancer patients. *BMC Cancer*. 2017;17(1):841. doi: 10.1186/s12885-017-3851-y.
33. Tabernero J, Hoff PM, Shen L, et al. Anti-cancer agents & biologic therapy oesophageal cancer gastric cancer prostate cancer gastrointestinal cancers. *Ann Oncol*. 2017;28(Suppl 5):v209–v268. doi: 10.1093/annonc/mdx369.
34. Integration of trastuzumab, with or without pertuzumab, into perioperative chemotherapy of her2- positive stomach cancer: the innovation trial (EORTC-1203-GITCG). *Oncol Res Treat*. 2016;39(3):153–154. doi: 10.1159/000444702.
35. Hofheinz R, Hausen G, Borchert K. Perioperative trastuzumab and pertuzumab in combination with FLOT versus FLOT alone for HER2 positive resectable esophagogastric adenocarcinoma: Petrarca — a phase II trial of the German AIO. *Journal of Clinical Oncology*. 2017. 2017:TPS4133.
36. Riquelme I, Saavedra K, Espinoza JA, et al. Molecular classification of gastric cancer: towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget*. 2015;6(28):24750–24779. doi: 10.18632/oncotarget.4990.
37. Catenacci DV, Tebbutt NC, Davidenko I, et al. Rilotumumab plus epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line therapy in advanced MET-positive gastric or gastro-oesophageal junction cancer (RILOMET-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(11):1467–1482. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30566-1.
38. Anestis A, Zoi I, Karamouzis MV. Current advances of targeting HGF/c-Met pathway in gastric cancer. *Ann Transl Med*. 2018;6(12):247. doi: 10.21037/atm.2018.04.42.
39. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*. 2007;318(5848):287–290. doi: 10.1126/science.1142946.
40. Chen H, Guan R, Lei Y, et al. Lymphangiogenesis in gastric cancer regulated through Akt/mTOR-VEGF-C/VEGF-D axis. *BMC Cancer*. 2015;15:103. doi: 10.1186/s12885-015-1109-0.
41. Jebali A, Dumaz N. The role of RICTOR downstream of receptor tyrosine kinase in cancers. *Mol Cancer*. 2018;17(1):39. doi: 10.1186/s12943-018-0794-0.
42. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*. 2006;66(3):1500–1508. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2925.
43. Kim ST, Kim SY, Klempner SJ. Rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR) amplification defines a subset of advanced gastric cancer and is sensitive to AZD2014-mediated mTORC1/2 inhibition. *Ann Oncol*. 2017;28(3):547–554. doi: 10.1093/annonc/mdw669.
44. Matsueda S, Graham DY. Immunotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1657–1666. doi: 10.3748/wjg.v20.i7.1657.
45. Boger C, Behrens HM, Mathiak M, et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*. 2016;7(17):24269–24283. doi: 10.18632/oncotarget.8169.
46. Alsina M, Moehler M, Hierro C, et al. Immunotherapy for gastric cancer: a focus on immune checkpoints target oncol. *Target Oncol*. 2016;11(4):469–477. doi: 10.1007/s11523-016-0421-1.
47. Magalhães H, Fontes-Sousa M, Hindawi MM. Review article immunotherapy in advanced gastric cancer: an overview of the emerging strategies. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:2732408. doi: 10.1155/2018/2732408.
48. Taieb J, Moehler M, Boku N, et al. Evolution of checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic gastric cancers: current status and future perspectives. *Cancer Treat Rev*. 2018;66:104–113. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.04.004.
49. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(5):e180013. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.0013.
50. Bang YJ, Ruiz EY, Van Cutsem E. Phase 3, randomised trial of avelumab versus physician's choice of chemotherapy as third-line treatment for patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer: primary analysis of JAVELIN Gastric 300. *Ann Oncol*. Forthcoming. 2018. doi: 10.1093/annonc/mdy264.
51. Shitara K, Özgüroğlu M, Bang YJ, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2018;392(10142):123–133. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31257-1.

52. Bai J, Gao Z, Li X, et al. Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PDL1 blockade. *Oncotarget*. 2017;8(66):110693–110707. doi: 10.18632/oncotarget.22690.
53. Voron T, Marcheteau E, Pernot S, et al. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol*. 2014;4:70. doi: 10.3389/fonc.2014.00070.
54. Catenacci DV, Park H, Uronis HE. Margetuximab (M) plus pembrolizumab (P) in ERBB2-amplified PD-L1+ gastroesophageal adenocarcinoma (GEA) post trastuzumab (T). *J Clin Oncol*. 2018;36(Suppl):4030.
55. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202–209. doi: 10.1038/nature13480.
56. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. 2015;21(5):449–456. doi: 10.1038/nm.3850.
57. Lee J, Kim K-M. Biomarkers for gastric cancer: molecular classification revisited. *Precision Future Medicine*. 2017;1(2):59–68. doi: 10.23838/pfm.2017.00079.
58. Bykov VJ, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):89–102. doi: 10.1038/nrc.2017.109.
59. Karki R, Ferlini C. Class III beta-tubulin, drug resistance, therapeutic approaches in cancers. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2014;18(11):865–871. doi: 10.4267/2042/54174.
60. Weberpals J, Garbuio K, O'Brien A, et al. The DNA repair proteins BRCA1 and ERCC1 as predictive markers in sporadic ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2009;124(4):806–815. doi: 10.1002/ijc.23987.
61. Li SC, Ma R, Wu JZ, et al. Delineation of gastric cancer subtypes by co-regulated expression of receptor tyrosine kinases and chemosensitivity genes. *Am J Transl Res*. 2015;7(8):1429–1439.
62. Hsu LC, White RL. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(22):12983–12988. doi: 10.1073/pnas.95.22.12983.
63. Mullan PB, Quinn JE, Gilmore PM, et al. BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene*. 2001;20(43):6123–6131. doi: 10.1038/sj.onc.1204712.
64. He Q, Zhang M, Zhang J, et al. Predictive value of BRCA1 expression on the efficacy of chemotherapy based on antimicrotubule agents: a pooled analysis across different malignancies and agents. *Ann Transl Med*. 2016;4(6):110. doi: 10.21037/atm.2016.03.27.
65. Chen W, Wang J, Li X, et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in gastric cancer. *Med Oncol*. 2013;30(1):423. doi: 10.1007/s12032-012-0423-5.
66. Wei KK, Jiang L, Wei YY, et al. The prognostic value of ERCC1 expression in gastric cancer patients treated with platinum-based chemotherapy: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014;35(9):8721–8731. doi: 10.1007/s13277-014-2128-1.
67. Iqbal S, McDonough S, Lenz HJ, et al. A randomized phase II pilot study prospectively evaluating treatment for patients based on ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementing 1) for advanced/metastatic esophageal, gastric, or gastroesophageal junction cancer: SWOG S1201. *J Clin Oncol*. 2017;35(Suppl):4009. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.4009.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\***Киркеева Фатима Магомедовна** [*Fatima M. Kirkeeva*];

**Адрес:** 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1 [address: 1, Moskvorechie street, 115522 Moscow, Russia];  
**тел.:** +7 (499) 324-12-39, **e-mail:** BRCA1@mail.ru, **SPIN-код:** 5902-4070, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4778-9726>

**Музаффарова Татьяна Александровна**, к.м.н. [*Tatiana A. Muzaffarova*, MD, PhD];

**e-mail:** tatiana.muzaffarova@mail.ru, **SPIN-код:** 4657-2770, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2345-2056>

**Никулин Максим Петрович**, к.м.н. [*Maxim P. Nikulin*, MD, PhD];

**e-mail:** maximpetrovich@mail.ru, **SPIN-код:** 9455-5566, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9608-4696>

**Апанович Павел Васильевич** [*Pavel V. Apanovich*];

**e-mail:** Apanovich2004@mail.ru, **SPIN-код:** 6748-9211, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6576-5512>

**Карпукhin Александр Васильевич** [*Alexander V. Karpukhin*, PhD, Professor];

**e-mail:** karpukhin@med-gen.ru, **SPIN-код:** 2929-1276, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

О.Л. Морозова, П.Ф. Литвицкий\*, Д.А. Морозов, Л.Д. Мальцева

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова  
(Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

# Механизмы развития нефросклероза у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом\*

*В обзоре для специалистов системы высшего медицинского образования обсуждается проблема рефлюкс-нефропатии: дано определение, охарактеризованы эпидемиология и факторы риска ее развития у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом, причины и молекулярные механизмы формирования и прогрессирования фиброза почек при рефлюкс-нефропатии, а также маркеры диагностики и прогнозирования течения заболевания.*

**Ключевые слова:** рефлюкс-нефропатия, дети, фиброз почек, цитокины, биомаркеры повреждения почек, пузырно-мочеточниковый рефлюкс.  
(Для цитирования: Морозова О.Л., Литвицкий П.Ф., Морозов Д.А., Мальцева Л.Д. Механизмы развития нефросклероза у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом. *Вестник РАМН*. 2018;73(4):273–278. doi: 10.15690/vramn1021)

## Введение

Пузырно-мочеточниковый рефлюкс (ПМР) — особая форма врожденных уротатий у детей, которая характеризуется нарушением замыкательной функции уретеро-везикального соустья, что приводит к обратному току мочи в верхние отделы мочевыводящих путей, повышению внутримочеточникового и внутрилоханочного давления, подавлению, вплоть до угнетения, сократительной активности стенок мочеточников и лоханок, лоханочно-почечному рефлюксу [1]. Распространенность ПМР в детской популяции колеблется в диапазоне от 0,4 до 1,8%. Самым опасным осложнением ПМР является фиброз почек, который развивается у 30–60% детей на фоне персистирующей инфекции мочевыводящих путей. Рефлюкс-нефропатия неизбежно приводит к формированию хронической почечной недостаточности, которая у 1/3 больных требует заместительной терапии и трансплантации почек.

Экспериментально подтверждено, что острое воспаление мочевыводящих путей с последующим развитием рефлюкс-нефропатии возможно даже при однократном забросе инфицированной мочи в вышележащие отделы [1]. ПМР играет ключевую роль в инициации фиброза паренхимы почек и диагностируется у 30–60% детей с фиброзом паренхимы почек, у 100% детей и 50% взрослых с фиброзом паренхимы на фоне хронического пиелонефрита, у 30–50% детей с рецидивирующим пиелонефритом [1].

При этом фиброз паренхимы почек более характерен для пациентов с пиелонефритом, чем для «стерильного» рефлюкса, а частота его возникновения коррелирует со степенью выраженности ПМР. В ряде случаев своевременное выявление и ликвидация высоких степеней ПМР (IV–V) дают возможность предотвратить повреждение почек и замедлить прогрессирование уже имеющейся рефлюкс-нефропатии. Однако у отдельных пациентов отмечается прогрессирование заболевания даже после устранения воспаления мочевыводящих путей на фоне ПМР. Это требует дополнительных исследований для определения факторов риска и изучения механизмов фиброза почечной паренхимы [1, 2].

273

## Рефлюкс-нефропатия

### Характеристика понятия

Рефлюкс-нефропатия (РН) — это форма патологии почек, возникающая вследствие пузырно-мочеточникового рефлюкса мочи и характеризующаяся развитием необратимых процессов в почечной ткани в виде фокального склероза [1, 3]. РН сопровождается интерстициальным воспалением, фиброзом паренхимы, дилатацией и атрофией стенок канальцев разной степени выраженности, а в 25–60% случаев становится причиной терминальной стадии хронической почечной недостаточности на фоне ПМР.

\* При написании обзора использованы фрагменты собственного текста, впервые опубликованные в работах [1, 2].

Olga L. Morozova, Peter F. Litvitskiy\*, Dmitri A. Morozov, Larisa D. Maltseva

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),  
Moscow, Russian Federation

## Mechanisms of Nephrosclerosis Development in Children with Vesicoureteral Reflux

*The review discusses the issue of reflux nephropathy for specialists of the system of higher medical education: the article provides the definition, characterizes the epidemiology, risk factors for disease development in children with vesicoureteral reflux, causes and molecular mechanisms of renal fibrosis formation and progression in reflux nephropathy, markers for diagnosing and predicting the disease course.*

**Key words:** reflux nephropathy, children, renal fibrosis, cytokines, kidney injury biomarkers, vesicoureteral reflux.

(For citation: Morozova OL, Litvitskiy PF, Morozov DA, Maltseva LD. Mechanisms of Nephrosclerosis Development in Children with Vesicoureteral Reflux. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2018;73(4):273–278. doi: 10.15690/vramn1021)

Р. Р. Бейли в начале 70-х годов предложил термин «рефлюкс-нефропатия» для описания почечных аномалий, которые были отмечены в почках у пациентов с диагнозом ПМР при морфологическом исследовании [1]. Этот термин обсуждается по настоящее время, и в литературе можно встретить различные его варианты: рефлюкс-нефропатия, сморщивание почек, рубцевание почек, фиброз почек, нефросклероз. Это связано, прежде всего, с отсутствием однозначного понимания механизмов инициации фиброза почечной паренхимы, особенно места его первичной локализации. «Рубцевание почек» — термин, адекватный, в первую очередь, для описания фибротических изменений, обнаруживаемых посредством различных инструментальных методов визуализации — статической нефросканиграфии, магнитно-резонансной томографии, ультразвукового исследования. В зависимости от локализации поражения нефрона «фиброз почек» и «нефросклероз» часто разделяют на гломеруло-склероз и тубулоинтерстициальный фиброз. В настоящее время четко установлено, что в основе развития фиброза лежит ремоделирование тубулоинтерстициальной ткани [2]. Именно этот процесс предопределяет скорость прогрессирования хронических заболеваний почек, которые выражаются развитием неспецифического воспаления в интерстиции бактериальной или абактериальной природы с вовлечением в процесс канальцев, кровеносных и лимфатических сосудов. Исход указанного процесса представлен межтубулярным фиброзом, атрофией канальцев и вторичным сморщиванием гломерул, которые составляют морфологический субстрат РН [1, 4, 5].

### Факторы риска развития рефлюкс-нефропатии

К основным факторам риска развития РН относят двустороннее поражение при ПМР, рефлюкс высоких степеней (IV–V), мужской пол и персистирующую инфекцию мочевыводящих путей [3].

Риск развития РН определяется также и уровнем внутрилоханочного давления, поскольку его повышение на фоне ПМР приводит к повышению внутриканальцевого давления. Длительное растяжение и компрессия повреждают тубулоэпителиальные клетки и активируют синтез ряда провоспалительных цитокинов, факторов роста, гемокинов и молекул адгезии. Эти цитокины стимулируют пролиферацию окружающих клеток, обеспечивают ремоделирование базальных мембран, приток лейкоцитов в область повреждения, обуславливая формирование воспалительного инфильтрата. Помимо этого, под действием вышеперечисленных цитокинов происходит ускорение синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса клетками паренхимы почек, что имеет существенное значение в формировании ее фиброза [1, 3].

Важно также, что как в эмбриональном, так и в более позднем периоде формирования мочеточников и нижних мочевыводящих путей решающее значение имеют сигнальные системы, влияющие на процессы роста, развития, репарации и регенерации различных органов и тканей [1]. К ним относятся рецепторы с тирозинкиназной активностью (гены *Gdnf*, *Ret*), сигнальная система Wnt- (гены *Ctnnb1*, *Wnt7b*, *Wnt9b*, *Fzd1*) и сигнальная система Hedgehog (гены *Shh*, *Gli3*, *Smo*, *Tshz3*), участвующие в регуляции процессов деления и созревания клеток, TGF β (трансформирующий фактор роста β — гены *Bmp4*, *Smad4*), ядерный рецептор ретиноевой кислоты (гены *Rara*, *Rarb*), геном ренин-ангиотензиновой системы (гены *Agt*, *Ren*, *Agtr1*, *Agtr2*). Некоторые заболевания нижних мочевыводящих путей, такие как инфекции, а также поли-

морфизм генов модифицируют активность этих сигнальных систем, что в конечном итоге приводит к возрастанию риска развития как ПМР, так и РН [1].

### Ключевые звенья патогенеза рефлюкс-нефропатии у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом

Рефлюкс-нефропатия развивается в результате хронического воспалительного процесса в почечной паренхиме под действием повреждающих факторов эндогенной (например, при повышенном давлении в мочевыводящих путях и повреждении тубулоэпителиальных клеток) и экзогенной (присоединение инфекции мочевыводящих путей) природы. Под хроническим понимают длительно (свыше 6 нед) протекающий воспалительный процесс, сопровождающийся повторными эпизодами альтерации, персистирующей инфильтрацией ткани мононуклеарными клетками (макрофагами, лимфоцитами, плазматическими клетками и др.) и развитием фиброза [4–6].

Таким образом, в патогенезе РН можно выделить три ключевых компонента:

- повторяющееся повреждение тубулоэпителиальных клеток;
- активацию мононуклеаров и инфильтрацию ими зоны повреждения;
- эпи-/эндотелиально-мезенхимальный переход с образованием избыточного количества миофибробластов [1].

### Роль макрофагов в прогрессировании рефлюкс-нефропатии

В настоящее время роль макрофагов в патогенезе РН у детей изучена недостаточно. Предложена теория, согласно которой повреждение и воспаление паренхимы почек находятся в реципрокных отношениях. В зоне альтерации почечной ткани рекрутированные моноциты крови дифференцируются под влиянием микроокружения в макрофаги определенного фенотипа. Под фенотипом макрофага понимается популяция клеток, сходных по поверхностным маркерам, спектру продуцируемых цитокинов, метаболизму и функциям [2, 4, 6]. Согласно существующей в настоящее время концепции, макрофаги делятся на 2 группы — классически активированные (фенотип M1) и альтернативно активированные (фенотип M2) [2, 4]. В процессе повреждения паренхимы продукты распада клеточных элементов стимулируют Toll-подобные рецепторы макрофагов, что обеспечивает их активацию по классическому пути (M1). Активированные макрофаги синтезируют ряд провоспалительных цитокинов — интерлейкины (Interleukin, IL) 6 и 1 и фактор некроза опухоли (Tumor necrosis factor, TNF) α, а также супероксид-анионы и свободные радикалы, что способствует персистенции воспаления в почечной паренхиме и ее дальнейшему неспецифическому повреждению. Фенотип M1 формируется при стимуляции макрофагов липополисахаридом (Lipopolysaccharide, LPS), интерфероном (Interferon, IFN) γ и в целом характеризуется провоспалительной активностью. Макрофаги с фенотипом M2 подразделяются еще на 3 группы — M2a, индуцируемые IL4 и IL13; M2b, активируемые иммунными комплексами и IL-1β (или LPS); M2c, инициируемые IL10 и трансформирующим ростовым фактором β (Transforming growth factor, TGF) или глюкокортикостероидами. Для фенотипа M2 характерна противовоспалительная активность [2]. Следует подчеркнуть, что выделение указанных выше фенотипов весьма условно, поскольку *in vitro* они могут формироваться под влиянием определенных комбинаций цитокинов, взятых в конкретной дозировке. При

исследовании макрофагов в живых системах выявляется множество неполных и переходных фенотипических состояний. Более того, количество выделяемых фенотипов есть производная числа анализируемых фенотипических маркеров [2].

Важным свойством макрофагов является фенотипическая пластичность, то есть способность макрофагов изменять свой фенотип в зависимости от условий микроокружения [2, 4, 6]. Так, на ранних стадиях развития воспаления макрофаги приобретают фенотип M1, для которого характерна продукция таких медиаторов воспаления, как активные формы кислорода, TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL12, IL15, IL18, IL23, монооксид азота, матриксная металлопротеиназа-12 (MMP-12) и др., способствующих вторичной альтерации ткани почки и развитию нефросклероза. По мере прогрессирования патологического процесса и развития фиброза наблюдается постепенная трансформация фенотипа M1 в фенотип M2. Макрофаги M2 продуцируют TGF- $\beta$ 1, инсулиноподобный фактор роста 1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1), тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived growth factor, PDGF), фактор роста фибробластов 2 (Fibroblast growth factor, FGF-2) и другие профибротические цитокины. Многочисленные данные литературы [1, 2, 4] указывают на то, что TGF- $\beta$ 1, одним из основных источников которого являются именно рекрутированные макрофаги, играет ведущую роль в формировании и прогрессировании нефросклероза. Так, установлено, что TGF- $\beta$ 1 способствует превращению фибробластов, перицитов и клеток тубулярного эпителия в миофибробласты, являющиеся основными продуцентами компонентов экстрацеллюлярного матрикса, тогда как IGF-1, PDGF и FGF-2 способствуют выживанию и пролиферации миофибробластов. Определенный вклад в развитие нефросклероза вносят продуцируемые макрофагами галектин-3, стимулирующий активность фибробластов, и MMP-9, потенцирующая трансформацию клеток тубулярного эпителия в миофибробласты (эпителиально-мезенхимальный переход) [1, 2]. Кроме того, накопление большого количества макрофагов в интерстициальном пространстве приводит к нарушению внутривисцеральной гемодинамики и усиленному образованию ангиотензина II, обладающего выраженным профибротическим действием. Имеются также данные [2], что при изменении микроокружения макрофаги сами могут трансформироваться в коллагенпродуцирующие миофибробластоподобные клетки. Большинство исследований однозначно указывает на ведущую патогенную роль макрофагов в развитии нефросклероза [1, 2, 4]. Вместе с тем не исключено, что макрофаги могут также способствовать разрешению воспалительного процесса и препятствовать избыточному образованию компонентов экстрацеллюлярного матрикса.

Таким образом, макрофаги являются центральным звеном развития нефросклероза при РН. Этому существует ряд экспериментальных доказательств:

- макрофаги всегда присутствуют в зоне активного фиброгенеза почечной паренхимы;
- количество макрофагов в ткани почки прямо коррелирует с выраженностью нефросклероза;
- избирательное удаление макрофагов из очага воспаления значительно уменьшает выраженность нефросклероза;
- трансфузия макрофагов в очаг повреждения потенцирует альтерацию и ускоряет развитие нефросклероза [2].

### Миофибробласты — основной клеточный субстрат рефлюкс-нефропатии

В настоящее время вопрос о происхождении миофибробластов, в том числе в тканях почки при РН у детей, остается предметом многочисленных дискуссий исследователей. Допускается, что миофибробласты — результат трансдифференцировки. Этот процесс представляет собой превращение одной зрелой (!) специализированной клетки в другую зрелую (!) специализированную клетку под влиянием микроокружения без перехода в промежуточное плюрипотентное состояние (т.е. превращение «напрямую») [1, 2, 4]. Чаще всего трансдифференцировке подвергаются тубулоэпителиальные клетки. В результате этого происходит так называемый эпителиально-мезенхимальный переход. Существуют данные о преобладании и эндотелиально-мезенхимальной трансформации (прямой трансформации клетки эндотелия в клетку мезенхимы) [1]. Предшественниками миофибробластов также могут быть перициты, резидентные фибробласты почек и моноцит-дифференцированные фибробласты. TGF- $\beta$ 1 является основным двигателем фиброгенеза почек, который включает повреждение/апоптоз эпителия канальцев клетки, инфильтрацию воспалительными клетками почечной паренхимы, интерстициальную активацию фибробластов и избыточный синтез/накопление избытка внеклеточного матрикса. Это приводит к нарушениям функций почек и в конечном счете к хронической и конечной стадии заболевания [1, 2]. TGF- $\beta$ 1 активирует рецептор ALK5 типа I с серин-тирозинкиназной активностью (который далее участвует в фосфорилировании SMAD2/3), а также неканонические пути (например, src-киназа, EGFR, JAK/STAT, p53), которые интегративно управляют генетической программой фиброгенеза. Такая интеграция сигналов имеет существенные патофизиологические последствия. Действительно, TGF- $\beta$ 1 стимулирует активацию и сборку комплексов p53-SMAD3, необходимых для транскрипции ингибитора активатора плазминогена-1, фиброзных генов, фактора роста соединительной ткани и TGF- $\beta$ 1.

Важную роль в процессе фиброобразования ткани почек играют миофибробласты. Эти клетки экспрессируют  $\alpha$ -гладкомышечный актин ( $\alpha$ -Smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) и сходны по своим свойствам и функциям с фибробластами. В процессе повреждения почки в ее интерстиции появляется *de novo* множество  $\alpha$ -SMA-позитивных миофибробластов, которые продуцируют широкий спектр компонентов экстрацеллюлярного матрикса — коллагены, фибронектины, эластины, фибриллины, TGF- $\beta$ -связывающие белки, тенасцины и протеогликаны. Избыточное накопление этих компонентов матрикса ведет к развитию фиброза [1, 2].

В зависимости от источника синтез компонентов соединительной ткани может заканчиваться как их репарацией, так и грубыми фибротическими изменениями. Важную роль в процессе фиброобразования почек играют миофибробласты. Эти клетки экспрессируют  $\alpha$ -SMA и сходны по своим свойствам и функциям с фибробластами. В процессе повреждения почки в ее интерстиции появляется *de novo* множество  $\alpha$ -SMA-позитивных миофибробластов, которые продуцируют широкий спектр компонентов экстрацеллюлярного матрикса — коллагены, фибронектины, эластины, фибриллины, TGF- $\beta$ -связывающие белки, тенасцины и протеогликаны. Избыточное накопление компонентов экстрацеллюлярного матрикса сопровождается развитием фиброза [1–3].

*Диагностика рефлюкс-нефропатии и рубцовых изменений паренхимы почек*

В настоящее время в педиатрической практике применяется широкий арсенал методов диагностики РН: экскреторная урография, ультразвуковое исследование с доплерографией почечного кровотока, магнитно-резонансная и компьютерная томография, радиоизотопное сканирование [1, 3]. Однако каждый из методов имеет свои недостатки и ограничения, которые необходимо учитывать, особенно при обследовании пациентов младшей возрастной группы.

Основным методом стандартного обследования урологического пациента в предыдущее десятилетие являлась экскреторная урография, основанная на рентгенологической оценке состояния функционирующей паренхимы. Низкая информативность в ранней диагностике РН, а также нередкое развитие аллергических и токсических реакций на введение йодосодержащих препаратов привели к ограничению использования этого метода у детей.

В настоящее время в детской урологической практике скрининговым методом изменений структуры и размеров паренхимы, собирательной системы почек является ультразвуковое исследование благодаря своей относительной безопасности, скорости выполнения, экономичности и высокой точности. Однако метод позволяет улавливать фиброзные изменения в почках только на поздних этапах развития РН. Допплерография почечного кровотока и определение индекса резистивности на межлобевых артериях позволяют заподозрить фибротические изменения в паренхиме почек. Показано, что у пациентов с тяжелой степенью фиброза, сопровождающейся значимым уменьшением размеров почки и количества функционирующей паренхимы, отмечается значительное разнообразие резистивных показателей ренального кровотока [1]. Однако повышение индекса резистивности у детей с фиброзом почек имелось не всегда, что связано с открытием артериовенозных шунтов — универсальным патофизиологическим механизмом компенсации повышенного периферического сопротивления. Этот феномен предопределяет отсутствие прямой зависимости между степенью фиброза почек и показателями периферического сопротивления артериального ренального кровотока. Известно, что у пациентов различных возрастных групп с obstructивными уропатиями скоростные характеристики почечного кровотока вариабельны, что не позволяет проводить однозначную трактовку результатов и достоверно диагностировать РН. Кроме того, методы ультразвуковой визуализации являются субъективными, зависят от квалификации специалиста, выполняющего их, и не дают информации о функциональном состоянии почек.

«Золотым стандартом» регистрации фиброза почек считается статическая нефросцинтиграфия с димеркаптоуксидиновой кислотой (ДМСА), с помощью которой можно определить степень повреждения и объем функционирующей паренхимы по индексу интегрального захвата радиофармпрепарата. Однако известно, что от начала повреждения почечной паренхимы до образования рубца проходит не менее 6 мес, что ограничивает возможность ранней диагностики и профилактики РН [1]. Помимо этого, статическая нефросцинтиграфия с ДМСА имеет ряд недостатков — высокую стоимость, ограничение применения у детей до трехлетнего возраста и высокий риск радиационного облучения.

Таким образом, несмотря на наличие современных высокотехнологичных методов визуализации фиброза почек, имеются ряд ограничений по их применению у

детей, неоднозначность в трактовке их диагностических данных, трудности в оценке начальных этапов развития и мониторинге РН у детей с ПМР.

*Перспективные молекулярные маркеры в диагностике рефлюкс-нефропатии*

Несовершенство инструментальных методов визуализации начальных этапов фиброобразования почек диктует необходимость разработки альтернативных, более чувствительных методов ранней диагностики РН. Одним из направлений такого поиска является молекулярная диагностика, которая позволяет обнаружить возможные повреждения почечной ткани на субклеточном уровне задолго до клинических проявлений патологии, персонализировать нефропротективную терапию и профилактику РН. Исследование молекулярных маркеров можно проводить в любых биологических жидкостях, в том числе и моче, что делает такой метод неинвазивным и доступным, отражающим изменения именно в мочевыводящих путях, а не в организме в целом. Выбор мишеней для молекулярной диагностики РН основан на понимании механизмов инициации и прогрессирования фиброза почек у детей с ПМР.

**Коллаген IV типа — молекулярная основа образования рубцов в почке**

Коллаген является полиморфным белком и основным молекулярным компонентом рубцовой ткани. Коллаген IV типа — ключевой компонент всех базальных мембран, которые представляют собой основу межклеточного вещества [1, 4, 5]. Известно, что в условиях гипоксии происходит нарушение метаболизма соединительной ткани базальной мембраны канальцев почки, что приводит к формированию рубцов за счет замещения коллагена I и III типов коллагеном IV типа. Коллаген IV типа синтезируется клетками проксимальных канальцев под воздействием TGF-β1, индуцированного ангиотензином II и миофибробластами. Показано [1], что определение уровня коллагена IV типа в моче в комплексе с традиционными показателями прогрессии хронического тубулоинтерстициального нефрита позволяет прогнозировать течение РН. Доказано, что ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и блокаторы ангиотензиновых рецепторов 1-го типа оказывают ренопротективный эффект у пациентов с диабетической нефропатией [1]. Следовательно, уменьшение экскреции коллагена IV типа с мочой на фоне применения таких препаратов указывает на значимость этого фактора в развитии фиброза почек.

**TGF-β1 — основной регулятор ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса**

TGF-β1 играет ключевую роль в формировании и прогрессировании фиброза паренхимы почек и РН. Этот цитокин вырабатывается мезангиальными клетками, моноцитами, макрофагами, тромбоцитами. В исследованиях с использованием культуры клеток показана возможность его синтеза тубулоэпителиальными клетками. Действие TGF-β1 на паренхиму почек многогранно и реализуется несколькими путями [1, 2, 4].

Во-первых, TGF-β1 является индуктором эпителиально-мезенхимального перехода [1, 2, 4], стимулируя трансдифференцировку тубулоэпителиальных клеток в миофибробласты, увеличивая тем самым их число в паренхиме почек. Именно это лежит в основе патогенеза фиброза почек [1]. Однако, несмотря на большое число исследований, показывающих возможность трансформации тубулоэпителиальных клеток через механизм эпители-

ально-мезенхимального перехода, *in vitro* подтверждения существования такой трансформации получить пока не удалось.

Во-вторых, TGF- $\beta$ 1 обеспечивает активацию резидентных фибробластов и миофибробластов через сигнальную систему Smad, что приводит к избыточному синтезу экстрацеллюлярного матрикса и в конечном счете негативно сказывается на функции почек. Аккумуляция коллагена I и IV типа в гломерулярной области ведет к нарушению гемодинамики и, соответственно, падению скорости клубочковой фильтрации. Избыточное образование экстрацеллюлярного матрикса в перитубулярном пространстве ухудшает условия трофики почечных канальцев, снижает устойчивость клеток к ишемии. Расстройство ауторегуляции почечного кровотока, обусловленное усилением синтеза реактогенных форм кислорода под влиянием TGF- $\beta$ 1, усиливает нарушение внутривисцеральной гемодинамики. Выраженная гипоксия почечной паренхимы обуславливает последующую гипотрофию и постепенное уменьшение количества функционирующих нефронов [1].

В-третьих, под воздействием TGF- $\beta$ 1 тубулоэпителиальные клетки и миофибробласты синтезируют ряд провоспалительных и профибротических цитокинов, которые поддерживают персистенцию хронического воспаления и провоцируют фиброз паренхимы. Среди них высокая значимость IL1 и ангиотензина II, которые замыкают порочный круг, усиливая продукцию TGF- $\beta$ 1 и ускоряя процесс эпителиально-мезенхимального перехода тубулоэпителиальных клеток [1, 2].

TGF- $\beta$ 1 экскретируется с мочой, что делает возможным измерение его уровня в моче. Благодаря этому использование TGF- $\beta$ 1 в качестве маркера РН представляется весьма перспективным.

#### **МСП-1 — ключевой фактор персистенции интерстициального воспаления**

Моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (Monocytic chemoattractant protein-1, MCP-1) относится к CC-семейству хемокинов и играет ключевую роль в формировании воспалительного инфильтрата в паренхиме почечной ткани [1, 2, 5]. MCP-1 вырабатывается тубулоэпителиальными клетками в ответ на действие провоспалительных цитокинов, гипоксию и протеинурию. Это подтверждается данными исследования образцов мочи детей с обострением хронического пиелонефрита: в моче наблюдалось достоверное повышение уровня как провоспалительных интерлейкинов, так и MCP-1 [1, 2]. MCP-1 активирует рецепторы CCR-2 на мембране подоцитов, вызывая тем самым реорганизацию их цитоскелета и увеличивая подвижность этих клеток. В результате этих процессов повышается проницаемость гломерулярного барьера для альбумина.

Диффундируя через базолатеральную поверхность тубулярных клеток в интерстиций, MCP-1 рекрутирует туда большое количество моноцитов, макрофагов и лимфоцитов. Наличие иммунокомпетентных клеток в зоне поражения дает начало формированию воспалительного инфильтрата и нередко — иммунопатологических процессов. Увеличение размеров воспалительного инфильтрата постепенно приводит к внешнему сдавлению области тубулогломерулярного соединения и образованию атубулярных клубочков. MCP-1 увеличивает количество активированных макрофагов по соседству с канальцевыми эпителиальными клетками, что потенцирует их повреждение. Увеличение воспалительного

инфильтрата совместно с накоплением компонентов матрикса ухудшает условия трофики почечной паренхимы [1, 2].

Выделение MCP-1 через апикальную мембрану тубулоэпителиальных клеток обуславливает его появление в моче. Также показано, что среди других цитокинов именно MCP-1 является биомаркером раннего формирования почечных рубцов у пациентов с нормальной функцией почек [1].

#### **VEGF — ранний индикатор развития рефлюкс-нефропатии**

Повышение внутривисцерального давления в условиях ПМР изменяет гемодинамику в паренхиме почек, что сказывается на ее трофике и снижает устойчивость клеток к ишемии. В ответ на гипоксию почки в ней происходит активация синтеза васкулоэндотелиального фактора роста (Vascular endothelial growth factor, VEGF) [1, 6]. Он образуется подоцитами и принимает участие в регуляции таких процессов, как ангиогенез, лимфогенез и нефрогенез. В исследованиях на крысах определен основной механизм протективного действия VEGF: этот цитокин обеспечивает сохранение неповрежденных гломерулярных капилляров за счет пролиферации эндотелиальных клеток. При этом VEGF не влияет на гипертрофированные гломерулы. Установлена также важная роль VEGF в поддержании перитубулярного кровотока: он оказывает выраженный вазодилатирующий эффект, обусловленный активацией эндотелиальной NO-синтазы [1, 5].

В исследованиях [1] показано повышение уровня экспрессии VEGF у пациентов с хронической болезнью почек. Кроме того, отмечается, что экспрессия VEGF достоверно коррелирует с уровнем макрофагальной инфильтрации паренхимы, плотностью капиллярной сети и выраженностью рубцевания почек. Эти данные подтверждают возможность использования VEGF в качестве раннего маркера РН.

#### **Макрофаги как мишень антинефрофибротической терапии**

В настоящее время наиболее часто в клинической практике в качестве нефропротекторов используются блокаторы ангиотензинпревращающего фермента и рецепторов ангиотензина II. Такая терапия имеет ограничения в связи с трудностью подбора индивидуальной дозы и наличием нежелательных эффектов, в том числе гипотензии. В связи с этим продолжается разработка новых антифибротических терапевтических стратегий. Макрофаги, исходя из ключевой роли в патогенезе РН, являются привлекательными мишенями. Существует четыре основных направления антифибротической макрофаг-ориентированной терапии [2].

1. Снижение рекрутирования моноцитов и макрофагов в ткань почки.

Реализация этой стратегии возможна по нескольким направлениям:

- деплеция (снижение или негативная селекция) пула моноцитов с помощью индукторов апоптоза или препаратов поли- и моноклональных антител;
- предотвращение взаимодействия моноцитов с сосудистым эндотелием, например путем блокады молекул адгезии;
- торможение хемотаксиса моноцитов и макрофагов посредством блокады хемокиновых рецепторов;
- снижение пролиферации рекрутированных моноцитов через блокаду рецептора (c-fms) макрофагального

- колониестимулирующего фактора (M-CSF), регулирующего пролиферацию и дифференцировку клеток моноцитарного ряда.
- Инактивация сигнальных путей и транскрипционных факторов макрофагов.
  - Блокада медиаторов воспаления, продуцируемых макрофагами.
  - Перепрограммирование макрофагов:
    - модификация генотипа макрофагов;
    - изменение фенотипа макрофагов при сохранении исходного генотипа.

### Заключение

Несмотря на большое внимание к проблеме развития рефлюкс-нефропатии у детей и подростков, до настоящего времени не существует надежных методов ее ранней диагностики и эффективной ренопротективной терапии.

Понимание ключевых молекулярно-клеточных механизмов инициации начальных этапов повреждения почек у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом откроет новые перспективы для разработки методов

ранней диагностики рефлюкс-нефропатии, персонализированного лечения и профилактики осложнений этой социально-значимой патологии в широкой педиатрической практике.

### Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа, подготовка и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

### Конфликт интересов

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

### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

### ЛИТЕРАТУРА

- Морозова О.Л., Морозов Д.А., Лакомова Д.Ю., и др. Рефлюкс-нефропатия у детей: ранняя диагностика и мониторинг // *Урология*. — 2017. — №4 — С. 107–112. [Morozova OL, Morozov DA, Lakomova DY, et al. Reflux nephropathy in children: early diagnosis and monitoring. *Urologiya*. 2017;(4):107–112. (In Russ).] doi: 10.18565/urol.2017.4.107-112.
- Морозова О.Л., Будник И.А., Морозов Д.А., и др. Макрофаги — новая мишень антифибротической терапии у детей с обструктивными уропатиями // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. — 2015. — Т.94. — №3 — С. 182–187. [Morozova OL, Budnik IA, Morozov DA, et al. Macrophages — a new target for anti-fibrotic therapy in children with obstructive uropathy. *Pediatrics*. 2015;94(3):182–187. (In Russ).]
- Детская хирургия. Национальное руководство*/Подред. Ю.Ф. Исакова, А.Ф. Дронова. — М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014. — С. 599–604. [*Detskaya khirurgiya: natsional'noe rukovodstvo*. Ed by Isakov Yu.F., Dronov A.F. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. pp. 599–604. (In Russ).]
- Кумар В., Аббас А.К., Фаусто Н., Астер Дж.К. *Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Котрану*. Пер. с англ. / Под ред. Коган Е.А., Серова Р.А., Дубовой Е.А., Павлова К.А. — М.: Логосфера; 2016. — Т. 1. — С. 76–84. [Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Translated from English. Ed by Kogan E.A., Serov R.A., Dubova E.A., Pavlov K.A. Vol. 1. Moscow: Logosfera; 2016. pp. 76–84. (In Russ).]
- Кумар В., Аббас А.К., Фаусто Н., Астер Дж.К. *Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Котрану*. Пер. с англ. / Под ред. Коган Е.А., Серова Р.А., Дубовой Е.А., Павлова К.А. — М.: Логосфера; 2016. — Т. 2. — С. 1029–1098. [Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Translated from English. Ed by Kogan E.A., Serov R.A., Dubova E.A., Pavlov K.A. Vol. 2. Moscow: Logosfera; 2016. pp. 1029–1098. (In Russ).]
- Литвицкий П.Ф. *Клиническая патофизиология*. — М.; 2015. — С. 137–142. [Litvitskiy PF. *Klinicheskaya patofiziologiya*. Moscow; 2015. pp. 137–142. (In Russ).]
- Литвицкий П.Ф. *Алгоритмы образовательных модулей по клинической патофизиологии (профессиональные задачи и тестовые задания). Учебное пособие*. — М.: Практическая медицина; 2015. — С. 313–324. [Litvitskiy PF. *Algoritmy obrazovatel'nykh modulei po klinicheskoi patofiziologii (professional'nye zadachi i testovye zadaniya)*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2015. pp. 313–324. (In Russ).]

### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\**Литвицкий Петр Францевич*, д.м.н., профессор [*Peter F. Litvitskiy*, MD, PhD, Professor];  
 Адрес: Россия, Москва, 119991, ул. Трубетская, д. 8 [address: 8, Trubetskaya street, 119991 Moscow, Russia];  
 e-mail: lisovikp@mail.ru; SPIN-код: 6657-5937; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0151-9114>

*Морозова Ольга Леонидовна*, д.м.н., профессор [*Olga L. Morozova*, MD, PhD, Professor];  
 e-mail: morozova\_ol@list.ru; SPIN-код: 1567-4113; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2453-1319>

*Морозов Дмитрий Анатольевич*, д.м.н., профессор [*Dmitri A. Morozov*, MD, PhD, Professor];  
 e-mail: morozovda209@mail.ru; SPIN-код: 8779-8960; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1940-1395>

*Мальцева Лариса Дмитриевна*, к.м.н, доцент [*Larisa D. Maltseva*, MD, PhD, Professor];  
 e-mail: lamapost@mail.ru; SPIN-код: 7725-2499; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4380-4522>

М.С. Михина\*, В.А. Иоутси, Е.А. Трошина

Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Российская Федерация

# Роль высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии в оптимизации диагностики и лечения заболеваний щитовидной железы

Гормоны щитовидной железы играют неотъемлемую роль в росте, гомеостазе, поддержании физиологических функций и необходимы для нормального развития организма. Именно поэтому точная оценка функции щитовидной железы путем измерения уровней тиреотропного гормона (ТТГ) и гормонов щитовидной железы — общих и свободных фракций тироксина ( $T_4$ ) и трийодтиронина ( $T_3$ ) — важна как для диагностики, так и для лечения заболеваний щитовидной железы. Концентрация тиреоидных гормонов у пациентов без патологии щитовидной железы остается постоянной и коррелирует с уровнем гормонов в тканях и их биологическими эффектами. Однако большинство циркулирующих гормонов связаны с белками плазмы, и только небольшая их часть находится в свободной форме, в связи с чем наиболее часто применяемые в практике методы иммуноанализа имеют ограничения. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии успешно справляется с данной проблемой, надежно улучшая специфичность и точность определения уровня гормонов щитовидной железы, повышая при этом диагностические возможности. Этот метод особенно важен при наличии патологии щитовидной железы и факторах, влияющих на связывание гормонов с белком.

**Ключевые слова:** гормоны щитовидной железы, белок, высокоэффективная жидкостная хроматография — тандемная масс-спектрометрия. (Для цитирования: Михина М.С., Иоутси В.А., Трошина Е.А. Роль высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии в оптимизации диагностики и лечения заболеваний щитовидной железы. Вестник РАМН. 2018;73(4):279–284. doi: 10.15690/vramn984)

279

## Актуальность

Основным гормоном, секретируемым щитовидной железой, является тироксин ( $T_4$ ); лишь небольшая часть трийодтиронина ( $T_3$ ) образуется в щитовидной железе, большая же часть образуется на периферии под действием дейодиназ [1, 2]. Дейодиназа I типа активирует  $T_3$  в печени, почках, щитовидной железе и гипофизе. Дейодиназа

II типа локализуется в эндоплазматическом ретикулуме. Дейодиназа III типа инактивирует  $T_4$  и  $T_3$  посредством дейодирования йодтиронинов на тирозильном кольце, приводя к образованию реверсивных трийодтиронина ( $rT_3$ ) и дейодтиронина ( $rT_2$ ) [1, 3, 4].

В сыворотке большая часть  $T_4$  и  $T_3$  циркулирует в связанном состоянии с белками; самым большим сродством с гормонами щитовидной железы обладает тироксин-

M.S.Mikhina\*, V.A. Ioutsy, E.A. Troshina

Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

## The Role of High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry in Optimizing Diagnosis and Treatment of Thyroid Diseases

Thyroid hormones play an integral role in growth, homeostasis, and maintenance of physiological functions and are necessary for normal development. Therefore, an accurate assessment of thyroid function is important for both diagnosis and treatment of thyroid disorders. Thyroid function is assessed by measuring thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroid hormones: thyroxine ( $T_4$ ), triiodothyronine ( $T_3$ ), total and free fractions. The concentration of thyroid hormones in patients without pathology of the thyroid gland remains constant and correlates with the level of hormones in tissues and their biological effects. However, most circulating hormones are bound to plasma proteins and only a small part is in free form, the most commonly used methods of immunoassay in this connection have limitations. The method of high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) successfully copes with this problem, which allows improving the specificity and accuracy of measurement of thyroid hormones. High performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry allows to achieve specificity, accuracy for reliable determination of the level of thyroid hormones, increasing diagnostic capabilities. This method is especially important in the presence of thyroid gland pathology and factors affecting the binding of hormones to the protein.

**Key words:** thyroid hormones, protein, high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

(For citation: Mikhina MS, Ioutsy VA, Troshina EA. The Role of High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry in Optimizing Diagnosis and Treatment of Thyroid Diseases. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2018;73(4):279–284. doi: 10.15690/vramn984)

связывающий глобулин: при невысокой концентрации в плазме он связывает около 80% всех тиреоидных гормонов. Альбумин имеет наименьшую аффинность, но его концентрация в плазме больше; также тиреоидные гормоны могут находиться в связи с транстиретином [5]. Связывание с этими белками увеличивает длительность биологического полураспада и позволяет транспортировать гормоны в ткани-мишени. Только небольшой процент от общего количества тиреоидных гормонов находится в свободном состоянии. Свободные фракции тиреоидных гормонов обладают большей метаболической активностью, что представляет особый интерес в процессе мониторинга пациентов с нарушениями функции щитовидной железы [5–7].

Точное определение концентрации общих и свободных фракций тироксина и трийодтиронина важно для диагностики, лечения и оценки проводимой терапии при заболеваниях щитовидной железы.

Анализы для измерения свободных фракций тиреоидных гормонов могут быть разделены на две категории: с этапом отделения свободного гормона щитовидной железы от белка (ультрафильтрация и равновесный диализ) и без такового. Первые исследования свободных фракций тиреоидных гормонов проводились с помощью равновесного диализа с целью отделения сывороточных белков перед определением концентрации тиреоидных гормонов методом радиоиммуноанализа [8, 9], однако такой способ является достаточно трудоемким. Большинство клинических лабораторий в настоящее время для измерения свободных фракций  $T_4$  и  $T_3$  используют прямые (аналоговые) методы иммуноанализа [10–12]. Достоверность измерения свободного тиреоидного гормона прямым аналоговым иммуноанализом, без предварительного разделения связывающих белков до сих пор является спорной и имеет множество ограничений, поскольку зависит от способа разведения, температурного режима, буферного состава,  $T_3$ - и  $T_4$ -связывающих способностей сыворотки, концентрации белка в сыворотке и концентрации применяемых антител [13–15].

### Обратная линейная связь между свободным тироксином и тиреотропным гормоном

Гормоны щитовидной железы регулируются секрецией тиреотропного гормона и находятся в отрицательной обратной связи: при снижении уровня тиреоидных гормонов происходит стимуляция гипоталамо-гипофизарной системы, и наоборот [11, 16, 17].

Свободный  $T_4$  ( $_{св.}T_4$ ), определенный ультрафильтрацией или равновесным диализом с последующим определением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС), гораздо лучше коррелирует с уровнем тиреотропного гормона (ТТГ) по сравнению с методами иммуноанализа [18, 19].

По данным клинического исследования M. Serdar получена низкая корреляция свободного тироксина и ТТГ при использовании трех различных платформ иммуноанализа [20]. В аналогичных исследованиях [15], продемонстрировавших большую корреляцию, участвовали пациенты с эутиреозом, из них лишь немногие имели сниженную функцию щитовидной железы, при этом корреляция между  $_{св.}T_4$  и ТТГ была хуже, чем при определении данных показателей путем ультрафильтрации и высо-

коэффициентной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Однако стоит отметить, что корреляция  $_{св.}T_4$  и ТТГ зависит от установленного в каждой конкретной лаборатории референсного интервала показателя  $_{св.}T_4$ . Кроме того, существуют индивидуальные колебания  $_{св.}T_4$  и ТТГ, определяемые генетикой и факторами окружающей среды [15, 16].

Существуют некоторые условия, при которых обратная логарифмическая зависимость между  $_{св.}T_4$  и ТТГ нарушается, а именно: гипоталамическая и гипофизарная недостаточность, резистентность к гормонам щитовидной железы или ТТГ, ТТГ-секретирующие опухоли, синдром нетиреоидной патологии, а также прием препаратов, которые подавляют секрецию ТТГ (допамин, глюкокортикостероиды), прием левотироксина натрия без достижения эутиреоза [21], феномен макротиреотропинеми [22].

### Корреляция $T_3$ и ТТГ

Методы иммунного анализа дают более низкую корреляцию  $T_3$  и ТТГ по сравнению с ВЭЖХ-МС/МС [23]. Кроме того, продемонстрированы более низкая медиана и среднее значение  $T_3$  при измерении с помощью ВЭЖХ-МС/МС в сравнении с методом иммуноанализа в группе лиц с ТТГ >4,5 мМЕ/л и более высокий средний  $T_3$  при ТТГ <0,35 мМЕ/л [24].

Методы иммуноанализа для определения  $_{св.}T_4$  становятся ненадежными, когда связывание белка плазмы различается между стандартом и образцом, как и происходит при изменении связывающего белка или конкурирующих белков.

Таким образом, методы определения свободных фракций должны точно отражать концентрацию без какого-либо вклада связанной фракции. Однако при определении свободного тироксина общая (связанная) фракция также значимо влияет на результаты. Кроме того, анализ определения свободных фракций должен быть валидным для всего диапазона концентраций связывающего белка сыворотки, что не всегда удается достичь рутинными методами [25]. В этой связи методы иммунологических анализов имеют ограничения, поскольку зависят от концентрации белка [26–28].

### Состояния, влияющие на концентрацию белка

Понимание причин и факторов, оказывающих влияние как на связывание  $T_4$  и  $T_3$  с белками, так и на концентрацию этих связывающих белков, имеет решающее значение для разработки и оценки анализов свободных фракций. Наиболее частыми причинами, влияющими на концентрацию белка и тем самым на точность измерения свободных фракций тиреоидных гормонов, являются беременность, почечная недостаточность, синдром нетиреоидной патологии, а также наличие избыточной массы тела.

#### Беременность

Во время беременности снижена функция щитовидной железы отмечается у 2,5% женщин [29].

Щитовидная железа начинает развиваться и синтезировать гормоны на 12-й неделе беременности, до этого времени гормонами щитовидной железы плод обеспечи-

вается за счет матери [30, 31]. Доказано, что гипотиреоз во время беременности связан с нарушениями нейропсихологического развития, а также с акушерскими осложнениями [32–34]. Субклинический гипотиреоз во время беременности также может вызвать осложнения, такие как отслойка плаценты, преждевременные роды и недостаточный вес ребенка при рождении [35, 36]. При этом своевременная диагностика и выявление сниженной функции щитовидной железы позволяют предотвратить неблагоприятные последствия для матери и плода.

При беременности возникают сложности с определением уровней свободных фракций тиреоидных гормонов рутинными методами иммуноанализа [37], в связи с чем обязательно должны использоваться специфические диапазоны значений для каждого триместра беременности.

Кроме изменения концентрации альбумина при беременности, стоит обратить внимание на наличие дейодиназы III типа в плаценте, что также вносит определенный вклад в метаболизм тиреоидных гормонов [38].

Анализ общего  $T_3$  при беременности и в послеродовом периоде имеет плохую корреляцию с измерением методом ВЭЖХ-МС/МС, что свидетельствует о необходимости применения более точного метода, учитывая возможные осложнения при несвоевременном выявлении сниженной функции щитовидной железы [39, 40]. Без сомнений, необходимо дальнейшее исследование у данной группы пациенток для определения триместрспецифичных референсных интервалов при использовании ВЭЖХ-МС/МС.

#### Почечная недостаточность

Хроническая болезнь почек влияет на функцию щитовидной железы различными способами: снижает концентрацию циркулирующих гормонов щитовидной железы, изменяет метаболизм на периферии и снижает связывание тиреоидных гормонов с белками [41].

#### Синдром нетиреоидной патологии

Жизнеугрожающие состояния (инфаркт, инсульт) могут приводить к изменению метаболизма гормонов щитовидной железы (синдром эутиреоидного больного, или синдром нетиреоидной патологии). По разным оценкам, нарушение гормонов щитовидной железы встречается почти у 70% таких больных, из них наиболее частые — снижение  $T_3$  и  $T_4$  и повышение реверсивного  $T_3$  и ТТГ [42]. Этот вопрос принципиален, поскольку тяжесть состояния пациентов требует адекватного и своевременного лечения. Методы иммуноанализа в таких случаях использовать опасно, поскольку они часто дают ложнонизкие показатели свободных фракций тиреоидных гормонов и, как следствие, приводят к назначению терапии без необходимости, что может ухудшить состояние пациентов [43].

Точное измерение свободных  $T_4$  и  $T_3$ , а также реверсивного  $T_3$  с использованием ультрафильтрации и ВЭЖХ-МС/МС, вероятно, позволит понять механизмы развития дисфункции щитовидной железы при синдроме нетиреоидной патологии и улучшить таким образом прогноз эутиреоидных больных.

#### Генетические аномалии связывающих белков

Семейная дисальбуминемическая гипертироксинемия проявляется значительным повышением уровней общих  $T_4$  и  $T_3$  при сохранении нормального уровня ТТГ и эутиреоидного статуса пациента. Это состояние связано с наследуемой мутацией гена альбумина, при которой повышается его аффинность к тиреоидным гормонам

[44, 45]. Для постановки данного диагноза необходимо измерение свободных фракций тиреоидных гормонов путем ультрафильтрации и определения уровня гормонов методом ВЭЖХ-МС/МС.

#### Антитела

Аутоантитела являются одним из источников потенциально ложных результатов для уровней  $T_3$  и  $T_4$  [46, 47]. Кроме того, наличие ревматоидного фактора также может привести к ошибочным результатам при определении свободных фракций тиреоидных гормонов [48].

#### Избыточная масса тела

Недостаточно изученной проблемой остается связь между ожирением и риском аутоиммунной дисфункции щитовидной железы — основной причиной гипотиреоза у взрослых. Сообщается, что распространенность аутоиммунного тиреоидита при ожирении составляет 12,4% у детей и 10–60% у взрослых [49].

Р. Marzullo и соавт. [49] обратились к интригующей гипотезе о связи между ожирением, лептином, аутоиммунностью и гипотиреозом. Исследование показало, что ожирение является фактором риска аутоиммунного заболевания щитовидной железы, тем самым устанавливая связь между основной причиной приобретенной недостаточности щитовидной железы и ожирением [49]. Таким образом, избыточная масса тела также должна быть учтена в оценке уровня ТТГ.

Метод ВЭЖХ-МС/МС дает более уверенную корреляцию между  $T_4$  и уровнем ТТГ в случае наличия у пациента жалоб, характерных для нарушений функции щитовидной железы, а также при отсутствии дисфункции щитовидной железы или предположения ложных показателей по результатам иммунного анализа.

#### Особенности подготовки материала

Выделение свободных фракций тиреоидных гормонов является ключевой задачей в анализе данных объектов. В настоящее время эта задача решается при помощи ультрафильтрации (30–40 мин) и равновесного диализа (несколько часов). Первый метод благодаря ускоренной реализации и вследствие этого возможности постановки его на поток является более предпочтительным. После подготовки материала возможно точное определение уровня свободных форм тиреоидных гормонов высокочувствительными методами, например ВЭЖХ-МС/МС [14, 50, 51]. Несмотря на то, что метод ВЭЖХ-МС/МС является наиболее селективным по сравнению с иммуноанализом, необходимо учитывать, что этап концентрирования (при равновесном диализе или ультрафильтрации) может вносить существенный вклад в точность определения за счет адсорбции анализируемых компонентов на материалах фильтров, приводя к неверной трактовке результатов количественного анализа. Обоснованность применения пробоподготовки не вызывает сомнений, несмотря на увеличение стоимости (при использовании ультрафильтрации стоимость незначительно возрастает) и времени выполнения исследования. В связи с этим необходимо соблюдение четких алгоритмов на каждом этапе определения уровня концентрации гормонов [27, 52, 53].

#### Технические особенности ВЭЖХ-МС/МС

Метод ВЭЖХ-МС/МС представляет собой сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии с чув-

ствительным и селективным масс-спектрометрическим детектированием. Совмещение двух технически разных приборов, первый из которых работает под повышенным давлением жидкости (до 1300 бар), а второй — под высоким вакуумом (до  $10^{-8}$  бар), происходит через источники ионизации при атмосферном давлении (химическая ионизация, фотоионизация, электрораспыление). Электрораспыление широко применяется для так называемых ионогенных соединений, которые способны находиться в растворе в виде ионных солей. За счет этого образование ионов из таких соединений происходит легче, чем для неионных веществ, что повышает общую чувствительность метода.

Тиреоидные гормоны относятся к ионогенным соединениям, в связи с чем большая часть работ по их анализу с применением метода ВЭЖХ-МС/МС была проведена на источниках ионизации посредством электрораспыления [14, 54]. Разделение компонентов происходит обычно на обращенно-фазовых аналитических колонках, детектирование осуществляется масс-спектрометром в режиме мониторинга множественных реакций. Этот режим предусматривает выбор молекулярного или псевдомолекулярного иона анализируемого соединения, его фрагментацию и детектирование наиболее интенсивного и в то же время наиболее характерного фрагментного иона. За счет этого достигается высочайшая селективность, чувствительность метода при этом определяется соотношением сигнал–шум.

Количественный анализ основан на хроматографии, поскольку площади под хроматографическими пиками пропорциональны концентрациям соответствующих веществ независимо от метода детектирования. Для разделения тиреоидных гормонов и получения качественных хроматограмм используют обращенно-фазовые хроматографические колонки, чаще всего C18. Для повышения точности анализа и учета возможных погрешностей применяется метод внутреннего стандарта, который предусматривает добавление в образец вещества, близкого по свойствам к анализируемым компонентам. Градуировка по концентрациям при этом производится в относительных координатах, то есть построением зависимости отношения площадей хроматографических пиков аналита к внутреннему стандарту от отношения их концентраций. Если во все образцы добавляется одинаковое количество внутреннего стандарта, то его концентрацию можно принять за единицу, упростив тем самым расчеты. Масс-спектрометрическое детектирование в данном случае дает уникальную возможность применять внутренние стандарты, имеющие метки стабильных изотопов (D или  $^{13}C$ ). Преимущество перед другими внутренними стандартами заключается в том, что их химические и физические свойства являются практически полностью одинаковыми с анализируемыми компонентами. Изменяется только аналитический сигнал, то есть молеку-

лярная масса, которую можно детектировать тандемным масс-спектрометром независимо от аналитов. Этот подход существенно увеличивает точность количественного анализа, выводя его на принципиально новый уровень по сравнению с любым другим аналитическим методом.

### Заключение

Измерение концентраций свободных фракций тиреоидных гормонов с помощью методов иммуноанализа (иммуноферментный и иммунохемилюминесцентный) у определенных групп пациентов, в том числе с нарушениями связывания белка, с избыточной массой тела и у беременных, является недостаточно точным. Врачи должны знать о существующих ограничениях этих методов, поскольку в настоящее время они являются наиболее используемыми в клинической практике.

Использование ВЭЖХ-МС/МС в рутинной практике кажется сомнительным вследствие высокой стоимости исследования, однако, с экономической точки зрения, само определение уровня свободных фракций тиреоидных гормонов на практике оказывается более выгодным, чем применяемые рутинные методы. В настоящее время компромиссом выглядит определение показаний по уровню ТТГ.

Кроме вышеперечисленных групп больных, пациенты с ТТГ ниже 10-го или выше 90-го перцентиля с наибольшей вероятностью имеют тиреотоксикоз и гипотиреоз и таким образом также являются претендентами для определения тиреоидных гормонов методом ВЭЖХ-МС/МС для точной постановки диагноза и оценки адекватности проводимой терапии.

### Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа и публикация статьи осуществлены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 17-75-30035).

### Конфликт интересов

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

### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

### ЛИТЕРАТУРА

- Little AM. Local regulation of thyroid hormone signaling. *Vitam Horm.* 2018;106:1–17. doi: 10.1016/bs.vh.2017.06.004.
- Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21(2):193–208. doi: 10.1016/j.beem.2007.04.004.
- Al-azzam SI, Alkhateeb AM, Al-Azzeh O, et al. The role of type II deiodinase polymorphisms in clinical management of hypothyroid patients treated with levothyroxine. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(05):300–305. doi: 10.1055/s-0032-1331695.
- Maia AL, Kim BW, Huang SA, et al. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma  $T_3$  in euthyroid humans. *J Clin Invest.* 2005;115(9):2524–2533. doi: 10.1172/jci25083.
- Schussler GC. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid.* 2000;10(2):141–149. doi: 10.1089/thy.2000.10.141.
- Mendel CM, Weisiger RA. Thyroxine uptake by perfused rat liver. No evidence for facilitation by five different thyroxine-binding proteins. *J Clin Invest.* 1990;86(6):1840–1847. doi: 10.1172/jci114914.

7. Christofides ND, Midgley JE. Inaccuracies in free thyroid hormone measurement by ultrafiltration and tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2009;55(12):2228–2229. doi: 10.1373/clinchem.2009.134593.
8. Symons RG, Wellby ML. Assay of serum free T<sub>4</sub>, free T<sub>3</sub> and free rT<sub>3</sub> by equilibration dialysis and radioimmunoassay. *Pathology.* 1979;11(2):321–322. doi: 10.1016/s0031-3025(16)39965-2.
9. Weeke J, Orskov H. Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest.* 1975;35(3):237–244. doi: 10.1080/00365517509095735.
10. Stockigt JR. Free thyroid hormone measurement. A critical appraisal. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001;30(2):265–289. doi: 10.1016/s0889-8529(05)70187-0.
11. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid.* 2003;13(1):3–126. doi: 10.1089/105072503321086962.
12. Nelson JC, Wang R, Asher DT, Bruce Wilcox RB. The nature of analogue-based free thyroxine estimates. *Thyroid.* 2004;14(12):1030–1036. doi: 10.1089/thy.2004.14.1030.
13. Wilcox RB, Nelson JC. Counterpoint: legitimate and illegitimate factors of free-analyte assay function: we need to identify the factors that influence free-analyte assay results. *Clin Chem.* 2009;55(3):442–444. doi: 10.1373/clinchem.2008.120154.
14. Soldin OP, Soldin SJ. Thyroid hormone testing by tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2011;44(1):89–94. doi: 10.1016/j.clin-biochem.2010.07.020.
15. Jonklaas J, Kahric-Janjic N, Soldin OP, Soldin SJ. Correlations of free thyroid hormones measured by tandem mass spectrometry and immunoassay with thyroid-stimulating hormone across 4 patient populations. *Clin Chem.* 2009;55(7):1380–1388. doi: 10.1373/clinchem.2008.118752.
16. Hoermann R, Eckl W, Hoermann C, Larisch R. Complex relationship between free thyroxine and TSH in the regulation of thyroid function. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(6):1123–1129. doi: 10.1530/eje-10-0106.
17. Hansen PS, Brix TH, Sorensen TI, et al. Major genetic influence on the regulation of the pituitary-thyroid axis: a study of healthy Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(3):1181–1187. doi: 10.1210/jc.2003-031641.
18. van Deventer HE, Mendu DR, Remaley AT, Soldin SJ. Inverse log-linear relationship between thyroid-stimulating hormone and free thyroxine measured by direct analog immunoassay and tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2010;57(1):122–127. doi: 10.1373/clinchem.2010.154088.
19. Clark PM, Holder RL, Haque SM, et al. The relationship between serum TSH and free T<sub>4</sub> in older people. *J Clin Pathol.* 2012;65(5):463–465. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200433.
20. Serdar MA, Ozgurtas T, Ispir E, et al. Comparison of relationships between FT<sub>4</sub> and log TSH in Access DXI 800 Unicel, Modular E170 and ADVIA Centaur XP Analyzer. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(10):1849–1852. doi: 10.1515/cclm-2012-0193.
21. Fritz KS, Wilcox RB, Nelson JC. A direct free thyroxine (T<sub>4</sub>) immunoassay with the characteristics of a total T<sub>4</sub> immunoassay. *Clin Chem.* 2007;53(5):911–915. doi: 10.1373/clinchem.2006.083915.
22. Loh TP, Kao SL, Halsall DJ, et al. Macro-thyrotropin: a case report and review of literature *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):1823–1828. doi: 10.1210/jc.2011-3490.
23. Soukhova N, Soldin OP, Soldin SJ. Isotope dilution tandem mass spectrometric method for T<sub>4</sub>/T<sub>3</sub>. *Clin Chim Acta.* 2004;343(1–2):185–190. doi: 10.1016/j.cccn.2004.01.007.
24. Jonklaas J, Davidson B, Bhagat S, Soldin SJ. Triiodothyronine levels in athyreotic individuals during levothyroxine therapy. *JAMA.* 2008;299(7):769–777. doi: 10.1001/jama.299.7.769.
25. Midgley JE. Spurious conclusions on analog free thyroxine assay performance. *Clin Chem.* 2007;53(9):1714–1714. doi: 10.1373/clinchem.2007.090878.
26. Sapin R, d'Herbomez M. Free thyroxine measured by equilibrium dialysis and nine immunoassays in sera with various serum thyroxine-binding capacities. *Clin Chem.* 2003;49(9):1531–1535. doi: 10.1373/49.9.1531.
27. Wang R, Nelson JC, Weiss RM, Wilcox RB. Accuracy of free thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. *Thyroid.* 2000;10(1):31–39. doi: 10.1089/thy.2000.10.31.
28. Christofides ND, Wilkinson E, Stoddart M, et al. Serum thyroxine binding capacity-dependent bias in an automated free thyroxine assay. *J Immunoassay.* 1999;20(4):201–221. doi: 10.1080/01971529909349351.
29. Vaidya B, Anthony S, Bilous M, et al. Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: universal screening or targeted high-risk case finding? *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):203–207. doi: 10.1210/jc.2006-1748.
30. Utiger R. Maternal hypothyroidism and fetal development. *N Engl J Med.* 1999;341(8):601–602. doi: 10.1056/nejm199908193410809.
31. Escobar G, Obregón M, Rey F. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(2):225–248. doi: 10.1016/j.beem.2004.03.012.
32. Lazarus JH, Premawardhana LD. Screening for thyroid disease in pregnancy. *J Clin Pathol.* 2005;58(5):449–452. doi: 10.1136/jcp.2004.021881.
33. Pop VJ, Brouwers EP, Vader HL, et al. Maternal hypothyroxinaemia during early pregnancy and subsequent child development: a 3-year follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;59(3):282–288. doi: 10.1046/j.1365-2265.2003.01822.x.
34. Li Y, Shan Z, Teng W, et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25–30 months. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;72(6):825–829. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03743.x.
35. Casey B, Dashe J, Wells C, et al. Subclinical hypothyroidism and pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol.* 2005;105(2):239–245. doi: 10.1097/01.aog.0000152345.99421.22.
36. Leung AS, Millar LK, Koonings PP, et al. Perinatal outcome in hypothyroid pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet.* 1993;43(2):230–230. doi: 10.1016/0020-7292(93)90343-u.
37. Lee RH, Spencer CA, Mestman JH, et al. Free T<sub>4</sub> immunoassays are flawed during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200(3):260.e1–260.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2008.10.042.
38. Huang SA, Dorfman DM, Genest DR, et al. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(3):1384–1388. doi: 10.1210/jc.2002-021291.
39. Soldin O, Hilakivi-Clarke L, Weiderpass E, Soldin S. Trimester-specific reference intervals for thyroxine and triiodothyronine in pregnancy in iodine-sufficient women using isotope dilution tandem mass spectrometry and immunoassays. *Clin Chim Acta.* 2004;349(1–2):181–189. doi: 10.1016/j.cccn.2004.06.021.
40. Soldin O, Tractenberg R, Soldin S. Differences between measurements of T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> in pregnant and nonpregnant women using isotope dilution tandem mass spectrometry and immunoassays: are there clinical implications? *Clin Chim Acta.* 2004;347(1–2):61–69. doi: 10.1016/j.cccn.2004.03.033.
41. Lim VS. Thyroid function in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(4 Suppl 1):S80–S84. doi: 10.1053/ajkd.2001.27410.
42. Kaptein E, Macintyre S, Weiner J, et al. Free thyroxine estimates in nonthyroidal illness: comparison of eight methods. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;52(6):1073–1077. doi: 10.1210/jcem-52-6-1073.
43. Ross HA, de Rijke YB, Sweep FC. Spuriously high free thyroxine values in familial dysalbuminemic hyperthy-

- roxinemia. *Clin Chem*. 2010;57(3):524–525. doi: 10.1373/clinchem.2010.158170.
44. Cartwright D, O'Shea P, Rajanayagam O, et al. Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia: a persistent diagnostic challenge. *Clin Chem*. 2009;55(5):1044–1046. doi: 10.1373/clinchem.2008.120303.
  45. Martel J, Després N, Ahnadi C, et al. Comparative multicentre study of a panel of thyroid tests using different automated immunoassay platforms and specimens at high risk of antibody interference. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(8):785–793. doi: 10.1515/cclm.2000.112.
  46. Sakata S. Autoantibodies against thyroid hormones or lodothyronine. *Ann Intern Med*. 1985;103(4):579–589. doi: 10.7326/0003-4819-103-4-579.
  47. Sapin R. Serum thyroxine binding capacity-dependent bias in five free thyroxine immunoassays: assessment with serum dilution experiments and impact on diagnostic performance. *Clin Biochem*. 2001;34(5):367–371. doi: 10.1016/s0009-9120(01)00241-7.
  48. Rotondi M, Leporati P, La Manna A, et al. Raised serum TSH levels in patients with morbid obesity: is it enough to diagnose subclinical hypothyroidism? *Eur J Endocrinol*. 2008;160(3):403–408. doi: 10.1530/eje-08-0734.
  49. Marzullo P, Minocci A, Tagliaferri MA, et al. Investigations of thyroid hormones and antibodies in obesity: leptin levels are associated with thyroid autoimmunity independent of bioanthropometric, hormonal, and weight-related determinants. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(8):3965–3972. doi: 10.1210/jc.2009-2798.
  50. Holm SS, Hansen SH, Faber J, Staun-Olsen P. Reference methods for the measurement of free thyroid hormones in blood. *Clin Biochem*. 2004;37(2):85–93. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.09.009.
  51. Gu J, Soldin OP, Soldin SJ. Simultaneous quantification of free triiodothyronine and free thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2007;40(18):1386–1391. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.08.007.
  52. Tikanoja S. Ultrafiltration devices tested for use in a free thyroxine assay validated by comparison with equilibrium dialysis. *Scand J Clin Lab Invest*. 1990;50(6):663–669. doi: 10.3109/00365519009089185.
  53. Langton JE, Brent GA. Nonthyroidal illness syndrome: evaluation of thyroid function in sick patients. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2002;31(1):159–172. doi: 10.1016/s0889-8529(01)00008-1.
  54. Gounden V, Jonklaas J, Soldin S. A pilot study: subclinical hypothyroidism and free thyroid hormone measurement by immunoassay and mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2014;430:121–124. doi: 10.1016/j.cca.2013.12.034.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\**Михина Маргарита Сергеевна* [*Margarita S. Mikhina*, MD];

Адрес: 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11 [address: 11 Dm. Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia],

e-mail: docmikhina@mail.ru, SPIN-код: 3172-5538, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4382-0514>

*Иютси Виталий Алексеевич*, к.х.н. [*Vitaliy A. Ioutsi*, PhD];

e-mail: vitalik\_org@mail.ru, SPIN-код: 9734-0997, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9002-1662>

*Трошина Екатерина Анатольевна*, д.м.н., профессор, член-корр. РАН [*Ekaterina A. Troshina*, MD, PhD, Professor];

e-mail: troshina@inbox.ru, SPIN-код: 8821-8990, ORCID: <http://otcid.org/0000-0002-8520-8702>