



ISSN 2410-5155 (Online), ISSN 2311-4495 (Print)

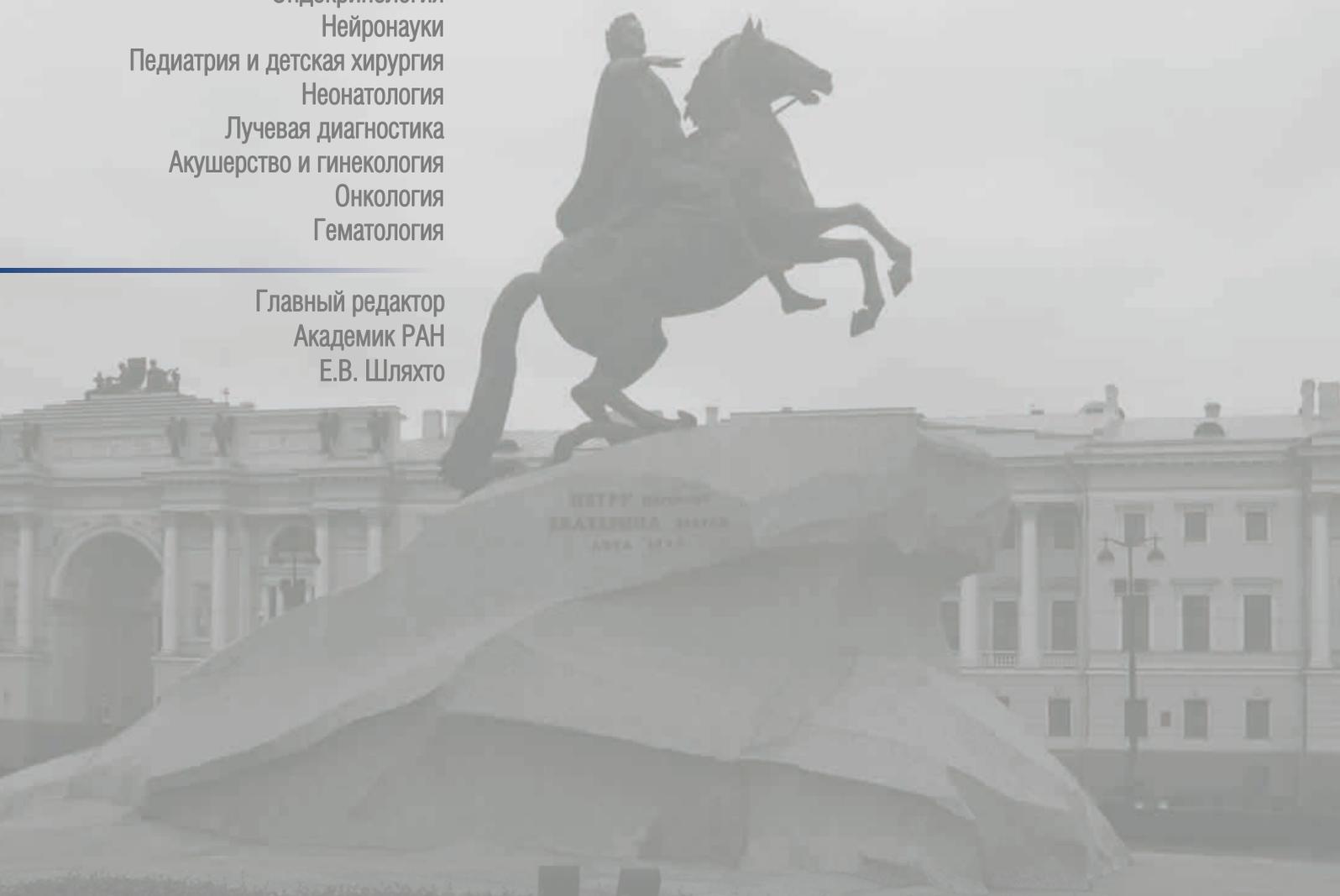
# Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 4 №5 / 2017

Фундаментальная медицина  
Сердечно-сосудистые заболевания  
Эндокринология  
Нейронауки  
Педиатрия и детская хирургия  
Неонатология  
Лучевая диагностика  
Акушерство и гинекология  
Онкология  
Гематология

Главный редактор  
Академик РАН  
Е.В. Шляхто





ISSN 2410-5155 (Online), ISSN 2311-4495 (Print)

# Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 4 №5 / 2017

Фундаментальная медицина  
Сердечно-сосудистые заболевания  
Эндокринология  
Нейронауки  
Педиатрия и детская хирургия  
Неонатология  
Лучевая диагностика  
Акушерство и гинекология  
Онкология  
Гематология

---

Главный редактор  
Академик РАН  
Е.В. Шляхто

**Национальный медицинский  
исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**



**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР**

Е. В. Шляхто

**ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА**

А. О. Конради  
М. М. Галагудза

**ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР**

Н. А. Смолина

**ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ**

|                                    |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| С. В. Анисимов (Санкт-Петербург)   | М. А. Карпенко (Санкт-Петербург)   |
| Е. И. Баранова (Санкт-Петербург)   | Э. В. Комличенко (Санкт-Петербург) |
| Е. Р. Баранцевич (Санкт-Петербург) | А. А. Костарева (Санкт-Петербург)  |
| Т. В. Вавилова (Санкт-Петербург)   | Д. С. Лебедев (Санкт-Петербург)    |
| А. В. Васильев (Москва)            | Ю. Б. Лишманов (Томск)             |
| М. Л. Гордеев (Санкт-Петербург)    | О. М. Моисеева (Санкт-Петербург)   |
| Е. Н. Гринёва (Санкт-Петербург)    | А. О. Недошивин (Санкт-Петербург)  |
| А. А. Жлоба (Санкт-Петербург)      | И. Л. Никитина (Санкт-Петербург)   |
| А. Ю. Зарицкий (Санкт-Петербург)   | Е. В. Пармон (Санкт-Петербург)     |
| Э. Э. Звартау (Санкт-Петербург)    | Д. В. Рыжкова (Санкт-Петербург)    |
| Д. О. Иванов (Санкт-Петербург)     |                                    |

**ЧЛЕНЫ МЕЖДУНАРОДНОГО  
РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА**

Ж. Бакс (Нидерланды)  
Р. Феррари (Италия)  
Р. Хельманн (Германия)  
Г. Ханссон (Швеция)  
Д. Керр (США)  
Ж. Массард (Франция)  
Б. Ольшанский (США)  
М. Орлов (США)  
Т. Сейерсен (Швеция)  
Г. Сёберг (Швеция)  
О. Содер (Швеция)  
Т. Сили-Торок (Нидерланды)  
Я. Вааге (Норвегия)  
Э. К. Айламазян (Санкт-Петербург)  
В. Н. Анисимов (Санкт-Петербург)  
В. Г. Баиров (Санкт-Петербург)  
В. С. Баранов (Санкт-Петербург)  
О. А. Беркович (Санкт-Петербург)  
Л. А. Бокерия (Москва)  
В. Н. Васильев (Санкт-Петербург)  
Т. Д. Власов (Санкт-Петербург)  
А. Я. Гудкова (Санкт-Петербург)  
Е. З. Голухова (Москва)  
И. В. Гурьева (Москва)  
А. С. Галявич (Казань)  
С. Л. Дземешкевич (Москва)  
Д. В. Дупляков (Самара)  
И. Е. Зазерская (Санкт-Петербург)  
Е. В. Заклязьминская (Москва)  
А. М. Караськов (Новосибирск)  
Р. С. Карпов (Томск)  
В. М. Кутузов (Санкт-Петербург)  
В. В. Ломиворотов (Новосибирск)  
Ю. М. Лопатин (Волгоград)  
В. А. Мазурок (Санкт-Петербург)  
А. С. Максимов (Санкт-Петербург)  
Л. Н. Маслов (Томск)  
А. Л. Маслянский (Санкт-Петербург)  
Г. А. Мельниченко (Москва)  
В. М. Моисеенко (Санкт-Петербург)  
И. А. Наркевич (Санкт-Петербург)  
И. В. Поддубный (Москва)  
Е. А. Покушалов (Новосибирск)  
В. П. Пузырёв (Томск)  
В. А. Ткачук (Москва)  
С. В. Сидоркевич (Санкт-Петербург)  
Г. Н. Салогуб (Санкт-Петербург)  
В. В. Фадеев (Москва)  
В. А. Цырлин (Санкт-Петербург)

Журнал зарегистрирован в Государственном комитете РФ по печати.  
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77-56793 от 29.01.2014 г.  
Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Периодичность — 6 выпусков в год  
Тираж — 1100 экземпляров

Тематическая рассылка по специалистам.

Корректор — Л. А. Исаенкова  
Верстка — Л. П. Попова

18+

**Издательство «ФОНД АЛМАЗОВА»**

Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Телефон издательства: +7(812)702-37-16

Подача рукописей и переписка с авторами, размещение рекламы и подписка —  
**e-mail:** [bulleten@almazovcentre.ru](mailto:bulleten@almazovcentre.ru)

**Подписка по каталогу агентства «Роспечать»: подписной индекс 57996**

Архив номеров: [http://www.almazovcentre.ru/?page\\_id=20396](http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396)  
[http://elibrary.ru/title\\_about.asp?id=50986](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986)

Все права защищены. © 2017.

Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных  
в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции.

*Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов*

**V. A. Almazov National  
Medical Research Centre  
Ministry of Health of the Russian Federation**



**EDITOR-IN-CHIEF**

E. Shlyakhto

**VICE -EDITORS**

A. Konradi

M. Galagudza

**TECHNICAL EDITOR**

N. Smolina

**EDITORIAL BOARD**

|                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| S. Anisimov (Saint-Petersburg)    | M. Karpenko (Saint-Petersburg)    |
| E. Baranova (Saint-Petersburg)    | E. Komlichenko (Saint-Petersburg) |
| E. Barancevich (Saint-Petersburg) | A. Kostareva (Saint-Petersburg)   |
| T. Vavilova (Saint-Petersburg)    | D. Lebedev (Saint-Petersburg)     |
| A. Vasiliev (Moscow)              | Yu. Lishmanov (Tomsk)             |
| M. Gordeev (Saint-Petersburg)     | O. Moiseeva (St. Petersburg)      |
| E. Grineva (Saint-Petersburg)     | A. Nedoshivin (Saint-Petersburg)  |
| A. Zhloba (Saint-Petersburg)      | I. Nikitina (Saint-Petersburg)    |
| A. Zaritskiy (Saint-Petersburg)   | E. Parmon (Saint-Petersburg)      |
| E. Zvartau (Saint-Petersburg)     | D. Ryzhkova (Saint-Petersburg)    |
| D. Ivanov (Saint-Petersburg)      |                                   |

**MEM BERS  
OF THE INTERNATIONAL  
EDITORIAL BOARD**

J. Bax (Netherlands)  
R. Ferrari (Italy)  
R. Hehlmann (Germany)  
G. Hansson (Sweden)  
K. David (USA)  
G. Massard (France)  
B. Olshansky (USA)  
M. Orlov (USA)  
T. Sejersen (Sweden)  
G. Sjöberg (Sweden)  
O. Söder (Sweden)  
T. Szili-Torok (Netherlands)  
J. Vaage (Norway)  
E. Aylamazyan (Saint-Petersburg)  
V. Anisimov (Saint-Petersburg)  
V. Bairov (Saint-Petersburg)  
V. Baranov (Saint-Petersburg)  
O. Berkovich (Saint-Petersburg)  
L. Bokeria (Moscow)  
V. Vasiliev (Saint-Petersburg)  
T. Vlasov (Saint-Petersburg)  
A. Gudkova (Saint-Petersburg)  
E. Golukhova (Moscow)  
I. Gurieva (Moscow)  
A. Galyavich (Kazan)  
S. Dzemeshevich (Moscow)  
D. Duplyakov (Samara)  
I. Zazerskaya (Saint-Petersburg)  
E. Zaklyazminskaya (Moscow)  
A. Karaskov (Novosibirsk)  
R. Karpov (Tomsk)  
V. Kutuzov (Saint-Petersburg)  
V. Lomivorotov (Novosibirsk)  
Yu. Lopatin (Volgograd)  
V. Mazurok (Saint-Petersburg)  
A. Maksimov (Saint-Petersburg)  
L. Maslov (Tomsk)  
A. Maslyanskiy (Saint-Petersburg)  
G. Melnichenko (Moscow)  
V. Moiseenko (Saint-Petersburg)  
I. Narkevich (Saint-Petersburg)  
I. Poddubniy (Moscow)  
E. Pokushalov (Novosibirsk)  
V. Puzyrev (Tomsk)  
V. Tkachuk (Moscow)  
S. Sidorkevich (Saint-Petersburg)  
G. Sologub (Saint-Petersburg)  
V. Fadeev (Moscow)  
V. Tsyrlin (Saint-Petersburg)

Journal is registered in State Committee for Publishing of the Russian Federation.  
Certificate of registration. ПИ № ФС77-56793 on 29.01.2014  
The Journal is included in the Russian Citation Index

Periodicity — 6 issues per year  
Edition 1100 copies

Distribution to specialists.

Proofreader — L. A. Isaenkova  
Make-up — L. P. Popova



**Publisher «ALMAZOV FOUNDATION »**  
**Address:** 197341, Saint-Petersburg, Akkuratova str. 2  
**Tel.:** +7(812)702-37-16

Manuscript submission and correspondence with authors,  
advertising and subscription —  
**e-mail:** bulletin@almazovcentre.ru

**Subscription on catalogue of Rospechat agency: index 57996**

Archive: [http://www.almazovcentre.ru/?page\\_id=20396](http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396)  
[http://elibrary.ru/title\\_about.asp?id=50986](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986)

All rights reserved. © 2017.  
Full or partial reproduction of materials printed in journal is allowed by the written  
permission of publisher.

*Editors accept no responsibility for the content of advertising materials.*

**СОДЕРЖАНИЕ****CONTENT****СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ****CARDIOVASCULAR MEDICINE**

**6** Гусинский А.В., Шломин В.В.,  
Рахматиллаев Т.Б., Михайлов И.В., Апресян А.Ю.,  
Фионик О.В., Шатравка А.В., Шарипов Э.М.,  
Пуздряк П.Д., Жердева А.Н., Реджепова Ш.Б.  
**ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ  
АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ  
ПОДВЗДОШНЫХ АРТЕРИЙ МЕТОДОМ  
ПЕТЛЕВОЙ ЭНДАРТЕРЭКТОМИИ**

**6** Gusinskiy A.V., Shlomin V.V.,  
Rakhmatillaev T.B., Mikhaylov I.V.,  
Apresyan A.Yu., Fionik O.V., Shatravka A.V.,  
Sharipov E.M., Puzdryak P.D., Zherdeva A.N.,  
Rejepova Sh.B.  
**SURGICAL TREATMENT  
OF ATHEROSCLEROTIC LESION  
OF ILIAC ARTERIES BY METHOD  
OF LOOPENDARTERECTOMY**

**15** Хуторная М.В., Понасенко А.В.,  
Радивилко А.С., Кутихин А.Г., Жидкова И.И.,  
Крутицкий С.С., Салахов Р.Р., Григорьев Е.В.,  
Головкин А.С.  
**ЗНАЧЕНИЕ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО  
ИММУНИТЕТА В РАЗВИТИИ  
КРИТИЧЕСКИХ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ  
ОСЛОЖНЕНИЙ КОРОНАРНОГО  
ШУНТИРОВАНИЯ**

**15** Khutornaya M.V., Ponasenko A.V.,  
Radivilko A.S., Kutikhin A.G., Zhidkova I.I.,  
Krutitskiy S.S., Salakhov R.R., Grigoryev E.V.,  
Golovkin A.S.  
**IMPACT OF INNATE IMMUNITY GENES  
IN DEVELOPMENT OF CRITICAL  
POSTOPERATIVE COMPLICATIONS AFTER  
CORONARY ARTERY BYPASSES GRAFTING**

**АНЕСТЕЗИОЛОГИЯ И РЕАНИМАТОЛОГИЯ****PAIN, CRITICAL CARE, AND ANESTHESIA**

**28** Саввина И.А., Костарева А.А.,  
Федоров А.В., Рутковский Р.В., Распутина Д.А.,  
Малхозова А.М.  
**РОЛЬ ОБЩИХ АНЕСТЕТИКОВ  
В МОДУЛЯЦИИ СИСТЕМОГО  
ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА  
В ПЕРИОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ**

**28** Savvina I.A., Kostareva A.A., Fedorov A.V.,  
Rutkovskiy R.V., Rasputina D.A., Malkhozova A.M.  
**THE ROLE OF GENERAL ANESTHETICS  
IN MODULATION OF THE SYSTEMIC  
INFLAMMATION RESPONSE DURING  
PERIOPERATIVE PERIOD**

**РАДИОЛОГИЯ****RADIOLOGY**

**37** Титова А.М., Труфанов Г.Е., Фокин В.А.  
**T2\* МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ  
РЕЛАКСОМЕТРИЯ В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ  
НЕИНВАЗИВНОЙ ОЦЕНКЕ ПЕРЕГРУЗКИ  
ЖЕЛЕЗОМ ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА**

**37** Titova A.M., Trufanov G.E., Fokin V.A.  
**T2\* MAGNETIC-RESONANCE  
RELAXOMETRY IN NON-INVASIVE  
QUANTITATIVE IRON OVERLOAD  
ASSESSMENT OF LIVER AND HEART**

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENT

ТКАНЕВЫЕ, КЛЕТОЧНЫЕ, ГЕНОМНЫЕ  
И ПРОТЕОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

## CELL, TISSUE, AND GENE THERAPY

**46** Головкин А.С., Серебрякова М.К.,  
Жидулева Е.В., Муртазалиева П.М., Титов В.А.,  
Иртюга О.Б., Моисеева О.М., Кробинец И.И.,  
Кудрявцев И.В.  
**ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ  
ПУРИНЕРГИЧЕСКОГО СИГНАЛИНГА  
НА Т-ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ  
КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

**46** Golovkin A.S., Serebryakova M.K. ,  
Zhiduleva E.V., Murtazalieva P.M., Titov V.A.,  
Irtuga O.B., Moiseeva O.M., Krobinec I.I.,  
Kudryavtsev I.V.  
**PURINERGIC SIGNALING RECEPTORS  
EXPRESSION ON PERIPHERAL  
T-LYMPHOCYTES OF HEALTHY DONORS**

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## EXPERIMENTAL STUDIES

**61** Князева А.А., Смолина Н.А.,  
Кашерининов И.Ю., Вербило С.Л.,  
Костарева А.А.  
**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ  
БЕЛКИ Z-ДИСКА, ПРИ ГИПЕРТРОФИИ  
МИОКАРДА, ВЫЗВАННОЙ  
РЕНОВАСКУЛЯРНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ  
В МОДЕЛИ «2KIDNEY, 1CLIP»**

**61** Knyazeva A.A., Smolina N.A.,  
Kasherininov I.Y., Verbilo S.L., Kostareva A.A.  
**EXPRESSION OF GENES ENCODING Z-DISC  
PROTEINS IN CARDIAC HYPERTROPHY  
CAUSED BY RENOVASCULAR  
HYPERTENSION IN «1 KIDNEY, 2 CLIP»  
MODEL**

## ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ ПОДВЗДОШНЫХ АРТЕРИЙ МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ЭНДАРТЕРЭКТОМИИ

Гусинский А.В.<sup>1,2</sup>, Шломин В.В.<sup>2</sup>, Рахматиллаев Т.Б.<sup>1,2</sup>,  
Михайлов И.В.<sup>1,2</sup>, Апресян А.Ю.<sup>2</sup>, Фионик О.В.<sup>1</sup>,  
Шатравка А.В.<sup>1</sup>, Шарипов Э.М.<sup>2</sup>, Пуздряк П.Д.<sup>2</sup>, Жердева А.Н.<sup>1</sup>,  
Реджепова Ш.Б.<sup>1</sup>

Контактная информация:  
Тохир Бегмуратович Рахматиллаев  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России  
ул. Аккурадова, д. 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197341.  
E-mail: toxir-aka@mail.ru

Статья поступила в редакцию 27.05.2017  
и принята к печати 23.10.2017.

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр  
им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
<sup>2</sup> Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение  
здравоохранения «Городская многопрофильная больница № 2»,  
Санкт-Петербург, Россия

### Резюме

Актуальность: петлевая эндартерэктомия (ПЭАЭ) является одним из малотравматичных способов современного лечения атеросклероза артерий нижних конечностей.

Цель исследования: определение преимуществ и недостатков эндартерэктомии (ПЭАЭ) подвздошных артерий для более успешного внедрения ее как компонента гибридных технологий.

Материалы и методы: изучению подверглись результаты лечения 131 пациента, страдающего облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей с преимущественным поражением подвздошных артерий. В раннем и позднем (до 5-7 лет) послеоперационных периодах пациентов изучали при помощи анкетного опроса и ультразвукового ангиосканирования, 23 больным выполнена аортоартериография, 68 – СКТ в режиме «ангио».

Результаты: в 107 (81,3%) случаях вмешательство удалось осуществить только из бедренного доступа. Дополнительный доступ в забрюшинное пространство потребовался при выполнении 24 (18,3%) операций. Противопоказания для выполнения ПЭАЭ: выраженный кальциноз с поражением всех слоев сосудистой стенки, гипоплазия, извитость или аневризматические расширения подвздошных артерий, высокая окклюзия брюшной аорты. У этих пациентов шунтирование синтетическим протезом является вмешательством выбора. В раннем послеоперационном периоде произошел тромбоз 5 (3,8%) подвергшихся ПЭАЭ подвздошных артерий. Послеоперационный койко-день составил 8+-2 дня. Пятилетняя выживаемость после ПЭАЭ составила 77,1%.

Выводы:

- 1) Проведенное исследование показало, что ПЭАЭ является перспективным, а может быть и приоритетным вмешательством на подвздошных артериях.
- 2) Отдаленные результаты проходимости подвздошных артерий после ПЭАЭ достоверно выше, чем у синтетических шунтов, установленных в аорто-бедренную позицию.
- 3) Отказ от применения синтетических заменителей или сведение их использования до минимума (только в качестве заплат) значительно уменьшает опасность инфекционных осложнений.

**Ключевые слова:** облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, поражение аорто-бедренного сегмента, хирургическое лечение, ранние и отдаленные результаты, полузакрытая петлевая эндартерэктомия.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (5): 6–14.

## SURGICAL TREATMENT OF ATHEROSCLEROTIC LESION OF ILIAC ARTERIES BY METHOD OF LOOP ENDARTERECTOMY

Gusinskiy A.V.<sup>1,2</sup>, Shlomin V.V.<sup>2</sup>, Rakhmatillaev T.B.<sup>1,2</sup>,  
Mikhaylov I.V.<sup>1,2</sup>, Apresyan A.Yu.<sup>2</sup>, Fionik O.V.<sup>1</sup>,  
Shatravka A.V.<sup>1</sup>, Sharipov E.M.<sup>2</sup>, Puzdryak P.D.<sup>2</sup>, Zherdeva A.N.<sup>1</sup>,  
Rejepova Sh.B.<sup>1</sup>

**Corresponding author:**  
Tohir B. Rahmatillaev  
Almazov National Medical Research Centre  
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,  
Russia, 197341  
E-mail: toxir-aka@mail.ru

<sup>1</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia  
<sup>2</sup> St. Petersburg State Budgetary Institute of Healthcare  
“City Multiprofile Hospital № 2”, Saint Petersburg, Russia

Received 27 May 2017;  
accepted 23 October 2017.

### Abstract

**Background:** loop endarterectomy (LEA) is one of the low-traumatic methods of modern treatment of arteries of the lower extremities atherosclerosis.

**Objective:** determining the advantages and disadvantages of loop endarterectomy of iliac arteries for successful implementation as a component of hybrid technology.

**Materials and methods:** the study was carried the results of treatment of 131 patients with obliterating atherosclerosis of lower limb arteries, with a preferential defeat of the iliac arteries. All patients underwent unilateral or bilateral LEA. In the early and late (5-7 years) postoperative periods all the patients were studied using a questionnaire survey and ultrasonic angioscanning, 23 patients underwent aorto-angiography, 68 – MSCT-scan.

**Results:** 107 (81,3%) cases the intervention was released only from the femoral access. Additional access to the retroperitoneal space required when performing a 24 (18,3%) operations. Specific to LEA complications was the casting areas of the plaque in the artery, other lower extremities, pronounced calcification with lesion of all layers of the vascular wall hypoplasia, tortuosity or aneurysmal extension to the iliac arteries, high occlusion of the abdominal aorta. In these patients, shunting by synthetic prosthesis is the intervention of choice.

In the early postoperative period occurred thrombosis 5 (3,8%), subjected to loop endarterectomy iliac arteries. Postoperative hospital day was 8+2 days. Five-year survival after LEA is 77.1%.

**Conclusions:** 1) the study showed that LEA is promising, and may be a priority intervention on the iliac arteries. 2) the remote results of patency of the iliac arteries after LEA significantly higher than in synthetic grafts that are installed in the aorto-femoral position.

3) the rejection of the use of synthetic substitutes or their use to a minimum (only as a patch) significantly reduces the risk of infectious complications.

**Key words:** atherosclerosis of arteries of the lower extremities, lesion of the aortofemoral segment, surgical treatment, early and long-term results, loop endarterectomy.

*For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (5): 6–14.*

В настоящее время во всем мире для лечения атеросклеротических поражений подвздошных артерий все шире применяются эндоваскулярные вмешательства, включающие баллонную дилатацию и стентирование [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. Однако наряду с ними существует другой малотравматичный способ лечения, приобретающий все большую популярность — эндартерэктомия при помощи различных петель и колец (ПЭАЭ). ПЭАЭ возможно выполнять не только при ограниченных окклюзиях и стенозах артерий, но и при продленных. А так же данное вмешательство более радикально, чем эндоваскулярные операции [1, 6, 9, 10, 12].

Впервые методика петлевой эндартерэктомии внедрена в практику J.A. Cannon в 50-х годах прошлого века. В настоящее время наиболее известной и широко применяемой модификацией этой методики является полузакрытая эндартерэктомия по технологии J. Vollmar, которая используется с 1956 года. Некоторое время эти методики успешно развивались. Однако позднее были вытеснены шунтирующими операциями с использованием синтетических трансплантатов. К концу 80-х годов обозначился ряд осложнений, связанный с использованием искусственных сосудистых заменителей, что заставило хирургов по-новому взглянуть на продленную эндартерэктомию [9, 13, 14, 15]. Авторы отмечали не только малую травматичность вмешательства, но и хорошие отдаленные результаты кумулятивной сосудистой проходимости, достигающие в течение 5 лет до 90% [9, 14, 15]. Однако реконструировалась в основном наружная подвздошная артерия [15, 16, 17, 18].

На отделении сосудистой хирургии ГМПБ № 2 г. Санкт-Петербурга мы начали применять продленную петлевую эндартерэктомию подвздошных артерий одними из первых в стране с 1996 года, и наиболее широко. К настоящему времени выполнено около 2 тыс. подобных операций.

### Цель работы

Определение преимуществ и недостатков петлевой эндартерэктомии (ПЭАЭ) подвздошных артерий для более успешного внедрения ее в ангиохирургическую практику.

### Материалы и методы:

Изучению подверглись результаты лечения 131 пациента (118 мужчин и 13 женщин), страдающих облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей с преимущественным поражением подвздошных артерий. Всем больным на отделении сосудистой хирургии ГМПБ № 2 выполнена односторонняя или двухсторонняя ПЭАЭ. Средний

возраст пациентов составил  $62,3 \pm 0,68$  лет (от 38 до 86 лет), а средняя длительность заболевания —  $4,9 \pm 0,65$  лет. У 48 (36,6%) больных имелась ишемия нижних конечностей ПБ стадии, у 52 (39,7%) — III стадии, у 31 (23,7%) — IV стадии по классификации хронической ишемии нижних конечностей А.В. Покровского. Таким образом, в большинстве случаев имела место критическая ишемия нижних конечностей. 73 человека страдали гипертонической болезнью, 65 — ишемической болезнью сердца (27 человек в прошлом переносили острый инфаркт миокарда); 12 — сахарным диабетом I или II типа, 28 — ишемической болезнью головного мозга, 25 — язвенной болезнью желудка или 12-ти перстной кишки. Все больные обследованы ультразвуковыми методами, 63 выполнена аортоартериография. Тотальное поражение (окклюзия или критический стеноз) подвздошных артерий имело место в 25 (20,1%) случаях; тотальное поражение подвздошной артерии с одной стороны в 45 (34,4%) случаях; поражение только наружных артерий с обеих сторон в 9 (5,9%) случаях; поражение наружной подвздошной артерии с одной стороны в 52 (39,6%) случаях. Таким образом, односторонние ПЭАЭ выполнены у 97 пациентов, двухсторонние у 34 больных. У 13 пациентов (38,3%) при выполнении двухсторонней ПЭАЭ проходимы были все 4 бедренные артерии (обе поверхностные (ПБА) и глубокие артерии бедра (ГБА), у 10 (29,4%) пациентов — 3 бедренные артерии, а у 11 (32,4%) только две (ГБА с обеих сторон). В случаях одностороннего вмешательства ГБА и ПБА оставались проходимыми у 41 (42,3%) больных, у 56 (57,7%) функционировала только ГБА. Несмотря на проходимость, у 28 пациентов ГБА была значительно сужена в проксимальных отделах и не справлялась с возросшим притоком по подвздошной артерии, что потребовало выполнения феморопрофундопластики. В 34 случаях основное вмешательство было дополнено реконструкцией поверхностной бедренной артерии.

В раннем и позднем (до 5-7 лет) послеоперационных периодах пациентов изучали при помощи анкетного опроса и ультразвукового ангиосканирования, 23-м больным выполнена аортоартериография, 68 — МСКТ в режиме «ангио». Оценка ближайших и отдаленных результатов проводилась в соответствии с рекомендованными стандартами Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов для оценки результатов лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей [19]. 14 образцов наружной подвздошной и общей бедренной артерий были подвергнуты гистологическому исследованию. Забор участков сосудистой

стенки происходил при повторных вмешательствах или в случае смерти пациента. Срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, гематоксилином и пиррофуксином по Ван-Гизону, резорцин-фуксином на эластические волокна, реакцией ШИК на мукополисахариды подвергали микроскопическому изучению методом световой микроскопии.

### Результаты и обсуждение

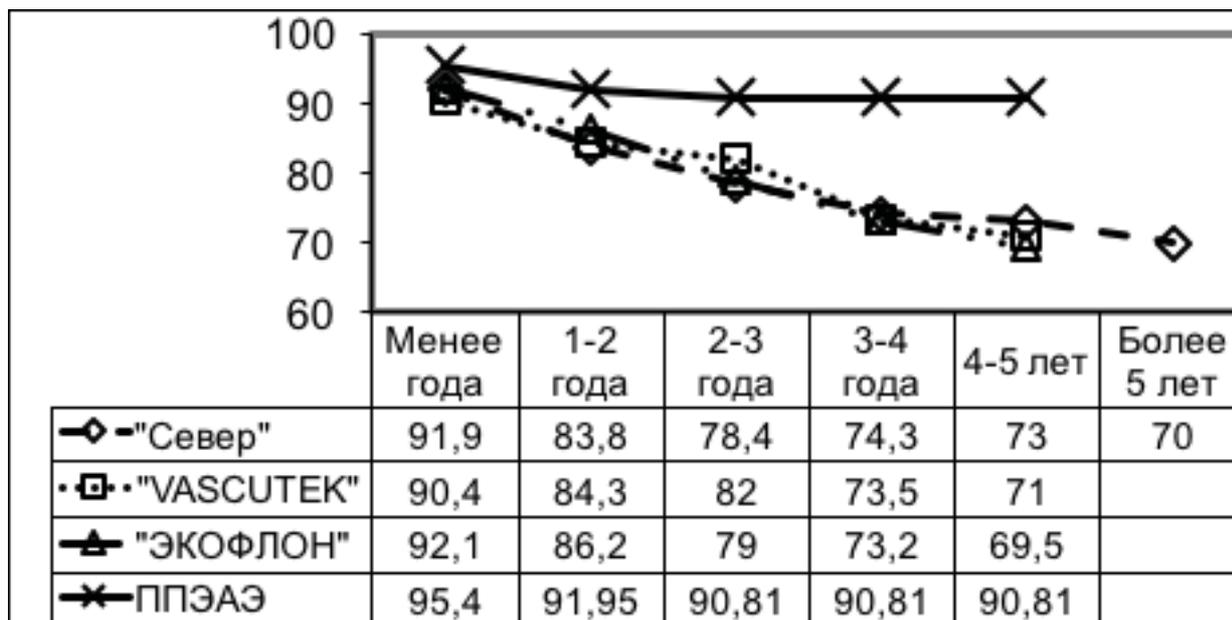
ПЭАЭ выполняли с помощью петель Vollmar производства фирмы Aescular (Германия). Операции выполнялись в условиях эпидуральной анестезии. При возникновении необходимости доступа в забрюшинное пространство операции продолжались в условиях эндотрахеального наркоза. Вмешательство старались выполнять только из бедренного доступа, заводя петлю через отверстие в общей бедренной артерии, поступательно-вращательными движениями отслаивали атеросклеротическую бляшку и затем ее удаляли. В большинстве случаев диссекцию без опасности повреждения артериальной стенки удавалось произвести только в межмышечном слое. Контроль за полнотой эндартерэктомии, при отсутствии возможности ангиографии и ультразвукового сканирования, осуществлялся оценкой появившейся пульсации подвздошной артерии и по характеру струи крови из нее. Артериотомическое отверстие, как правило, закрывали аутовенозной или синтетической заплатой. В 107 (81,6%) случаях (в 81 — при моноклатеральной и в 26- билатеральной реконструкции) вмешательство удалось осуществить только из бедренного доступа. Дополнительный доступ в забрюшинное пространство потребовался при выполнении 24 (18,4%) операций. Основные критерии этого следующие: извитость подвздошных артерий — в 4-х (3,1%) случаях, их выраженный кальциноз — в 15 (11,5%) случаях. У 5 (3,8%) пациентов петлей была повреждена сосудистая стенка. Другим специфическим для моноклатеральной ПЭАЭ осложнением явился заброс участков бляшки в артерии контрлатеральной нижней конечности, что потребовало расширения вмешательства. За годы выполнения ПЭАЭ у нас сложился алгоритм противопоказаний к этой операции: выраженный кальциноз с поражением всех слоев сосудистой стенки вплоть до наружной эластической мембраны, гипоплазия, извитость или аневризматические расширения подвздошных артерий, высокая окклюзия брюшной аорты. У этих пациентов шунтирование синтетическим протезом является вмешательством выбора. При этом необходимо заметить, что высокая окклюзия брюшной аорты является относительным противопоказанием. ПЭАЭ

выполнима при условии забрюшинного доступа. При отсутствии необходимости в длительных операциях оттока время ПЭАЭ, произведенной из бедренного доступа составила  $118,6 \pm 12,9$  минут для двухсторонних реконструкций при условии выделения и зашивания бедренной артерии одновременно двумя бригадами и  $100 \pm 10,9$  мин для односторонних. Если для полноценной эндартерэктомии требовался забрюшинный доступ, время операции увеличивалось до  $196 \pm 27,5$  мин и было сравнимо с таковым при шунтирующих вмешательствах ( $p > 0,05$ ). О значительной атравматичности ПЭАЭ, выполненной только из бедренного доступа, свидетельствует и уровень интраоперационной кровопотери, равной  $327 \pm 24,1$  мл.

В раннем послеоперационном периоде произошел тромбоз 5 (3,8%) подвергшихся ПЭАЭ подвздошных артерий. Основной причиной ранних реокклюзий явилось оставление участка бляшки, формирующего значимый резидуальный стеноз. Представляется, что при выполнении вмешательства под рентгеновским контролем этого осложнения удалось бы избежать. Все тромбозы были устранены повторной ПЭАЭ. В раннем послеоперационном периоде не погиб ни один больной. Пациенты после вмешательства выполненного только с бедра рано начинали вставать и ходить, принимали любую пищу, у них не наблюдалось парезов кишечника. Послеоперационный койко день составил  $8 \pm 2$  дня. При необходимости забрюшинного доступа ранний послеоперационный период протекал тяжелее и больные выписывались из отделения в среднем на  $15 \pm 3$  сутки.

В сроки до 5 лет умерло 27 пациентов. Они были исключены из дальнейшего исследования. Основными причинами смерти были осложнения церебрального и кардиального атеросклероза, а так же онкологические заболевания. Пятилетняя выживаемость после ПЭАЭ составила 77,1%. Еще 17 пациентов выбыли из исследования по разным причинам. Таким образом, в отдаленные сроки (до 5–6 лет), удалось проследить судьбу 87 больных. В позднем послеоперационном периоде в 8 случаях произошел тромбоз реконструированных подвздошных артерий. Причем реокклюзия возникла в основном в первые два года после ПЭАЭ. В 5 случаях причиной тромбоза явилось неполное удаление бляшки с оставлением гемодинамически значимого остаточного стеноза. Еще раз необходимо подчеркнуть, что в случаях использования рентгеновского контроля этого осложнения удалось бы избежать. В одном случае кровообращение удалось восстановить повторной ПЭАЭ, в двух — был сформирован аорто-бедренный шунт. У двоих

**Рисунок 1. Первичная проходимость аорто-бедренных трансплантатов «Север», «Vascutek», «Экофлон» и артерий после ПЭАЭ в отдаленные сроки после операции в процентах**

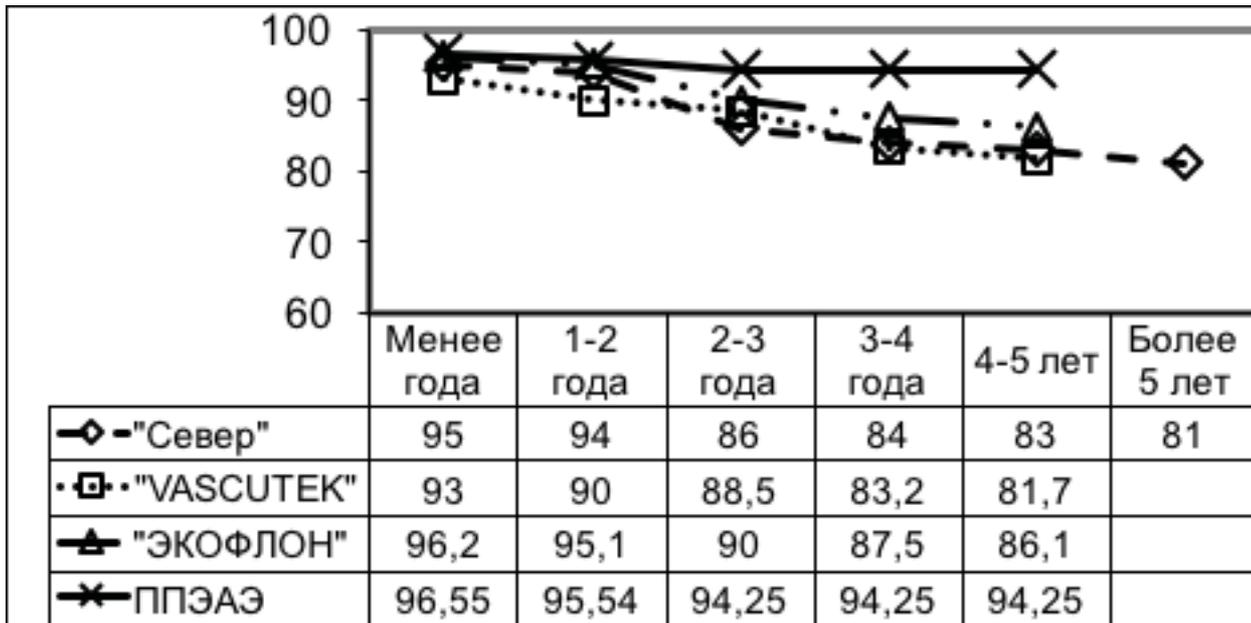


больных, несмотря на ретромбоз, ишемия нижних конечностей не рецидивировала до критической и повторного вмешательства не потребовалось. В трех случаях причинами тромбоза явилось прогрессирование атеросклероза сосудов дистального русла с развитием выраженных изменений в глубокой и поверхностной бедренных артериях, а так же артериях голени. Дальнейшие реконструктивные вмешательства оказались безуспешными и закончились ампутацией нижней конечности на уровне бедра. Необходимо отметить, что результаты первичной и вторичной проходимости подвздошных артерий после ПЭАЭ оказались достоверно выше, чем у основных видов синтетических сосудистых протезов, используемых на уровне аорто-бедренного сегмента ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 1 и 2).

Не отмечено ни одного случая нагноения в области артерий, подвергшихся ПЭАЭ. Этот показатель при использовании искусственных шунтов, имплантированных в то же время, составил 1,8%–2,3% в зависимости от вида протеза. Ни в одном случае не зарегистрировано значимой дилатации эндартерэктомированной артерии, которая потребовала бы повторного вмешательства. По данным УЗАС через 1 месяц после операции внутренняя поверхность подвздошной артерии оставалась гладкой, без наложений. Отмечалась остаточная воспалительная реакция сосудистой стенки на травму, выражающаяся в незначительном равномерном утолщении и небольшой инфильтрации периаортальных тканей. Воспалительная инфильтрация артериальной стенки регрессировала в течение

полугодия. К этому сроку стенка артерии становится равномерно тонкой. В артериях, подвергшихся хирургическим манипуляциям (зона бифуркации аорты, бифуркации общей бедренной артерии) имелись участки с небольшими фрагментами плотных рубцовых тканей. В случае адекватной дезоблитерации внутренняя поверхность артерии до года была лишена наложений, оставалась гладкой. В первые дни после вмешательства отмечалось неравномерное окрашивание подвздошной артерии, по видимому за счет пристеночных наложений фибрина. В эти сроки на спектрограммах при сохраненном ламинарном потоке и систолической фазе не определялась диастолическая фаза, что может свидетельствовать о снижении эластических свойств эндартерэктомированной артерии в раннем послеоперационном периоде. К 8–12 месяцам окрашивание становится равномерным, что говорит о гладкой внутренней поверхности. Эластические свойства сосудистой стенки восстанавливались, о чем свидетельствовала регистрация потока крови в раннюю и позднюю диастолу. К 1,5–2 годам стенка сосуда оставалась тонкой и плотной, без периаортальной инфильтрации. Внутренняя поверхность артерии в основном была гладкой. Однако на этих сроках начиналось диффузное формирование плоских фиброзных бляшек без кальциноза, практически на всем протяжении дезоблитерированной артерии. Их незначительные размеры не приводили к гемодинамически значимому стенозированию сосуда. При неадекватном выполнении ПЭАЭ с неполным удалением атеросклеротически

**Рисунок 2. Вторичная проходимость аорто-бедренных трансплантатов «Север», «Vascutek», «Экофлон» и артерий после ПЭАЭ в отдаленные сроки после операции в процентах**



измененной меди артерии отмечалась более высокая степень неоатерогенеза в этой зоне. Внутренняя поверхность артерии в этих случаях была выполнена неоднородными по структуре, плотности и толщине атеросклеротическими бляшками.

Отмечались значительные различия в выраженности и характере УЗ-картины неоатерогенеза в зонах полной и неполной ПЭАЭ. Однако ни в одном из наблюдений уровень рестеноза не достиг критического.

К 3 годам какой-либо существенной динамики в состоянии стенки артерии и периартериальных тканей в аорто-подвздошно-бедренном сегменте не определялось. Внутренняя поверхность артерии была представлена мелкими, плотными не кальцинированными атеросклеротическими бляшками, которые заполняли половину ее площади. В целом отмечалось увеличение количества рецидивных атеросклеротических бляшек без нарушения гемодинамики в артерии.

УЗ-морфология первичного и рецидивного (после ПЭАЭ) атеросклероза отличалась по степени плотности, размерам и форме атеросклеротических бляшек. В области устья глубокой бедренной артерии, где часто выполнялась более поверхностная ЭАЭ из-за риска перфорации стенки, на этом сроке отмечалось ускоренное формирование атеросклеротической бляшки, по сравнению с участками полноценной ПЭАЭ.

К 4–5 годам наблюдалось «стандартное» прогрессирование атеросклероза в дезоблитерированных артериях, сопровождающееся утолщением и уплотнением бляшек с изменением их формы,

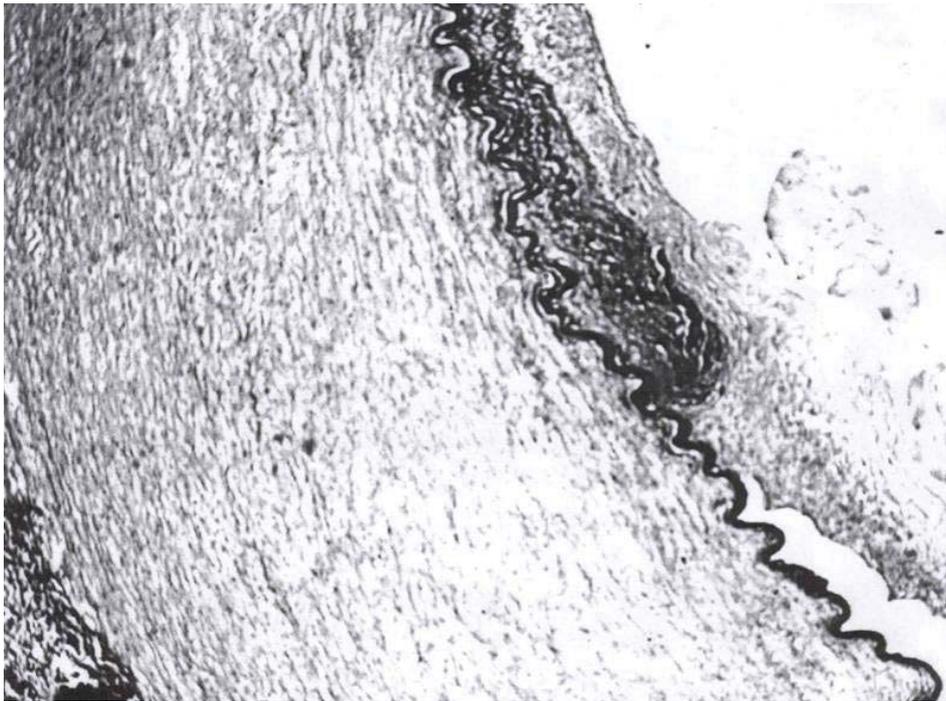
развитием очагового кальциноза, без значительного стенозирования просвета.

Темпы развития рецидивных атеросклеротических бляшек после ПЭАЭ не превышали таковые при первичном атеросклерозе. В зонах артерии, где граничили дезоблитерированная и не дезоблитерированная части сосуда не отмечено избыточной атеросклеротической пролиферации или каких-либо рубцовых изменений самой стенки или периартериальных тканей. В части артерии, не подвергшейся ПЭАЭ, но подвергшейся механическому воздействию во время операции, не отмечалось ускоренного атерогенеза. В отдельных наблюдениях имело место равномерное расширение подвздошной артерии после ПЭАЭ на четверть от первоначального диаметра. Более существенной дилатации не было ни в одном случае.

Отсутствие значимого стенозирования подвздошных артерий за счет пролиферации атеросклеротических бляшек и их аневризматического расширения подтверждают и ангиограммы, выполненные на разных сроках наблюдения.

При морфологическом изучении препаратов отмечено, что после эндартерэктомии с использованием петель Vollmar остается значительная часть средней оболочки, то есть в данном случае диссекция происходит по меди. Толщина стенки не равномерна и зависела от структурных особенностей атеросклеротической бляшки. На сроках до 6–8 мес. в толще стенки отмечались воспалительные явления (умеренная лейкоцитарно-лимфо-

Рисунок 3. Микрофотография стенки артерии после ПЭАЭ



Срок наблюдения 2,5 года. Участок наружной подвздошной артерии. Увеличение 100X. Окраска гематоксилин-эозин. Хорошо сохранена извитая *m. elastica interna* и средняя оболочка. Небольшое разрастание неоинтимы.

цитарная инфильтрация, набухание мышечных клеток), как «ответ» сосуда на травму. По всей окружности артерии были отчетливо видны слои эластических волокон и мембран. Наружная оболочка на этих сроках была довольно толстой, богатой волокнистой соединительной тканью и кровеносными питающими сосудами.

В более поздние сроки (до 1–1,5 лет) при гистологическом изучении отмечалась неодинаковая толщина стенки артерии как за счет неравномерно утолщенной средней оболочки, так и, особенно, за счет разросшейся внутренней оболочки. К этому сроку интима не только была восстановлена на всем протяжении сосуда по толщине и тканевому составу, но и значительно гиперплазирована. Она отграничена от медиального слоя сосуда утолщенной, извитой, а местами расщепленной на две части внутренней эластической мембраной. На некоторых участках внутренней оболочки отмечались небольшие наложения волокнистого или комковатого фибрина. Средняя оболочка так же была утолщена по окружности неравномерно, за счет увеличения количества гладкомышечных волокон и их гипертрофии.

Наружная оболочка образована соединительной тканью и многими мелкими питающими артериальными и венозными сосудами. На границе средней и наружной оболочки располагалась густая сеть эластических волокон и мембран.

К двум годам в стенке функционирующего сосуда были отчетливо различимы 3 слоя: интима, медиа и адвентиция. Признаки воспаления стихали. В дальнейшем, к 3–4 годам, в сосудистой стенке отмечалось развитие атеросклеротических бляшек различной степени выраженности (рисунок 3). При гистологическом изучении реокклюзирующих артерию бляшек отмечена их воспалительная структура. В стенке облитерированной артерии отмечалось сочетание гипертрофии мышечных волокон с лейкоцитарно — лимфоцитарной инфильтрацией и пристеночным тромбозом. Подвздошные артерии, имеющие значительный диаметр и скорость кровотока, несмотря на воспалительный компонент в стенке, стихающий к 1–1,5 годам, оставались не только проходимыми, но и без гемодинамически значимых стенозов. В артериях бедренно — тиббиальной зоны из-за малого диаметра и низкой скорости кровотока (особенно при выраженном поражении артерий голени) утолщение стенки воспалительного характера могло привести к реокклюзии сосуда, подвергнувшегося ПЭАЭ.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что ПЭАЭ является перспективным, а может быть и приоритетным открытым вмешательством на подвздошных артериях. При условии выполнения только из

бедренного доступа эта операция малотравматична, скоротечна и ее хорошо переносят пациенты разных возрастов и с тяжелой сопутствующей патологией. Отдаленные результаты проходимости подвздошных артерий после ПЭАЭ достоверно выше, чем у синтетических шунтов, установленных в аорто-бедренную позицию. Лучшие отдаленные результаты после эндартерэктомии могут быть объяснены менее выраженной гиперплазией неоинтимы в области дистального анастомоза, которая наблюдается при имплантации жесткого синтетического протеза в более мягкую артерию. Гиперплазия неизбежно ведет к стенозированию дистального анастомоза и, в ряде случаев, тромбозу трансплантата [15, 20]. Отказ от применения синтетических заменителей или сведение их использование до минимума (только в качестве заплат) значительно уменьшает опасность инфекционных осложнений. Однако необходим объективный контроль за ходом выполнения вмешательства. Большинство ранних и поздних осложнений ПЭАЭ связаны либо с неполным удалением бляшки, либо с забросом эмболов в артерии контралатеральной стороны. При выполнении операции под рентгенологическим контролем этих осложнений удалось бы избежать. Применение таких приемов из арсенала эндоваскулярной хирургии, как баллонирование и установка стента, поможет устранить резидуальный стеноз подвздошной артерии и повысить эффективность вмешательства.

#### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

#### Список литературы / References

1. Chang RW, Goodney PP, Baek JH, et al. Long-term results of combined common femoral endarterectomy and iliac stenting/stent grafting for occlusive disease. *J Vasc Surg.* 2008;48(2):362-367.
2. Cotroneo AR, Iezzi R, Marano G, et al. Hybrid therapy in patients with complex peripheral multifocal steno-obstructive vascular disease: two-year results. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2007; 30 (3): 355–361.
3. Dosluoglu HH, Lall P, Cherr GS, et al. Role of simple and complex hybrid revascularization procedures for symptomatic lower extremity occlusive disease. *J Vasc Surg.* 2010; 51(6): 1425–1435
4. Ebaugh JL, Gagnon D, Owens CD, et al. Comparison of costs of staged versus simultaneous lower extremity arterial hybrid procedures. *Am J Surg.* 2008; 196 (5): 634–640.
5. Zou J, Xia Y, Yang H, et al. Hybrid endarterectomy and endovascular therapy in multilevel lower extremity arterial disease involving the femoral artery bifurcation. *Int Surg.* 2012; 97 (1): 56–64.
6. Kang JL, Patel VI, Conrad MF, et al. Common femoral artery occlusive disease: contemporary results following surgical endarterectomy. *J Vasc Surg.* 2008; 48 (4): 872–877.
7. Kashyap VS, Pavkov ML, Bena JF, et al. The management of severe aortoiliac occlusive disease: endovascular therapy rivals open reconstruction. *J Vasc Surg.* 2008; 48 (6): 1451–1457, 1457.e1-3.
8. Zhou M, Huang D, Liu C et al. Comparison of hybrid procedure and open surgical revascularization for multilevel infrainguinal arterial occlusive disease. *Clin Interv Aging.* 2014; 9: 1595–1603.
9. Oertli D, Wigger P, Landmann J, Waibel P. Long-term results after open and semiclosed thrombendarterectomy for aortoiliac occlusive disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996; 11 (4): 432–436.
10. Piazza M, Ricotta JJ 2nd, Bower TC, et al. Iliac artery stenting combined with open femoral endarterectomy is as effective as open surgical reconstruction for severe iliac and common femoral occlusive disease. *J Vasc Surg.* 2011; 54 (2): 402–411.
11. Reed AB. Endovascular as an open adjunct: use of hybrid endovascular treatment in the SFA. *Semin Vasc Surg.* 2008; 21 (4): 200–203.
12. Simó G, Banga P, Darabos G, Mogán I. Stent-assisted remote iliac artery endarterectomy: an alternative approach to treating combined external iliac and common femoral artery disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011; 42 (5): 648–655.
13. Royle J, Somjen G, Tong Y. Combined semiclosed iliac endarterectomy and distal arterial reconstruction for multilevel arterial disease. *Cardiovasc Surg.* 1996; 4 (3): 360–363.
14. Schröder A, Mückner K, Riepe G, et al. Semiclosed iliac recanalisation by an inguinal approach-modified surgical techniques integrating interventional procedures. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998; 16 (6): 501–508.
15. van den Dungen JJ, Boontje AH, Kropveld A. Unilateral iliofemoral occlusive disease: long-term results of the semi-closed endarterectomy with the ring-stripper. *J Vasc Surg.* 1991; 14 (5): 673–677.
16. Fokin AA, Vazhenin AV, et al. Thrombendarterectomy from the external iliac artery. *Angiology and vascular surgery=Angiologiya i sosudistaya khirurgiya.* 1996; 1: 107–112. In Russian. [Фокин А.А., Вазенин А.В. Тромбendarектомия из наружной подвздошной артерии. *Ангиология и сосудистая хирургия.* 1996; 1: 107–112].
17. van den Akker PJ, van Schilfgaarde R, Brand R, et al. Long-term results of prosthetic and non-prosthetic reconstruction for obstructive aorto-iliac disease. *Eur J Vasc Surg.* 1992; 6 (1): 53–61.

18. Nelson PR, Powell RJ, Schermerhorn ML, et al. Early results of external iliac artery stenting combined with common femoral artery endarterectomy. *J Vasc Surg.* 2002;35(6):1107-1113.

19. National recommendations for management of patients with vascular arterial pathology. М.: Izdatel'stvo NCSSKH im A.N. Bakuleva RAMN, 2010. p. 176. In Russian. [Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией]. Часть 1. Периферические артерии. М.: Изд-во НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2010. с.176].

20. Pokrovskii AV, Zotikov AE. Perspectives and validity in the treatment of atherosclerotic lesions of the aorta. М.: IPS, 1996. p. 189. In Russian [Покровский А.В., Зотиков А.Е. Перспективы и действительность в лечении атеросклеротических поражений аорты. М.: ИПС, 1996. с. 189].

#### Информация об авторах:

Гусинский Алексей Валерьевич, д.м.н., сердечно-сосудистый хирург ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2»;

Шломин Владимир Владимирович, к.м.н., сердечно-сосудистый хирург СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2»;

Рахматиллаев Тохир Бегмуратович, сердечно-сосудистый хирург ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2»;

Михайлов Игорь Валерьевич, к.м.н., сердечно-сосудистый хирург СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2»;

Апресян Артур Юрьевич, к.м.н., сердечно-сосудистый хирург, сердечно-сосудистый хирург ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2»;

Фионик Ольга Владимировна, д.м.н., профессор ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Жердева Анна Николаевна, сердечно-сосудистый хирург ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России

Шатравка Алексей Валерьевич, к.м.н., сердечно-сосудистый хирург ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шарипов Эдуард Мишович, к.м.н., сердечно-сосудистый хирург СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2»;

Пуздряк Петр Дмитриевич, сердечно-сосудистый хирург СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2»;

Реджепова Ширин Бегмедовна, клинический ординатор, сердечно-сосудистый хирург ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

#### Author information:

Alexey V. Gusinsky, MD, cardiovascular surgeon, Almazov National Medical Research Centre “City Multiprofile Hospital # 2”;

Vladimir V. Shlomin, MD, cardiovascular surgeon, “City Multiprofile Hospital # 2”;

Tohir B. Rakhmatillaev, cardiovascular surgeon, Almazov National Medical Research Centre, “City Multiprofile Hospital # 2”;

Igor V. Mikhailov, MD, cardiovascular surgeon, “City Multiprofile Hospital # 2”;

Artur Yu. Apresyan, MD, cardiovascular surgeon, “City Multiprofile Hospital # 2”;

Olga V. Fionik, MD, Professor, surgeon, Almazov National Medical Research Centre;

Anna N. Zherdeva, cardiovascular surgeon, Almazov National Medical Research Centre;

Alexey V. Shatravka, MD, cardiovascular surgeon, Almazov National Medical Research Centre;

Eduard M. Sharipov, MD, cardiovascular surgeon, “City Multiprofile Hospital # 2”;

Piotr D. Puzdryak, cardiovascular surgeon, “City Multiprofile Hospital # 2”;

Shirin B. Rejepova, clinical resident, cardiovascular surgeon, Almazov National Medical Research Centre.

## ЗНАЧЕНИЕ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В РАЗВИТИИ КРИТИЧЕСКИХ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

Хуторная М.В.<sup>1</sup>, Понасенко А.В.<sup>1</sup>, Радивилко А.С.<sup>1</sup>,  
Кутихин А.Г.<sup>1</sup>, Жидкова И.И.<sup>1</sup>, Крутицкий С.С.<sup>1</sup>,  
Салахов Р.Р.<sup>1</sup>, Григорьев Е.В.<sup>1</sup>, Головкин А.С.<sup>2</sup>

**Контактная информация:**  
Хуторная Мария Владимировна  
ФГБНУ «НИИ КПССЗ»  
Сосновый бульвар, д. 6, Кемерово,  
Россия, 650002  
E-mail: masha\_hut@mail.ru

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем  
сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр  
им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Статья поступила в редакцию 30.08.2017  
и принята к печати 08.11.2017.

### Резюме

**Введение.** Появление критических осложнений (полиорганной недостаточности — ПОН) после операций коронарного шунтирования является результатом нарушения функций иммунитета, что обусловлено особенностями реагирования иммунной системы у конкретного индивидуума и генетическим программированием, которое реализуется через врожденный иммунный ответ. **Цель исследования.** Оценить вклад наследственной компоненты на основании анализа частоты встречаемости аллельных вариантов локусов генов рецепторов врожденного иммунного ответа в развитие критических послеоперационных осложнений коронарного шунтирования. **Материалы и методы.** Проведено исследование с включением 680 пациентов с атеросклерозом коронарных артерий, перенесших операцию коронарного шунтирования. Генотипирование полиморфных локусов генов *TREM-1* и *TLRs* осуществлялось методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. **Результаты.** Обнаружено, что аллель G полиморфного варианта rs1817537 (OR = 2,94 (95%CI = 1,09-7,92); p = 0,019), аллель T rs2234246 (OR = 3,64 (95%CI = 1,24-10,73); p = 0,0076) и аллель T rs3804277 (OR = 2,94 (95%CI = 1,09-7,92); p = 0,019) гена *TREM-1* по доминантной модели наследования ассоциированы с повышенным риском развития ПОН в послеоперационном периоде. Со сниженным риском развития ПОН в послеоперационном периоде были ассоциированы: аллель C rs3775073 гена *TLR6* (OR = 0,33 (95%CI = 0,15-0,71); p = 0,0045), аллель A rs7768162 *TREM-1* (OR = 0,46 (95%CI = 0,21-0,98); p = 0,043) по доминантной модели наследования и генотип T/T rs4711668 *TREM-1* (OR = 0,22 (95%CI = 0,05-0,97); p = 0,015) по рецессивной модели наследования. **Заключение.** Носительство редких аллелей в отдельных полиморфных сайтах генов врожденного иммунитета демонстрирует свою значимость в развитие полиорганной недостаточности после операции коронарного шунтирования.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца; полиорганная недостаточность; коронарное шунтирование, врожденный иммунитет; *TREM-1*; *TLR*.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (5): 15–27

# IMPACT OF INNATE IMMUNITY GENES IN DEVELOPMENT OF CRITICAL POSTOPERATIVE COMPLICATIONS AFTER CORONARY ARTERY BYPASSES GRAFTING

Khutornaya M.V.<sup>1</sup>, Ponasenko A.V.<sup>1</sup>, Radivilko A.S.<sup>1</sup>,  
Kutikhin A.G.<sup>1</sup>, Zhidkova I.I.<sup>1</sup>, Krutitskiy S.S.<sup>1</sup>,  
Salakhov R.R.<sup>1</sup>, Grigoryev E.V.<sup>1</sup>, Golovkin A.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,  
Kemerovo, Russia

<sup>2</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author  
Maria V. Khutornaya  
Research Institute for Complex Issues  
of Cardiovascular Diseases  
Sosnoviy blvd., 6  
Kemerovo, Russia, 650002  
E-mail: masha\_hut@mail.ru

Received 30 August 2017  
accepted 08 November 2017.

## Abstract

**Introduction.** Postoperative critical complications after coronary artery bypass grafting are the result of innate immunity functioning that related with individual features and sometimes genetically determined. **The aim:** to evaluate the contribution of innate immunity genes polymorphisms in the development of critical postoperative complications of coronary artery bypass grafting. **Design and methods:** 680 patients with coronary artery disease after coronary artery bypass grafting were involved in the investigation. *TREM-1* and *TLR* genes polymorph loci were genotyped using allele-specific real-time PCR. **Results.** It was found that allele G rs1817537 (OR = 2,94 (95%CI = 1,09-7,92); p = 0,019), allele T rs2234246 (OR = 3,64 (95%CI = 1,24-10,73); p = 0,0076) and allele T rs3804277 (OR = 2,94 (95%CI = 1,09-7,92); p = 0,019) of *TREM-1* gene are associated with high risk of multiple organ failure while allele C rs3775073 *TLR6* (OR = 0,33 (95%CI = 0,15-0,71); p = 0,0045), allele A rs7768162 *TREM-1* (OR = 0,46 (95%CI = 0,21-0,98); p = 0,043) and T/T genotype of rs4711668 *TREM-1* (OR = 0,22 (95%CI = 0,05-0,97); p = 0,015) are associated with decreased risk. **Conclusion.** Rare alleles in some polymorphic sites of innate immunity genes demonstrate the importance in multiple organ failure development.

**Key words:** coronary artery disease; multiple organ failure; coronary bypass grafting; innate immunity; *TREM-1*; *TLR*.

For citation: *Translyatsionnaya meditsina — Translational Medicine*. 2017; 4 (5): 15–27.

## Список сокращений<sup>^</sup>

АГ — артериальная гипертензия  
ИБС — ишемическая болезнь сердца  
ИК — искусственное кровообращение  
ИМ — инфаркт миокарда  
СВР — системная воспалительная реакция  
КШ — коронарное шунтирование,  
ПОН — полиорганная недостаточность

## Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, а также ведущей причиной инвалиди-

зации и смертности как в РФ, так и в других странах мира [1]. Одним из основных и наиболее эффективных способов лечения данной категории пациентов на сегодняшний день является проведение шунтирующих операций на сердце. Однако данная операция часто сопровождается развитием системной воспалительной реакции (СВР) неинфекционного генеза [2, 3]. Запуск чрезмерно активного системного ответа обусловлено не только наличием патологических состояний, но и воздействием на организм целого комплекса повреждающих факторов (интенсивная терапия с использованием широкого спектра лекарственных препаратов, средства

для наркоза, хирургическая травма, контакт клеток крови с контуром аппарата искусственного кровообращения) [2]. В ряде ситуаций СВР носит характер осложненного [4].

Крайней степенью выраженности СВР является полиорганная недостаточность (ПОН), развивающаяся в 1–2% случаев всех кардиохирургических вмешательств. Осложненный СВР и ПОН являются критическими состояниями, увеличивающими риск летального исхода до 80% [4].

До настоящего времени в кардиохирургической практике возникали трудности с разграничением неосложненного и осложненного СВР. Клиническими критериями системного воспалительного ответа считали наличие у пациента хотя бы двух признаков, предложенных R.C. Vane в 1991 году на Согласительной конференции Американского колледжа пульмонологов и Общества медицины критических состояний (США) [5]. В связи с недостаточно полной характеристикой данного клинического состояния и низкой специфичностью данных критериев (температура тела более 38 °С или менее 36 °С, частота сердечных сокращений более 90 уд/мин; частота дыхания более 20 в минуту; уровень лейкоцитов крови более  $12 \times 10^9/\text{л}$  или менее  $4 \times 10^9/\text{л}$  и содержание молодых форм гранулоцитов более 10) в последние годы многие авторы предлагали различные диагностические исследования, которые также не получили широкого клинического применения в кардиохирургии. В конце 2016 года на 3-й Согласительной конференции по сепсису [6] было рекомендовано использовать шкалу SOFA (Sepsis-Related Organ Failure Assessment) для диагностики пациентов с СВР инфекционного и неинфекционного генеза, в которой суммарная оценка складывается из показателей выраженности недостаточности различных систем организма (сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной, выделительной, пищеварительной, гемостаза и функции печени).

Предполагается, что условиями для развития СВР могут быть не только возраст, основная и сопутствующая патология пациента, особенности терапии, но и иммунологические факторы, генетически детерминированные, обуславливающие особенности реагирования иммунной системы у конкретного индивидуума [4].

Важными эффекторами врожденного иммунитета являются Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs), триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках (Triggering receptor expressed on myeloid cells, TREM-1) и цитокины. При этом Toll-подобные рецепторы признаны

ключевыми регуляторами восприимчивости к инфекционным и неинфекционным заболеваниям, а TREM-1 является модулятором интенсивности внутриклеточных сигналов, способным синергетически амплифицировать воспалительную реакцию. Гены, кодирующие эти белки, характеризуются структурной консервативностью, выработанной в процессе эволюции [7]. Тем не менее полиморфизм с однонуклеотидными заменами, присущий и этим генам, может сопровождаться изменением структуры и экспрессии кодируемых ими белков, что, в свою очередь, определяет характер протекания иммунного ответа [8].

Проблема прогнозирования, предупреждения и раннего интенсивного лечения пациент-ассоциированных послеоперационных осложнений, среди которых наибольший научно-практический интерес вызывает ПОН, является чрезвычайно важными с клинической точки зрения. Проблема предиктивной персонализированной медицины является наиболее значимой для осуществления правильного ведения пациентов в дооперационном и в раннем послеоперационном периоде коронарного шунтирования (КШ).

### Цель

На основании анализа частоты встречаемости аллельных вариантов локусов генов рецепторов врожденного иммунного ответа оценить вклад наследственной компоненты в развитие критических послеоперационных осложнений коронарного шунтирования.

### Материалы и методы

Данная работа выполнена в рамках регистра аортокоронарного шунтирования (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2012620868 от 27.08.2012 г. «Электронный архив пациентов, перенесших операцию аортокоронарного шунтирования»). В исследование включено 680 пациентов (539 мужчин (79,3 %) и 141 женщина (20,7 %) в возрасте от 33 до 78 лет (средний возраст 59 лет)) с диагнозом ишемической болезни сердца, которым в плановом порядке проведено оперативное вмешательство на коронарных артериях. Диагноз ИБС устанавливали согласно Национальным рекомендациям Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению стабильной стенокардии. При оценке функционального класса стенокардии применяли Канадскую классификацию, для характеристики хронической сердечной недостаточности использовали классификацию Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA).

Большинству — 592 (87,1 %) больным хирургическое вмешательство было проведено в условиях нормотермического непульсирующего искусственного кровообращения (ИК) в условиях кардиоплегического ареста с использованием кровяной холодной кардиopleгии и стандартизованным протоколом перфузии, остальным 88 (12,9 %) — на работающем сердце. Данная выборка пациентов характеризуется отсутствием в анамнезе злокачественных опухолей, сопутствующих аутоиммунных и психических заболеваний, острых инфекций и хирургических осложнений в послеоперационном периоде. Все пациенты являются жителями Кемеровской области и принадлежат к европеоидной расе. Они были ознакомлены с условиями исследования и подписали добровольное информированное согласие на участие в нем. Работа была одобрена локальным этическим комитетом института.

Учитывая течение раннего послеоперационного периода, все пациенты ретроспективно были разделены на две группы по наличию или отсутствию ПОН на основании объективных критериев состояния организма в послеоперационном периоде.

Динамическую оценку выраженности органной недостаточности в послеоперационном периоде проводили с использованием шкалы SOFA [6, 9].

Так, в первую группу без ПОН вошли 650 пациентов (95,6 %) с неосложненным течением раннего послеоперационного периода и без клинически выраженных признаков полиорганной недостаточности (оценка по шкале SOFA от 0 до 4 баллов), а вторую группу с ПОН составили 30 пациентов (4,4 %), у которых в раннем послеоперационном периоде было диагностировано осложнённое течение раннего послеоперационного периода с клинической картиной ПОН (SOFA 4 и более баллов). Летальность в стационаре после оперативного вмешательства, у данной категории пациентов, составила 50%. Основные клиничко-анамнестические характеристики обследуемой когорты представлены в таблице 1.

Материалом для исследования послужили образцы геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции с протеиназой К [10]. Концентрацию и качество выделения ДНК проверя-

Таблица 1. Основные клиничко-анамнестические характеристики обследованных больных

| Характеристики  |           | Пациенты с ПОН<br>(n = 30),<br>n (%) | Пациенты без<br>ПОН<br>(n = 650),<br>n (%) | p            |
|---|-----------|--------------------------------------|--|--------------|
| Пол   | Женщины   | 6 (20,0)                             | 135 (20,8)                                 | 0,898        |
|   | Мужчины   | 24 (80,0)                            | 515 (79,2)                                 |              |
| Возраст   | до 60 лет | 11 (36,7)                            | 379 (58,3)                                 | <b>0,031</b> |
|   | ≥ 60 лет  | 19 (63,3)                            | 271 (41,7)                                 |              |
| Курящие   |           | 9 (30,0)                             | 226 (34,8)                                 | 0,733        |
| Ожирение (ИМТ>30 кг/м <sup>2</sup> )                    |           | 12 (40,0)                            | 224 (34,5)                                 | 0,669        |
| Сахарный диабет 2-го типа                               |           | 9 (30,0)                             | 191 (29,4)                                 | 0,895        |
| Артериальная гипертензия                                |           | 27 (90,0)                            | 596 (91,7)                                 | 0,732        |
| Инфаркт миокарда  |           | 23 (76,7)                            | 470 (72,3)                                 | 0,754        |
| Значимые нарушения ритма                                |           | 8 (26,7)                             | 191 (29,4)                                 | 0,909        |
| Стенозы брахицефальных артерий ≥ 50 %                   |           | 7 (23,3)                             | 88 (13,5)                                  | 0,214        |
| Острое нарушение мозгового кровообращения (ишемическое) |           | 5 (16,7)                             | 54 (8,3)                                   | 0,171        |
| Хр. ишемия головного мозга                              |           | 8 (26,7)                             | 176 (27,1)                                 | 0,872        |
| Хр. ишемия нижних конечностей                           |           | 13 (43,3)                            | 153 (23,5)                                 | <b>0,024</b> |
| Хр. обструктивная болезнь легких                        |           | 4 (13,3)                             | 14 (2,2)                                   | <b>0,006</b> |
| Хр. почечная недостаточность                            |           | 2 (6,7)                              | 30 (4,6)                                   | 0,647        |

ли на спектрофотометре «NanoDrop-2000» («TFS», США). Генотипирование осуществляли методом TaqMan с использованием флуоресцентно-меченных зондов производства компании «Applied Biosystems» (США) в формате полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на анализаторе «ViiA™7» («Applied Biosystems», США) в соответствии с инструкцией производителя.

В исследование включены 16 полиморфных вариантов изучаемых генов, для отбора которых использовались базы данных dbSNP, SNPinfo и SNPnexus: *TREM-1* (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, rs2234237), *TLR1* (rs5743551, rs5743611), *TLR2* (rs3804099, rs5743708), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs3775073, rs5743810). Выбор

однонуклеотидных полиморфных сайтов был обусловлен достаточной для исследования степенью гетерозиготности, функциональной активностью исследуемых рецепторов и полным отсутствием исследований, оценивающих роль того или иного полиморфного локуса в развитии ранних послеоперационных осложнений КШ. Характеристика полиморфных сайтов генов врожденного иммунного ответа представлена в таблице 2.

Статистический анализ проводили с использованием пакетов программного обеспечения «Statistica 10.0», «SNPStats», «Prism 6». При анализе результатов генотипирования учитывали соответствие наблюдаемого распределения частот генотипов ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга (HWE) с помощью теста  $\chi^2$ .

Таблица 2. Характеристика полиморфных сайтов генов семейства *TLRs* и *TREM-1*

| Полиморфизм   | Место локализации | MAF  | Нуклеотидная замена | Аминокислотная замена |
|---------------|-------------------|------|---------------------|-----------------------|
| <i>TLR1</i>   |                   |      |                     |                       |
| rs5743551     | интрон            | 0,43 | CTGAG[C/T]AGCTT     |                       |
| rs5743611     | экзон             | 0,02 | TAATA[C/G]AATCC     | Arg80Thr              |
| <i>TLR2</i>   |                   |      |                     |                       |
| rs3804099     | экзон             | 0,41 | CAGAA[C/T]GTAAG     | Asn199Asn             |
| rs5743708     | экзон             | 0,01 | GCTGC[A/G]GAAGA     | Arg753Gln             |
| <i>TLR4</i>   |                   |      |                     |                       |
| rs4986790     | экзон             | 0,06 | CGATG[A/G]TATTA     | Asp299Gly             |
| rs4986791     | экзон             | 0,04 | GACAA[C/T]CAGCC     | Thr399Ile             |
| <i>TLR6</i>   |                   |      |                     |                       |
| rs3775073     | экзон             | 0,46 | CATAA[C/T]GAAAA     | Lys421Lys             |
| rs5743810     | экзон             | 0,12 | GAGGT[A/G]CAACC     | Ser249Pro             |
| <i>TREM-1</i> |                   |      |                     |                       |
| rs1817537     | интрон            | 0,37 | CCTTT[C/G]TGTTT     |                       |
| rs3804277     | интрон            | 0,37 | AGTGC[C/T]CCACC     |                       |
| rs6910730     | интрон            | 0,27 | GCAAG[A/G]AATCT     |                       |
| rs7768162     | интрон            | 0,29 | AAAAA[A/G]TAACT     |                       |
| rs2234246     | 3' UTR            | 0,37 | TCACC[C/T]GCTAT     |                       |
| rs4711668     | интрон            | 0,30 | CTGGA[C/T]TTTGG     |                       |
| rs9471535     | интрон            | 0,16 | ATTCC[C/T]ACTGC     |                       |
| rs2234237     | экзон             | 0,16 | AATTA[A/T]CTGAG     | Thr25Ser              |

**Примечание:** MAF (Minor allele frequency) — частота минорного (редкого) аллеля в проекте «1000 Genomes».

Для попарного сравнения частот генотипов и аллелей между анализируемыми группами использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность или точный тест Фишера при объеме выборки  $\leq 5$ . Для оценки риска вычислялись отношение шансов (OR) и 95 % доверительный интервал (CI) для OR по трем моделям наследования (кодоминантной, доминантной, рецессивной). Выбор наиболее вероятной модели наследования осуществлялся по информационному критерию Акаике (Akaike information criterion, AIC); модель с наименьшим значением этого критерия принималась в качестве наиболее вероятной. Различия признавались статистически значимыми при вероятности отклонить верную нулевую гипотезу  $p < 0,05$ .

Для устранения различий между группами и снижения вероятности получения ложноположительных ассоциативных связей с учетом влияния многих факторов риска на развитие осложнений вводились поправки на модифицируемые (факт курения, ожирение, артериальная гипертензия (АГ), инфаркт миокарда (ИМ), острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), нарушения ритма, сахарный диабет 2-го типа (СД 2), стеноз брахицефальных артерий (БЦА)  $> 50\%$ , хроническая почечная недостаточность (ХПН), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) в анамнезе и не модифицируемые (пол, возраст) факторы риска.

Для многофакторного анализа проведена логистическая регрессия с пошаговым включением и исключением (MedCalc Software) с вычислением площади под этой кривой.

### Результаты

Распределение частот генотипов в общей выборке пациентов по 14 исследованным локусам из 16 соответствовало ожидаемому и было в равновесии Харди–Вайнберга. Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга было выявлено для двух локусов rs3804099 *TLR2* и rs4711668 *TREM-1*. При этом у пациентов в данных полиморфных локусах было снижение наблюдаемых гетерозигот. Данное смещение от равновесия Харди–Вайнберга может быть обусловлено отбором пациентов с определенной патологией за счет дополнительных критериев включения и исключения.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов между группами пациентов, которым операция выполнялась в условиях искусственного кровообращения и на работающем сердце, не показал статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ). Таким образом, всех пациентов рассматривали как единую выборку для проведения ассоциативного исследования геноти-

пов генов *TLR* и *TREM-1* с риском развития ПОН, а наличие ИК считали модифицируемым фактором риска.

При анализе частот генотипов и аллелей найдены статистически значимые ассоциации по пяти полиморфным локусам гена *TREM-1* и одному локусу гена *TLR6* между группами с ПОН и без ПОН (таблица 3). Установлено, что rs1817537, rs2234246, rs3804277 гена *TREM-1* значимо ассоциированы с развитием ПОН в послеоперационном периоде у пациентов после КШ. Так, аллель G полиморфного варианта rs1817537 (OR = 2,94 (95%CI = 1,09-7,92);  $p = 0,019$ ), аллель T rs2234246 (OR = 3,64 (95%CI = 1,24-10,73);  $p = 0,0076$ ) и аллель T rs3804277 (OR = 2,94 (95%CI = 1,09-7,92);  $p = 0,019$ ) гена *TREM-1* по доминантной модели наследования ассоциированы с повышенным риском развития ПОН в послеоперационном периоде. Со сниженным риском развития ПОН в послеоперационном периоде были ассоциированы: аллель C rs3775073 *TLR6* (OR = 0,33 (95%CI = 0,15-0,71);  $p = 0,0045$ ), аллель A rs7768162 *TREM-1* (OR = 0,46 (95%CI = 0,21-0,98);  $p = 0,043$ ) по доминантной модели наследования и генотип T/T rs4711668 *TREM-1* (OR = 0,22 (95%CI = 0,05-0,97);  $p = 0,015$ ) по рецессивной модели наследования.

При анализе ассоциаций различных гаплотипов по полиморфным сайтам генов *TREM-1* и *TLR* не выявлено статистически значимых связей между наследуемым гаплотипом и риском развития ПОН.

В ходе дальнейшего анализа, при разделении пациентов по половой принадлежности, обнаружена статистически значимая связь по частотам генотипов локуса rs2234246 *TREM-1*. Так носительство генотипов C/T или T/T увеличивает риск развития ПОН после операции КШ у мужчин более чем в три раза (OR = 3,51 (95%CI = 1,03-11,93);  $p = 0,042$ ). В подгруппе женщин такой ассоциации выявлено не было.

При разделении пациентов в зависимости от возрастной категории (группа: младше 60 лет и группа: 60 лет и старше) обнаружено, что у пациентов с ИБС младше 60 лет и являющихся носителями редкого аллеля C (OR = 3,85 (95%CI = 1,55-9,56);  $p = 0,003$ ) локуса rs3804099 *TLR2*, риск развития ПОН после операции увеличивается. Помимо различий в частотах аллелей варианта rs3804099 показаны достоверные отличия в частотах генотипов ( $p = 0,009$ ). Для лиц старше 60 лет такой ассоциации выявлено не было.

Анализ вклада изучаемых полиморфных вариантов в развитие ПОН после операции КШ был также проведен с учетом факторов риска сердечно-сосудистого континуума (АГ, ИМ, ОНМК,

ХОБЛ, ХПН, СД 2-го типа, ожирение, стеноз БЦА >50%). Установлено, что риск развития критических осложнений после операции КШ увеличивается более чем в три раза при сочетании такого фактора, как наличие АГ в анамнезе у пациентов и носительства гомозиготного и гетерозиготного генотипов, содержащих редкий аллель Т (С/Т + Т/Т) rs2234246 (OR = 3,13 (95%CI = 1,07-9,17); p = 0,036), Т (С/Т + Т/Т) rs3804277 и G (C/G + G/G) rs1817537 *TREM-1* (OR = 3,29 (95%CI = 1,12-9,65); p = 0,023) по сравнению с группой пациентов без АГ. У пациентов с ИМ в анамнезе также показаны ассоциации частот генотипов полиморфных вариантов rs2234246 (p = 0,002), rs3804277 и rs1817537

*TREM-1* (p = 0,011) с риском развития критических осложнений после операции КШ. Кроме того, помимо отличий в частотах генотипов варианта rs2234246, носительство редкого аллеля Т в сочетании с ИМ в анамнезе приводит к повышенному риску ПОН (OR = 1,92 (95%CI = 1,05-3,50); p = 0,034).

При разделении когорты пациентов в зависимости от наличия или отсутствия ожирения показаны различия в частотах аллелей для полиморфных вариантов rs1817537 и rs3804277 гена *TREM-1*. Так, у пациентов с ожирением и носительством редких аллелей обоих вариантов частота развития ПОН значимо выше (OR = 2,60 (95%CI = 1,11-6,07); p = 0,031) по сравнению с лицами без ожирения.

Таблица 3. Связь полиморфных вариантов генов *TLRs* и *TREM-1* с риском развития ПОН после КШ

| Ген/<br>Локус                          | Модель<br>наследования | Генотип | Пациенты<br>без ПОН |      | Пациенты<br>с ПОН |                  | OR (95%CI)       | p     | AIC   | HWE   |
|--|------------------------|---------|---------------------|------|-------------------|------------------|------------------|-------|-------|-------|
|  |                        |         | n                   | %    | n                 | %                |                  |       |       |       |
| <i>TLR 1</i><br>rs5743551<br>(n = 678) | Кодоминантная          | T/T     | 423                 | 65,3 | 15                | 50               | 1,00             | 0,33  | 260,9 | 0,81  |
|  |                        | C/T     | 202                 | 31,2 | 14                | 46,7             | 1,79 (0,84-3,85) |       |       |       |
|  |                        | C/C     | 23                  | 3,5  | 1                 | 3,3              | 1,14 (0,14-9,30) |       |       |       |
|  | Доминантная            | T/T     | 423                 | 65,3 | 15                | 50               | 1,00             | 0,16  | 259,1 |       |
|  |                        | C/T-C/C | 225                 | 34,7 | 15                | 50               | 1,73 (0,82-3,65) |       |       |       |
|  | Рецессивная            | T/T-C/T | 625                 | 96,5 | 29                | 96,7             | 1,00             | 0,92  | 261,1 |       |
| C/C                                    |                        | 23      | 3,5                 | 1    | 3,3               | 0,90 (0,11-7,13) |                  |       |       |       |
| <i>TLR 1</i><br>rs5743611<br>(n = 680) | Кодоминантная          | C/C     | 369                 | 56,8 | 16                | 53,3             | 1,00             | 0,84  | 262,9 | 0,21  |
|  |                        | C/G     | 250                 | 38,5 | 12                | 40               | 0,99 (0,45-2,18) |       |       |       |
|  |                        | G/G     | 31                  | 4,8  | 2                 | 6,7              | 1,63 (0,34-7,81) |       |       |       |
|  | Доминантная            | C/C     | 369                 | 56,8 | 16                | 53,3             | 1,00             | 0,9   | 261,2 |       |
|  |                        | C/G-G/G | 281                 | 43,2 | 14                | 46,7             | 1,05 (0,49-2,23) |       |       |       |
|  | Рецессивная            | C/C-C/G | 619                 | 95,2 | 28                | 93,3             | 1,00             | 0,55  | 260,9 |       |
| G/G                                    |                        | 31      | 4,8                 | 2    | 6,7               | 1,64 (0,35-7,56) |                  |       |       |       |
| <i>TLR 2</i><br>rs5743708<br>(n = 679) | Кодоминантная          | G/G     | 602                 | 92,8 | 30                | 100              | 1,00             | 0,11  | 258,7 | 0,58  |
|  |                        | A/G     | 46                  | 7,1  | 0                 | 0                | 0,00 (0,00-NA)   |       |       |       |
|  |                        | A/A     | 1                   | 0,2  | 0                 | 0                | 0,00 (0,00-NA)   |       |       |       |
|  | Доминантная            | G/G     | 602                 | 92,8 | 30                | 100              | 1,00             | 0,035 | 256,7 |       |
|  |                        | A/G-A/A | 47                  | 7,2  | 0                 | 0                | 0,00 (0,00-NA)   |       |       |       |
|  | Рецессивная            | G/G-A/G | 648                 | 99,8 | 30                | 100              | 1,00             | 0,83  | 261,1 |       |
| A/A                                    |                        | 1       | 0,2                 | 0    | 0                 | 0,00 (0,00-NA)   |                  |       |       |       |
| <i>TLR 2</i><br>rs3804099<br>(n = 679) | Кодоминантная          | T/T     | 283                 | 43,6 | 11                | 36,7             | 1,00             | 0,6   | 262,1 | <0,05 |
|  |                        | C/T     | 266                 | 41   | 13                | 43,3             | 1,32 (0,57-3,03) |       |       |       |
|  |                        | C/C     | 100                 | 15,4 | 6                 | 20               | 1,70 (0,59-4,89) |       |       |       |
|  | Доминантная            | T/T     | 283                 | 43,6 | 11                | 36,7             | 1,00             | 0,37  | 260,4 |       |
|  |                        | C/T-C/C | 366                 | 56,4 | 19                | 63,3             | 1,42 (0,65-3,07) |       |       |       |
|  | Рецессивная            | T/T-C/T | 549                 | 84,6 | 24                | 80               | 1,00             | 0,43  | 260,5 |       |
| C/C                                    |                        | 100     | 15,4                | 6    | 20                | 1,48 (0,57-3,84) |                  |       |       |       |

Продолжение таблицы 3

| Ген/<br>Локус                           | Модель<br>наследования | Генотип | Пациенты<br>без ПОН |      | Пациенты<br>с ПОН |                  | OR (95%CI)        | p      | AIC   | HWE   |
|---|------------------------|---------|---------------------|------|-------------------|------------------|-------------------|--------|-------|-------|
|   |                        |         | n                   | %    | n                 | %                |                   |        |       |       |
| <i>TLR 4</i><br>rs4986790<br>(n = 679)  | Кодоминантная          | A/A     | 548                 | 84,4 | 29                | 96,7             | 1,00              | 0,091  | 258,3 | 1     |
|   |                        | A/G     | 97                  | 14,9 | 1                 | 3,3              | 0,19 (0,03–1,47)  |        |       |       |
|   |                        | G/G     | 4                   | 0,6  | 0                 | 0                | 0,00 (0,00–NA)    |        |       |       |
|   | Доминантная            | A/A     | 548                 | 84,4 | 29                | 96,7             | 1,00              | 0,031  | 256,5 |       |
|   |                        | A/G-G/G | 101                 | 15,6 | 1                 | 3,3              | 0,18 (0,02–1,36)  |        |       |       |
|   | Рецессивная            | A/A-A/G | 645                 | 99,4 | 30                | 100              | 1,00              | 0,43   | 260,5 |       |
| G/G                                     |                        | 4       | 0,6                 | 0    | 0                 | 0,00 (0,00–NA)   |                   |        |       |       |
| <i>TLR 4</i><br>rs4986791<br>(n = 679)  | Кодоминантная          | C/C     | 545                 | 84   | 29                | 96,7             | 1,00              | 0,083  | 258,2 | 1     |
|   |                        | C/T     | 100                 | 15,4 | 1                 | 3,3              | 0,19 (0,03–1,43)  |        |       |       |
|   |                        | T/T     | 4                   | 0,6  | 0                 | 0                | 0,00 (0,00–NA)    |        |       |       |
|   | Доминантная            | C/C     | 545                 | 84   | 29                | 96,7             | 1,00              | 0,028  | 256,3 |       |
|   |                        | C/T-T/T | 104                 | 16   | 1                 | 3,3              | 0,18 (0,02–1,33)  |        |       |       |
|   | Рецессивная            | C/C-C/T | 645                 | 99,4 | 30                | 100              | 1,00              | 0,43   | 260,5 |       |
| T/T                                     |                        | 4       | 0,6                 | 0    | 0                 | 0,00 (0,00–NA)   |                   |        |       |       |
| <i>TLR 6</i><br>rs3775073<br>(n = 680)  | Кодоминантная          | T/T     | 191                 | 29,4 | 16                | 53,3             | 1,00              | 0,016  | 255   | 0,48  |
|   |                        | T/C     | 334                 | 51,4 | 11                | 36,7             | 0,35 (0,15–0,79)  |        |       |       |
|   |                        | C/C     | 125                 | 19,2 | 3                 | 10               | 0,27 (0,08–0,97)  |        |       |       |
|   | Доминантная            | T/T     | 191                 | 29,4 | 16                | 53,3             | 1,00              | 0,0045 | 253,2 |       |
|   |                        | T/C-C/C | 459                 | 70,6 | 14                | 46,7             | 0,33 (0,15–0,71)  |        |       |       |
|   | Рецессивная            | T/T-T/C | 525                 | 80,8 | 27                | 90               | 1,00              | 0,19   | 259,5 |       |
| C/C                                     |                        | 125     | 19,2                | 3    | 10                | 0,48 (0,14–1,62) |                   |        |       |       |
| <i>TLR 6</i><br>rs5743810<br>(n = 679)  | Кодоминантная          | G/G     | 282                 | 43,5 | 12                | 40               | 1,00              | 0,24   | 260,3 | 0,73  |
|   |                        | A/G     | 292                 | 45   | 17                | 56,7             | 1,41 (0,65–3,05)  |        |       |       |
|   |                        | A/A     | 75                  | 11,6 | 1                 | 3,3              | 0,35 (0,04–2,79)  |        |       |       |
|   | Доминантная            | G/G     | 282                 | 43,5 | 12                | 40               | 1,00              | 0,63   | 260,9 |       |
|   |                        | A/G-A/A | 367                 | 56,5 | 18                | 60               | 1,21 (0,56–2,59)  |        |       |       |
|   | Рецессивная            | G/G-A/G | 574                 | 88,4 | 29                | 96,7             | 1,00              | 0,15   | 259,1 |       |
| A/A                                     |                        | 75      | 11,6                | 1    | 3,3               | 0,29 (0,04–2,20) |                   |        |       |       |
| <i>TREM-1</i><br>rs2234246<br>(n = 680) | Кодоминантная          | C/C     | 229                 | 35,2 | 4                 | 13,3             | 1,00              | 0,028  | 256   | 0,43  |
|   |                        | C/T     | 302                 | 46,5 | 19                | 63,3             | 3,73 (1,23–11,33) |        |       |       |
|   |                        | T/T     | 119                 | 18,3 | 7                 | 23,3             | 3,42 (0,96–12,14) |        |       |       |
|   | Доминантная            | C/C     | 229                 | 35,2 | 4                 | 13,3             | 1,00              | 0,0076 | 254,1 |       |
|   |                        | C/T-T/T | 421                 | 64,8 | 26                | 86,7             | 3,64 (1,24–10,73) |        |       |       |
|   | Рецессивная            | C/C-C/T | 531                 | 81,7 | 23                | 76,7             | 1,00              | 0,52   | 260,8 |       |
| T/T                                     |                        | 119     | 18,3                | 7    | 23,3              | 1,35 (0,56–3,29) |                   |        |       |       |
| <i>TREM-1</i><br>rs4711668<br>(n = 678) | Кодоминантная          | C/C     | 238                 | 36,7 | 18                | 60               | 1,00              | 0,019  | 255,2 | <0,05 |
|   |                        | T/C     | 258                 | 39,8 | 10                | 33,3             | 0,57 (0,25–1,27)  |        |       |       |
|   |                        | T/T     | 152                 | 23,5 | 2                 | 6,7              | 0,18 (0,04–0,78)  |        |       |       |
|   | Доминантная            | C/C     | 238                 | 36,7 | 18                | 60               | 1,00              | 0,023  | 255,9 |       |
|   |                        | T/C-T/T | 410                 | 63,3 | 12                | 40               | 0,42 (0,20–0,89)  |        |       |       |
|   | Рецессивная            | C/C-T/C | 496                 | 76,5 | 28                | 93,3             | 1,00              | 0,015  | 255,1 |       |
| T/T                                     |                        | 152     | 23,5                | 2    | 6,7               | 0,22 (0,05–0,97) |                   |        |       |       |

Окончание таблицы 3

| Ген/<br>Локус                           | Модель<br>наследования | Генотип | Пациенты<br>без ПОН |      | Пациенты<br>с ПОН |                  | OR (95%CI)       | p     | AIC   | HWE   |
|---|------------------------|---------|---------------------|------|-------------------|------------------|------------------|-------|-------|-------|
|   |                        |         | n                   | %    | n                 | %                |                  |       |       |       |
| <i>TREM-1</i><br>rs3804277<br>(n = 680) | Кодоминантная          | C/C     | 238                 | 36,6 | 5                 | 16,7             | 1,00             | 0,064 | 257,7 | 0,21  |
|   |                        | C/T     | 295                 | 45,4 | 18                | 60               | 2,99 (1,07–8,32) |       |       |       |
|   |                        | T/T     | 117                 | 18   | 7                 | 23,3             | 2,82 (0,86–9,29) |       |       |       |
|   | Доминантная            | C/C     | 238                 | 36,6 | 5                 | 16,7             | 1,00             | 0,019 | 255,7 |       |
|   |                        | C/T-T/T | 412                 | 63,4 | 25                | 83,3             | 2,94 (1,09–7,92) |       |       |       |
|   | Рецессивная            | C/C-C/T | 533                 | 82   | 23                | 76,7             | 1,00             | 0,53  | 260,8 |       |
| T/T                                     |                        | 117     | 18                  | 7    | 23,3              | 1,34 (0,55–3,27) |                  |       |       |       |
| <i>TREM-1</i><br>rs2234237<br>(n = 680) | Кодоминантная          | T/T     | 502                 | 77,2 | 21                | 70               | 1,00             | 0,32  | 260,9 | 0,085 |
|   |                        | A/T     | 132                 | 20,3 | 9                 | 30               | 1,58 (0,69–3,60) |       |       |       |
|   |                        | A/A     | 16                  | 2,5  | 0                 | 0                | 0,00 (0,00–NA)   |       |       |       |
|   | Доминантная            | T/T     | 502                 | 77,2 | 21                | 70               | 1,00             | 0,4   | 260,5 |       |
|   |                        | A/T-A/A | 148                 | 22,8 | 9                 | 30               | 1,43 (0,63–3,26) |       |       |       |
|   | Рецессивная            | T/T-A/T | 634                 | 97,5 | 30                | 100              | 1,00             | 0,28  | 260   |       |
| A/A                                     |                        | 16      | 2,5                 | 0    | 0                 | 0,00 (0,00–NA)   |                  |       |       |       |
| <i>TREM-1</i><br>rs6910730<br>(n = 680) | Кодоминантная          | A/A     | 502                 | 77,2 | 21                | 70               | 1,00             | 0,36  | 261,2 | 0,16  |
|   |                        | A/G     | 133                 | 20,5 | 9                 | 30               | 1,50 (0,65–3,44) |       |       |       |
|   |                        | G/G     | 15                  | 2,3  | 0                 | 0                | 0,00 (0,00–NA)   |       |       |       |
|   | Доминантная            | A/A     | 502                 | 77,2 | 21                | 70               | 1,00             | 0,47  | 260,7 |       |
|   |                        | A/G-G/G | 148                 | 22,8 | 9                 | 30               | 1,36 (0,60–3,12) |       |       |       |
|   | Рецессивная            | A/A-A/G | 635                 | 97,7 | 30                | 100              | 1,00             | 0,28  | 260,1 |       |
| G/G                                     |                        | 15      | 2,3                 | 0    | 0                 | 0,00 (0,00–NA)   |                  |       |       |       |
| <i>TREM-1</i><br>rs1817537<br>(n = 680) | Кодоминантная          | C/C     | 238                 | 36,6 | 5                 | 16,7             | 1,00             | 0,064 | 257,7 | 0,21  |
|   |                        | C/G     | 295                 | 45,4 | 18                | 60               | 2,99 (1,07–8,32) |       |       |       |
|   |                        | G/G     | 117                 | 18   | 7                 | 23,3             | 2,82 (0,86–9,29) |       |       |       |
|   | Доминантная            | C/C     | 238                 | 36,6 | 5                 | 16,7             | 1,00             | 0,019 | 255,7 |       |
|   |                        | C/G-G/G | 412                 | 63,4 | 25                | 83,3             | 2,94 (1,09–7,92) |       |       |       |
|   | Рецессивная            | C/C-C/G | 533                 | 82   | 23                | 76,7             | 1,00             | 0,53  | 260,8 |       |
| G/G                                     |                        | 117     | 18                  | 7    | 23,3              | 1,34 (0,55–3,27) |                  |       |       |       |
| <i>TREM-1</i><br>rs9471535<br>(n = 677) | Кодоминантная          | T/T     | 498                 | 77   | 21                | 70               | 1,00             | 0,33  | 260,8 | 0,12  |
|   |                        | C/T     | 133                 | 20,6 | 9                 | 30               | 1,56 (0,68–3,55) |       |       |       |
|   |                        | C/C     | 16                  | 2,5  | 0                 | 0                | 0,00 (0,00–NA)   |       |       |       |
|   | Доминантная            | T/T     | 498                 | 77   | 21                | 70               | 1,00             | 0,42  | 260,4 |       |
|   |                        | C/T-C/C | 149                 | 23   | 9                 | 30               | 1,41 (0,62–3,22) |       |       |       |
|   | Рецессивная            | T/T-C/T | 631                 | 97,5 | 30                | 100              | 1,00             | 0,28  | 259,9 |       |
| C/C                                     |                        | 16      | 2,5                 | 0    | 0                 | 0,00 (0,00–NA)   |                  |       |       |       |
| <i>TREM-1</i><br>rs7768162<br>(n = 677) | Кодоминантная          | G/G     | 249                 | 38,5 | 18                | 60               | 1,00             | 0,002 | 250,6 | 0,1   |
|   |                        | A/G     | 288                 | 44,5 | 12                | 40               | 0,66 (0,31–1,41) |       |       |       |
|   |                        | A/A     | 110                 | 17   | 0                 | 0                | 0,00 (0,00–NA)   |       |       |       |
|   | Доминантная            | G/G     | 249                 | 38,5 | 18                | 60               | 1,00             | 0,043 | 257   |       |
|   |                        | A/G-A/A | 398                 | 61,5 | 12                | 40               | 0,46 (0,21–0,98) |       |       |       |
|   | Рецессивная            | G/G-A/G | 537                 | 83   | 30                | 100              | 1,00             | 8e-04 | 249,8 |       |
| A/A                                     |                        | 110     | 17                  | 0    | 0                 | 0,00 (0,00–NA)   |                  |       |       |       |

В ходе анализа оценки вклада изученных полиморфных вариантов в развитие ПОН при наличии такого фактора риска как курение была найдена одна ассоциация. Так, у курящих пациентов, являющихся носителями минорного аллеля G полиморфного варианта rs5743611 гена *TLR1* (OR = 3,71 (95%CI = 1,43-9,60); p = 0,008), риск развития критических послеоперационных осложнений увеличивается почти в четыре раза. Помимо отличий в частотах аллелей варианта rs5743611 найдена ассоциация по частотам генотипов (p = 0,010). Для некурящих пациентов такой ассоциации выявлено не было.

При изучении остальных полиморфных вариантов в отношении развития ПОН значимых отличий выявлено не было.

С целью выявления независимых предикторов развития ПОН использовали бинарную логистическую регрессию с пошаговым включением и исключением предикторов. В данной модели зависимой переменной являлся диагностированный синдром полиорганной недостаточности; переменные вводились в модель при p менее 0,05, а исключались при p более 0,1.

В результате из 72 факторов риска (48 генотипов 16 полиморфных сайтов пяти генов и 24 варианта 12 клинических факторов) были определены четыре фактора, имеющих статистически значимую прогностическую ценность: генотип T/T rs3775073 гена *TLR6*, генотип T/T rs2234246 гена *TREM-1*, наличие хронической обструктивной болезни легких и возраст 60 лет и старше (таблица 4).

При оценке качества прогностической модели установлено, что правильность классификации пациентов по группам с синдромом и без синдрома полиорганной недостаточности с применением оценочных критериев составляет 95,07 %, p = 0,0003. Качество бинарной классификации оценивали с помощью построения ROC-кривой. При этом площадь под ROC-кривой равнялась 0,742 (95% CI 0,705-0,777).

### Обсуждение

В настоящее время функциональная значимость рецепторов врожденного иммунного ответа определена. Однако на сегодняшний день недо-

статочно информации по такому вопросу, как их генетическая изменчивость, в том числе и относительно предрасположенности к развитию послеоперационных осложнений хирургического лечения различных заболеваний. Несмотря на то, что *TREM-1* был описан как важнейший активирующий рецептор воспалительного ответа, роль полиморфных локусов данного гена в определении восприимчивости к различным заболеваниям в настоящее время недостаточно изучена [11]. Тем не менее рядом исследований было показано, что полиморфные варианты гена *TREM-1* были ассоциированы с повышенной предрасположенностью к развитию неонатальной смертности [12], воспалительных заболеваний кишечника [13], пневмонии у пациентов с термическими ожогами [14], болезни Альцгеймера [15]. Стоит отметить, что большая часть работ по изучению гена *TREM-1* направлена на исследование септических заболеваний [16, 17]. Имеются также работы, где не выявлено достоверной связи полиморфизма гена *TREM-1* с развитием сепсиса [18] и инфекционного эндокардита [19].

Также ранее нами было проведено исследование по поиску ассоциативных связей данных полиморфных вариантов *TREM-1* с вероятностью возникновения ишемической болезни сердца [20]. Определено, что почти все полиморфные варианты ассоциированы с риском развития ишемической болезни сердца. Стоит отметить, что аллели G rs1817537, T rs2234246 и T rs3804277 *TREM-1* имеют статистически значимую корреляцию со сниженной вероятностью возникновения ИБС (OR = 0,57 (95%CI = 0,40-0,81), p = 0,0013; OR = 0,59 (95%CI = 0,42-0,84), p = 0,003 и OR = 0,58 (95% CI = 0,41-0,81), p = 0,0014 соответственно) [20], но при этом в настоящей работе нами показаны ассоциации данных полиморфных вариантов с повышенным риском развития ПОН после операции КШ. И, напротив, ранее было показано, что генотип T/T rs4711668 (OR = 1,66 (95%CI = 1,10-2,52), p = 0,014) связан с повышенным риском развития ИБС [20], но после операции КШ обладает протективными свойствами в отношении развития ПОН. Возможно, это связано с тем, что ключевым звеном в развитии атеросклероза и возникновении осложнений является воспаление. Однако,

**Таблица 4. Результаты бинарной логистической регрессии с пошаговым включением и исключением предикторов**

| Переменная                                       | OR   | 95%CI      | p     |
|--|------|------------|-------|
| Возраст старше 60 лет                            | 2,34 | 1,05-5,21  | 0,037 |
| Наличие хронической обструктивной болезни легких | 6,71 | 1,61-28,06 | 0,009 |
| Генотип T/T rs3775073 гена <i>TLR6</i>           | 2,70 | 1,23-5,90  | 0,013 |
| Генотип T/T rs2234246 гена <i>TREM-1</i>         | 3,10 | 1,05-9,19  | 0,042 |

в первом случае данный процесс хронический, а во втором немедленная реакция организма. Поэтому межиндивидуальные различия в данных генах при выработке молекул повреждения тканей и внедрении внешних патогенов определяют различный характер течения воспалительного ответа.

На сегодняшний день роль полиморфных локусов генов *TLR*, в отличие от генов *TREM-1*, более изучена и весьма широко описана в развитии не только атеросклероза [21, 22], но и других сердечно-сосудистых заболеваний [23]. Однако до настоящего времени роль генов Toll-подобных рецепторов также не исследовалась в определении предрасположенности к развитию послеоперационных осложнений.

В данной работе показана ассоциация локуса rs3775073 *TLR6* со сниженным риском развития ПОН в послеоперационном периоде в общей выборке мужчин и женщин. Однако по результатам проведенных нами ранее исследований установлено, что гетерозиготный генотип (Т/С) rs3775073 *TLR6* статистически значимо ассоциирован с повышенным риском развития ишемической болезни сердца у мужчин (OR = 1,68 (95%CI = 1,03–2,73),  $p < 0,05$ ) [24].

Нужно отметить, что, несмотря на малую частоту минорного аллеля полиморфных вариантов генов *TLR1* (rs5743611), *TLR2* (rs5743708), *TLR4* (rs4986791), в данном исследовании нам удалось найти значимые ассоциации между анализируемыми полиморфизмами и риском развития ПОН только по одному локусу rs5743611 гена *TLR1* и наличием факта курения. Определено, что табакокурение пациентами с ИБС и генетической предрасположенностью к развитию ПОН после операции КШ, дополнительно увеличивает риск развития данных осложнений, иницируя воспалительный ответ.

Следовательно, совокупность наличия нескольких признаков: генетической предрасположенности пациентов с ИБС к развитию критических послеоперационных осложнений и некоторых модифицируемых факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний (ИМ, АГ, ожирения), а также проведение кардиохирургического вмешательства в условиях ИК могут усугублять прогноз пациентов. Учитывая исходную тяжесть состояния данной категории больных, остается значимой проблема предупреждения и раннего интенсивного лечения осложнений, возникающих как во время, так и после оперативного вмешательства.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показана ассоциация 5 аллельных вариантов гена *TREM-1* (rs1817537, rs2234246, rs3804277, rs4711668, rs7768162) и 3 *TLR* (rs3775073, rs5743611,

rs3804099) с риском развития полиорганной недостаточности после операции коронарного шунтирования.

### Заключение

В данной работе установлены ассоциации полиморфных вариантов генов врожденного иммунитета с развитием критических осложнений после операции коронарного шунтирования. А также определен вклад изучаемых полиморфных вариантов генов врожденного иммунного ответа в формирование предрасположенности к развитию ПОН у больных ИБС. По результатам исследования определено, что носительство редких аллелей в отдельных полиморфных сайтах *TREM-1* и *TLR6* демонстрирует свою потенциальную прогностическую силу в определении риска развития полиорганной недостаточности.

### Финансирование/Funding

Данная работа была поддержана Фондом молодых ученых в области биомедицинских наук в 2016 году (научный проект № 15-005).

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

1. Nowbar AN, Howard JP, Finegold JA et al. 2014 global geographic analysis of mortality from ischaemic heart disease by country, age and income: statistics from World Health Organisation and United Nations. *International Journal of Cardiology*. 2014; 174(2): 293–298.
2. Møller CH, Steinbrüchel DA. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting. *Current Cardiology Reports Journal*. 2014; 16(3):455
3. Plotnikov GP, SHukevich DL, Grigor'ev EV. Abdominal complication in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Complex problems of cardiovascular diseases = Kompleksnye problemy serdechno-sosudistyh zabolevanij. 2014; 1:75–86. In Russian [Плотников Г. П., Шукевич Д. Л., Григорьев Е. В. Абдоминальные осложнения при операциях на сердце с искусственным кровообращением. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2014, 1:75–86].
4. Hatakeyama N, Matsuda N. Alert cell strategy: mechanisms of inflammatory response and organ protection. *Current Pharmaceutical Design Journal*. 2014; 20(36): 5766–5778.
5. Bone RC. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference

Committee: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine*. 1992; 20: 864–874.

6. Scott MC. Defining and Diagnosing Sepsis. *Emergency Medicine Clinics of North America*. 2017; 35 (1): 1–9.

7. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*. 2015; 16 (4): 343–353.

8. Pothlichet J, Quintana-Murci L. The genetics of innate immunity sensors and human disease. *International Reviews of Immunology*. 2013; 32 (2): 157–208.

9. Vincent J-L, Moreno R, Takala J et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Medicine*. 1996; 22 (7): 707–710.

10. Smith K, Kliko C, Cantor C. Puls-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК. *The Analysis of the genome. Methods: the Lane with English M: World*, 1990. 58–94.

11. Хуторная МВ, Понасенко АВ, Головкин АС. Трiggering receptor expressed on myeloid cells (trem1): генетические полиморфизмы и роль в иммунных ответах. *Medicine in Kuzbass = Medicina v Kuzbasse*. 2013; 4(12):14–18. In Russian [Хуторная М. В., Понасенко А. В., Головкин А. С. Триггерный рецептор экспрессируемый на миелоидных клетках (TREM-1): генетический полиморфизм и роль в реализации иммунного ответа. *Медицина в Кузбассе*. 2013, 4 (12): 14–18].

12. Velez DR, Fortunato SJ, Thorsen P et al. Pre-term birth in Caucasians is associated with coagulation and inflammation pathway gene variants. *PLoS One*. 2008; 3(9):e3283.

13. Jung ES, Kim SW, Moon CM et al. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and inflammatory bowel diseases in the Korean population. *Life Sci*. 2011; 89 (9–10):289–294.

14. Rivera-Chávez FA, Huebinger RM, Burris A et al. A TREM-1 Polymorphism A/T within the Exon 2 Is Associated with Pneumonia in Burn-Injured Patients. *ISRN Inflamm*. 2013; 2013: 431739.

15. Replogle JM, Chan G, White CC et al. A TREM1 variant alters the accumulation of Alzheimer-related amyloid pathology. *Ann Neurol*. 2015; 77 (3): 469–477.

16. Su L, Liu C, Li C et al. Dynamic Changes in Serum Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (sTREM-1) and its Gene Polymorphisms

are Associated with Sepsis Prognosis. *Inflammation*. 2012; 35: 1833.

17. Peng L-S, Li J, Zhou G-S, Deng L-H et al. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and septic shock in a Chinese Han population. *World Journal of Emergency Medicine*. 2015; 2 (6): 123–130.

18. Chen Q, Zhou H, Wu S, et al. Lack of association between TREM-1 gene polymorphisms and severe sepsis in a Chinese Han population. *Hum Immunol*. 2008; 69 (3): 220–226.

19. Понасенко АВ, Кутихин АГ, Хуторная МВ et al. Polymorphisms within innate immune response, calcium metabolism and lipid metabolism are predictors of infective endocarditis. *Infection and immunity = Infektsiya i immunitet*. 2015; 4 (5): 331–338. In Russian [Понасенко А. В., Кутихин А. Г., Хуторная М. В. и др. Связь полиморфизмов гена TREM-1 с инфекционным эндокардитом. *Инфекция и иммунитет*. 2015, 4 (5): 331–338].

20. Понасенко АВ, Головкин АС, Хуторная МВ et al. Association of TREM-gene polymorphisms with the risk of the coronary artery disease in Russian population. *Molecular medicine = Molekulyarnaya medicina*. 2017; 1 (15): 34–39. In Russian [Понасенко А. В., Головкин А. С., Хуторная М. В. и др. Связь полиморфизмов гена TREM-1 с риском развития ишемической болезни сердца в русской популяции. *Молекулярная медицина*. 2017, 1 (15): 34–39].

21. Xie X, Shi X, Liu M. The Roles of TLR Gene Polymorphisms in Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 35,317 Subjects. *Scand J Immunol*. 2017; 86 (1): 50–58.

22. den Dekker WK, Cheng C, Pasterkamp G, Duckers HJ. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis*. 2010; 209(2):314–320.

23. Vallejo JG. Role of Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2011; 121 (1): 1–10.

24. Понасенко АВ, Хуторная МВ, Кутихин АГ et al. The role of polymorphisms within genes encoding toll-like receptors in coronary atherosclerosis. *Атеросклероз*. 2015; 3(11):22–28. In Russian [Понасенко А. В., Хуторная М. В., Кутихин А. Г. и др. Роль полиморфизмов генов семейства Toll-подобных рецепторов в атеросклеротическом поражении сосудов сердца. *Атеросклероз*. 2015, 3 (11): 22–28].

#### Информация об авторах:

Хуторная Мария Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ;

Понасенко Анастасия Валериевна, к.м.н., заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ;

Радивилко Артем Сергеевич, к.м.н., научный сотрудник лаборатории критических состояний отдела мультифокального атеросклероза НИИ КПССЗ;

Кутихин Антон Геннадьевич, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ;

Жидкова Ирина Игоревна, к.м.н., научный сотрудник лаборатории патологии кровообращения отдела мультифокального атеросклероза НИИ КПССЗ;

Крутицкий Сергей Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории критических состояний отдела мультифокального атеросклероза НИИ КПССЗ;

Салахов Рамиль Ринатович, к.м.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ;

Григорьев Евгений Валерьевич, д.м.н., профессор, зам. директора по научной и лечебной работе НИИ КПССЗ;

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

#### **Author information:**

Khutornaya Maria V., Junior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

Ponassenko Anastasia V., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

Radivilko Artem S., PhD (Medicine), Researcher Associate, Laboratory of critical states, Department of Multivessel Coronary Artery Disease and Polyvascular Disease, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

Kutikhin Anton G., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

Zhidkova Irina I., PhD (Medicine), Researcher Associate, Laboratory of Circulation Pathology, Department of Multivessel Coronary Artery Disease and Polyvascular Disease, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

Salakhov Ramil R., PhD (Medicine), Researcher Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

Krutitskiy Sergey S., Junior Researcher, Laboratory of critical states, Department of Multivessel Coronary Artery Disease and Polyvascular Disease, Research Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

Grigoryev Evgeny V., PhD (Medicine), Professor, deputy director on scientific and medical work at Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases;

Golovkin Alexey S., PhD (Medicine), PI, institute of molecular biology and genetics, National Almazov medical research Centre.



# THE ROLE OF GENERAL ANESTHETICS IN MODULATION OF THE SYSTEMIC INFLAMMATION RESPONSE DURING PERIOPERATIVE PERIOD

Savvina I.A., Kostareva A.A., Fedorov A.V., Rutkovskiy R.V.,  
Rasputina D.A., Malkhozova A.M.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:  
Irina A. Savvina  
Almazov National Medical Research Centre  
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,  
Russia, 197341  
E-mail: Savvina\_IA@almazovcentre.ru

Received 28 September 2017;  
accepted 13 October 2017.

## Abstract

General anesthetics affect the immune system. Such immunomodulation can have both a negative and a positive effect on the outcome of surgical intervention and distant treatment results. Current review is devoted to the discussion and systematization of data on deregulation of the immune system in the perioperative period, the effects of some of the most common anesthetics on the immune cells and cytokines, as well as possible clinical manifestations of immunomodulation using general anesthetics.

**Key words:** general anesthetics, immunomodulation, systemic inflammation, neuroinflammation, anaesthesiology

*For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (5): 28–37.*

## Список сокращений:

IL1 $\beta$  — интерлейкин 1 бета, IL6 — интерлейкин 6, TNF $\alpha$  — фактор некроза опухоли (TNF $\alpha$ )

## Влияние анестетиков на работу иммунной системы

Хирургическая травма стимулирует эндокринный, метаболический, гемодинамический и иммунный ответ, который продолжается примерно несколько дней в послеоперационном периоде. Общепринято считать, что эффект анестетиков на иммунную систему весьма незначителен по сравнению с эффектами, оказанными большой хирургией или травмой, и, таким образом, анестетики не должны оказывать клинически значимого воздействия на иммунный статус и функции иммунокомпетентных клеток у здоровых пациентов I-II ASA, получающих анестезиологическое обеспечение на короткие операции [1]. Подразумевается, что у таких пациентов системный воспалительный ответ обычно сбалансирован, хорошо контролируется и ограничен по продолжительности. По данным Nomburger J.A. et al. (2006), иммуносупрессивный

эффект примерно в 20% случаев может не вызывать последствий у пациентов с нормальным иммунным статусом [2]. Если же пациент имеет генетическую предрасположенность к ослаблению иммунитета или уже скомпрометирован возрастом, наличием опухоли, сахарным диабетом или пониженным трофическим статусом, иммуносупрессивные эффекты анестетиков могут играть значимую роль в формировании послеоперационных инфекционных осложнений, особенно у больных с онкологическими заболеваниями, вызывая рост популяции оставшихся злокачественных клеток и новых метастазов, а также смертности [1, 3, 4]. В дополнение, все большее количество пожилых пациентов со сниженным иммунитетом нуждаются в проведении анестезии и интенсивной терапии. Таким образом, возможные иммуномодулирующие эффекты анестетиков требуют более глубокого изучения, а средства для анестезии необходимо выбирать, тщательно взвешивая все «за» и «против» с позиции их иммуномодулирующего влияния. Иммуносупрессивные эффекты анестетиков, которые приводят к противовоспалительному ответу,

могут быть терапевтически полезными в ряде ситуаций, таких как травма, сопровождающаяся развитием ишемии и реперфузии, синдром системного воспалительного ответа, острый респираторный дистресс — синдром [5]. Следовательно, эффекты анестетиков в отношении иммунной системы могут быть не только неблагоприятными, но также положительно влиять на исход операции и травмы у определенных групп пациентов. Поэтому понимание характера иммунологического воздействия препаратов для наркоза необходимо для ежедневного выбора общего анестетика конкретному пациенту врачом анестезиологом-реаниматологом.

Несмотря на быстрое развитие научных знаний в области анестезиологии и иммунологии за последние десятилетия, специфические механизмы, благодаря которым каждый препарат для анестезии действует на иммунную систему, остаются неясными [8]. Эффект анестетиков на иммунную систему был менее изучен *in vivo*, чем *in vitro*, а текущие исследования содержат противоречивую информацию. В настоящее время ни одна методика анестезии не может быть рекомендована в качестве оптимальной с позиции доказательной медицины и персонализированного подхода к лечению [4, 6, 7].

### Периоперационная иммуносупрессия

Периоперационная иммуносупрессия у хирургических пациентов связана с нейроэндокринным стрессом, формирующимся через активацию вегетативной нервной системы и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Вызванный хирургическим стрессом выброс гормонов, таких как катехоламины (норэпинефрин, эпинефрин), адренкортикотропный гормон и кортизол, через автономную нервную систему и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось оказывает выраженные подавляющие эффекты на функции иммунокомпетентных клеток — моноцитов, макрофагов и Т-лимфоцитов, экспрессирующих  $\beta_2$ -адренорецепторы, глюкокортикоидные рецепторы, которые способствуют клеточной передаче сигнала для подавления синтеза провоспалительных цитокинов [9]. Более того, некоторые цитокины, такие как интерлейкин 1 бета (IL1 $\beta$ ), интерлейкин 6 (IL6), фактор некроза опухоли (TNF $\alpha$ ) из моноцитов, макрофагов и лимфоцитов, активированных хирургическим стрессом, могут стимулировать гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [10]. Следовательно, нейроэндокринная система так же, как провоспалительные и противовоспалительные цитокины, синергически дополняет их супрессивные эффекты на иммунную систему в периоперационном периоде [8].

Поддержание необходимого уровня нейровегетативной стабилизации в ответ на хирургический

стресс, интраоперационное моделирование необходимого больному гемодинамического профиля, миорелаксация, проведение инфузионной терапии, включая гемотрансфузию, контроль гипергликемии, гипотермии, купирование послеоперационной боли, все компоненты анестезиологического обеспечения, контролируемые анестезиологом-реаниматологом во время хирургического вмешательства и общей анестезии, являются причиной периоперационной иммуносупрессии. Предполагается, что средства для анестезии и продолжительность общей анестезии ухудшают некоторые аспекты системного воспалительного ответа, либо косвенно изменяя ответ на хирургический стресс, либо прямо нарушая функции иммунокомпетентных клеток [4, 6, 7, 11].

Средства для общей анестезии вызывают анальгезию, формируя определенный уровень антицицептивной защиты — сегментарный и супрасегментарный, ослабление хирургического стресса за счет влияния как на передачу нервных импульсов, так и на гуморальные механизмы с участием гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, таким образом оказывая иммуномодулирующие эффекты [4, 6, 7]. В последнее время многочисленные исследования показали, что иммуносупрессия, вызванная хирургическим стрессом, средствами для анестезии и анальгезии, обычно применяющимися в хирургии и интенсивной терапии, может прямо влиять на функции иммунокомпетентных клеток [7]. Разнообразные *in vitro* эксперименты с человеческими иммунными клетками *ex vivo* [6], тесты *in vivo* [12] и модели на животных показывают широкий диапазон эффектов препаратов для анестезии на иммунную систему, включая изменение числа иммунных клеток, их функциональной активности и характера секреции разнообразных иммунных медиаторов, что влияет на воспалительный ответ в послеоперационном периоде [4, 6, 13].

### Эффекты общих анестетиков на системное воспаление

Иммуномодулирующие эффекты анестетиков *in vitro* были впервые показаны более ста лет назад [11]. Возрастающие с каждым годом знания в этой области связаны с развитием фундаментальной науки, улучшением лабораторной техники и точными технологиями. Было показано, что в тех концентрациях, в которых анестетики применяются в клинике, разные средства для общей анестезии подавляют функции иммунного ответа по-разному [8].

### Ингаляционные анестетики

Ингаляционные анестетики подавляют функции нейтрофилов, уменьшают пролиферацию лимфоцитов, подавляют высвобождение цитокинов из

клеток-моноклеаров периферической крови [4, 6, 14]. Известно, что галогенные анестетики подавляют провоспалительные цитокины в эпителиальных клетках легочных альвеол мышей [7]. В свою очередь, было показано, что воздействие летучих анестетиков и механической легочной вентиляции стимулирует повышенную экспрессию генов провоспалительных цитокинов [14]. Летучие анестетики влияют на экспрессию NO-синтазы, обратимо подавляя потенциал-зависимые кальциевые каналы, и уменьшают концентрацию внутриклеточного кальция. Таким образом, *in vitro* эффекты летучих анестетиков состоят преимущественно в угнетении иммунного ответа, носящего временной и дозо — зависимый характер [4, 7, 14].

### Севофлюран

Рядом авторов было показано, что анестетическое прекондиционирование севофлюраном обеспечивает защиту от эндотоксемии, ишемически-реперфузионного повреждения при травме, ишемически-реперфузионного повреждения миокарда [8]. Севофлюран уменьшает зависящую от толл-подобных рецепторов активацию такого известного транскрипционного фактора, как ядерный фактор каппа-би (NF- $\kappa$ B), и регулируемую этими факторами экспрессию медиаторов воспаления [14]. Было показано, что севофлюран защищает от дисфункции эндотелия сосудов, вызванной окислительным стрессом и воспалением, путем активации эндотелиальной NO-синтазы и подавления NF- $\kappa$ B [8, 14]. По некоторым данным, севофлюран более длительно подавляет выброс цитокинов, чем изофлюран и энфлюран [8].

### Изофлюран

Воздействие изофлюрана приводит к снижению количества лейкоцитов и уровней системных провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$ ), уменьшению активации макрофагов для поляризации M2 фенотипа [14]. Было выявлено, что эти эффекты зависят от протеинкиназ C и от системного подавления транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [14]. Полученные данные дают возможность предположить, что воздействие летучих анестетиков вызывает системный противовоспалительный эффект. С другой стороны, было показано, что воздействие изофлюрана приводит к когнитивным нарушениям и небольшому повышению IL1 $\beta$  и уровня активированной каспазы — 3 в гиппокампе как у молодых, так и у пожилых крыс [8]. Эти результаты позволяют предполагать, что изофлюран вызывает нейровоспаление, которое в дальнейшем приводит к когнитивным нарушениям.

Немного известно касательно механизмов стимуляции нейровоспаления летучими анестетиками,

но некоторыми авторами было показано, что изофлюран проникает через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ), повышая проницаемость внутрисосудистых веществ в ткань мозга. Недавние исследования показали, что воздействие на клетки нейроглиомы Grade 4 у человека 2% изофлюраном в течение 6 часов активирует транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, повышая продукцию провоспалительных цитокинов [15]. Следовательно, локальная активация NF- $\kappa$ B — это предполагаемый механизм изофлюран — индуцированного нейровоспаления за счет повышения продукции провоспалительных цитокинов [15]. Недавнее исследование уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у детей в возрасте от 6 месяцев до 11 лет, которым без хирургического вмешательства выполнялась магнитно-резонансная томография с диагностической целью в условиях общей анестезии изофлюраном с помощью ларингеальной маски, показало, что статистически значимым было существенное повышение уровней IL1 $\beta$  [16], указывающее на избирательную активацию иммунного ответа у детей в условиях общей анестезии изофлюраном.

### Внутривенные анестетики.

#### Пропофол

Пропофол — агонист рецепторов  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК), ослабляет некоторые функции, выполняемые нейтрофилами и моноцитами, включая окислительный стресс [17], хемотаксис [18], фагоцитоз [19] и поляризацию [7]. В то время как некоторые авторы показали, что возможности пропофола подавлять человеческие нейтрофилы и активацию комплемента связаны с его липидным носителем [7, 20], другие предполагают, что пропофол как минимум участвует в угнетении хемотаксиса человеческих нейтрофилов путем супрессии сигнальных путей митоген-активируемых протеинкиназ [7, 18]. В допустимых клинических концентрациях пропофол вызывает супрессию хемотаксиса нейтрофилов [7, 18]. Эффекты пропофола в отношении подавления пролиферации были выявлены только у полиморфноядерных лейкоцитов, полученных от пациентов в критическом состоянии, у которых была первичная иммуносупрессия [21]. Также не было обнаружено уменьшения пролиферации лимфоцитов и высвобождения цитокинов в ответ на эндотоксин в общей культуре крови, полученной от здоровых добровольцев [7, 22]. На модели животных с эндотоксин-индуцированной травмой легких пропофол оказывал противовоспалительный эффект [8]. Молекулярный механизм этого до сих пор не изучен. Тем не менее, нет данных, свидетельствующих о том, что пропофол подавляет активацию транскрипционного фактора

NF-kB [7]. До сих пор предполагается, что пропфол вызывает только клеточно-опосредованные иммуномодулирующие эффекты на врожденный иммунитет, и что эти эффекты могут быть обусловлены его растворимостью в жирах [7].

### Опиоиды

Связь между применением опиоидов и изменениями в организме пациента часто упоминается в медицинской литературе, первое описание относится к началу XIX века. Увеличение частоты локальных и системных инфекций у наркоманов, использующих опиоиды внутривенно, привело к заключению, что причина связи между применением опиоидов и инфекциями не может быть просто объяснена их инъекционным введением, но также тем, что опиаты сами по себе играют роль в изменении иммунных функций [23]. Различные эффекты опиоидов на иммунную систему зависят от используемого препарата, организма хозяина и длительности воздействия [24]. Морфин, фентанил, ремифентанил, метадон и кодеин показывают сильные иммуномодулирующие свойства, в то время как трамадол и бупренорфин имеют слабый иммунный эффект или его отсутствие [23]. Это свойство опиоидов часто связано с центральными нейроэндокринными, нейропаракринными и периферическими механизмами, и для периферических механизмов опосредовано  $\mu$ -опиоидными рецепторами на иммунных клетках [23].

Центрально-опосредованные иммуномодулирующие эффекты опиоидов более выражены в тех случаях, когда опиоиды проникают через ГЭБ [25]. Хотя эффекты опиоидов широко применяются для уменьшения проявлений активации симпатического звена нервной системы, опиоиды сами по себе могут также быть причиной активации симпатической нервной системы, которая вызывает подавление пролиферации и функции популяций некоторых иммунных клеток, первичной и вторичной лимфоидной ткани [26]. Взаимодействие опиоидов с гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой и ее звеньями (выработкой адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортизола) — сложный, специфический процесс, зависит от времени суток и продолжительности введения опиоидов, с разными эффектами после острого и хронического применения. Получены данные о том, что кратковременное назначение опиоидов приводит либо к уменьшению, либо к отсутствию изменений в выработке АКТГ или глюкокортикоидов. Очевидно, что опиоиды истощают циркадный ритм АКТГ и кортизола, приводя к увеличению циркулирующих уровней этих гормонов, что может быть достаточным для развития иммуносупрессии [23]. Некоторые исследователи предположили, что  $\mu$ -опиоидные рецепторы экспрессируются

на клетках-моноклеарах в периферической крови [7, 27, 28]. Тем не менее, недавние исследования не выявили каких-либо опиоидных рецепторов или их копий на моноклеарных клетках, забранных из венозной крови [23].

У морфина есть хорошо описанные дозозависимые, иммуносупрессивные эффекты. Известно, что морфин угнетает функцию моноцитов и нейтрофилов, цитотоксичность естественных киллеров, пролиферацию лимфоцитов и макрофагов и синтез цитокинов [7]. Морфин вызывает апоптоз, прямо активируя белки, участвующие в регуляции этого механизма клеточной гибели, подавляет функции лейкоцитов, повышая внутриклеточную концентрацию NO и цАМФ и негативно регулируя фактор NF-kB через NO — зависимые механизмы [7]. Недавние исследования эффектов синтетических опиоидов, использовавшихся в ходе общей анестезии показали, однако, не более чем транзиторные иммуномодулирующие изменения [4, 6, 7].

Известно, что фентанил усиливает цитотоксичность естественных киллеров и повышает их количество; однако выработка супероксида полиморфноядерными лейкоцитами и количество циркулирующих Т- и В-лимфоцитов остается неизменным у здоровых волонтеров [7, 29]. Эти эффекты фентанила на клетки-естественные киллеры кажутся центрально-опосредованными, так как фентанил не оказывает прямого эффекта на активность клеток — естественных киллеров. В двух исследованиях были рассмотрены синтетические опиоиды суфентанил и альфентанил с позиции их ингибирующих эффектов на миграцию лейкоцитов, активность клеток — естественных киллеров и митоген — индуцированную пролиферацию лимфоцитов [4, 6, 7, 30].

### Тиопентал

Тиопентал — это один из наиболее изученных препаратов для общей анестезии, широко применяется для индукции наркоза. При назначении на длительный срок короткой или средней продолжительности действия барбитуратов, которые являются агонистами ГАМК-рецепторов, может нарасти ятрогенная иммуносупрессия. Высокая частота инфекций была описана у пациентов с черепно-мозговой травмой с повышенным внутричерепным давлением, которые получали продленную инфузию тиопентала [7, 31]. Его ингибирующие эффекты на неспецифическую иммунную систему были хорошо подтверждены в нескольких исследованиях. В клинически используемых концентрациях было показано супрессивное действие тиопентала на бактерицидные функции лейкоцитов, поляризацию нейтрофилов, хемотаксис, адгезию, фагоцитоз, окислительный стресс и хемотаксис моноцитов [7, 31]. Описанные ингибирующие эффекты тиопента-

ла указывают на прямое клеточно-опосредованное подавление иммунного ответа и сильный противовоспалительный эффект. В дополнение известно, что тиопентал подавляет митоген/антиген-вызванную пролиферацию лимфоцитов на разных питательных средах и снижает частоту выброса цитокинов в ответ на митогены или эндотоксины [32]. Недавние исследования позволили предположить, что тиопентал подавляет активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [7]. По мнению зарубежных коллег, клинически иммуносупрессивные эффекты тиопентала имеют второстепенное клиническое значение, поскольку он часто используется только для индукции в анестезию [18]. Нам же представляется весьма интересным с клинической точки зрения продолжение исследований в этом направлении, поскольку тиопентал входит в структуру нейровегетативной блокады у больных с острым церебральным повреждением, продолжительность проведения блокады определяется саногенетической направленностью процессов при остром повреждении головного мозга любой этиологии, сроки введения тиопентала могут быть продолжительными.

#### Дексмететомидин

Дексмететомидин — агонист  $\alpha$ 2- адренергических рецепторов в определенных областях головного мозга, снижает уровень провоспалительных цитокинов в экспериментальном сепсисе [33] также, как у пациентов в критическом состоянии [4, 7] и у больных в послеоперационном периоде [34]. Значимое снижение количества лейкоцитов, уровней IL6, интерлейкина 8 (IL8), TNF $\alpha$  и С-реактивного белка (CRP) у пациентов, получавших дексмететомидин, показывает его противовоспалительный потенциал, когда он применяется как компонент нейровегетативной блокады в структуре анестезиологического обеспечения [4, 6, 7]. Несколько механизмов действия были приняты без доказательств для дексмететомидина, включая регуляцию синтеза цитокинов макрофагами и моноцитами при стресс-ответе на хирургическое воздействие, которые также могут быть опосредованы через  $\alpha$ 2-адренорецепторы; подавление апоптоза, центральные симпатолитические эффекты, включая стимуляцию холинергического противовоспалительного пути; и антиноцицептивное действие, включая взаимодействие между болевыми и иммунными факторами (провоспалительными цитокинами) [4, 6, 7]. До сих пор, тем не менее, механизмы этих эффектов остаются неясными [35].

#### Мидазолам

Мидазолам — широко используемый препарат бензодиазепинового ряда, действует на ГАМК — рецепторы ЦНС, повышает нейрональную проницаемость для ионов хлора и приводит к гиперполяризации клеток. Известно, что мидазолам угнетает

определенные иммунные функции [36]. Мидазолам связывается с периферическими рецепторами макрофагов и модулирует их метаболический ответ на оксидативный стресс *in vitro*. Предположили, что клоназепам также связывается с рецепторами макрофагов и подавляет их способность вырабатывать IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$  независимо от Т-клеток [37]. Однако подтверждения данная гипотеза не получила. Результаты проведенных исследований показывают *in vivo* иммуносупрессивные свойства агонистов периферических и смешанных бензодиазепиновых рецепторов (мидазолама, диазепама), но не агонистов центральных рецепторов (клоназепама), которые действуют на функции фагоцитов, включая механизм защиты хозяина, а так же воспалительный ответ [36]. Мидазолам может вызывать супрессию функций нейтрофилов у человека и препятствовать активации клеток, вызванной TNF $\alpha$  *in vitro*, подавлять экспрессию IL6 в человеческих клетках мононуклеарах [38].

*In vitro* введение мидазолама в макрофаги, стимулированные липополисахаридом, подавляет оксидативный взрыв — синтез активных форм кислорода, активацию NF- $\kappa$ B, активацию протеинкиназы p38, который, как было доказано, играет ключевую роль в синтезе липополисахарид-индуцированной циклооксигеназы-2 (COX2) и NO-синтазы путем стимуляции провоспалительных фенотипов макрофагов [39]. Несмотря на все вышесказанное, инфузия мидазолама не подавляла продукцию цитокинов у септических больных [36].

#### Кетамин

Кетамин — частичный антагонист NMDN-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторов, действует на разных уровнях воспаления, взаимодействуя с клетками иммунной системы, синтезом цитокинов и регуляцией воспалительных медиаторов [40]. Иммуносупрессивные эффекты кетамина были недавно обнаружены в связи с подавлением транскрипции факторов NF- $\kappa$ B и белок активатор 1 (AP1), которые регулируют выработку некоторых провоспалительных медиаторов [41]. Предположение, что кетамин вмешивается в иммунитет, возникло в ходе ранних исследований по улучшению исходов у пациентов в критическом состоянии и в экспериментальной модели септического шока [42]. *In vivo*, при использовании кетамина в субанестетической дозе выявлено дозозависимое снижение смертности со значительным уменьшением выработки TNF $\alpha$  и IL6 у крыс с сепсисом [40, 43]. Внутривенное введение кетамина предотвращает выход альбумина из сосудистого русла в экспериментальной модели перитонита у крыс [43]. В других исследованиях в анестетических дозах кетамин ослабляет вызванное липополисахаридом повреждение печени со снижением COX2, NO-синтазы и активностью

NF- $\kappa$ B-рецепторов [40, 43]. Эти данные точно показывают, что кетамин может вызывать противовоспалительный эффект *in vivo*. Противовоспалительные эффекты кетамина также были выявлены в клинических испытаниях. Низкие дозы кетамина 0,2–0,5 mg/kg значительно подавляют интраоперационное и послеоперационное повышение ИЛ6 и CRP в сыворотке крови пациентов, которым проводилось аорто-коронарное шунтирование с применением искусственного кровообращения [40, 43]. Однако, низкие дозы кетамина не показали противовоспалительных эффектов у пациентов низкого риска, которым проводилось коронарное шунтирование на работающем сердце. Поэтому мнение о противовоспалительных свойствах кетамина остается противоречивым [43].

### **Клиническое значение противовоспалительных эффектов общих анестетиков**

Эффекты, оказываемые анестетиками на иммунитет, получены преимущественно в исследованиях *in vitro*, потому что клинические исследования на человеке более сложные, включающие такие характеристики, как тип и продолжительность хирургического вмешательства, послеоперационные осложнения у пациента. Хотя сложно определить сравнительное влияние хирургического стресса, средств для анестезии и анальгезии на иммунную систему человека, анестезиолог не должен игнорировать иммуносупрессивные эффекты средств для наркоза на иммунитет в периоперационном периоде [4].

В дополнение к влиянию на неспецифический клеточно-опосредованный иммунитет некоторые техники местной анестезии могут частично подавлять нейроэндокринный ответ на хирургическую травму. Субарахноидальные и эпидуральные блокады сдерживают вызванное хирургическим вмешательством повышение уровней эпинефрина, норэпинефрина и кортизола в плазме [44].

### **Отделение интенсивной терапии**

В то время как легкий иммуносупрессивный эффект анестезии во время хирургического вмешательства менее важен вследствие ограниченной продолжительности воздействия, интенсивная терапия предполагает другой комплекс проблем. В отделении интенсивной терапии пациенты часто подвергаются воздействию анестетиков в течение нескольких дней и недель. Было показано, что побочные эффекты иммуносупрессии клинически важны у этих пациентов. В данном контексте уже в 1956 г. было описано угнетение костного мозга после пролонгированной вентиляции закисью азота [45].

Позднее в 1983 г. рост смертности в отделении интенсивной терапии был зарегистрирован после введения этомида для седации. Смертность па-

циентов, получавших седацию этомидом, составляла 77% против 28% у пациентов, которые не получали этот препарат. Позже было открыто, что этомидат подавляет синтез предшественника кортизола и таким образом понижает уровень кортизола в плазме [46]. Высокая частота инфекций также была описана у пациентов интенсивной терапии, длительно получавших инфузию тиопентала.

Пропофол или бензодиазепины наиболее часто используются для продленной седации в отделениях интенсивной терапии. Исследования на животных показали уменьшение защиты от инфекций, сопровождающее длительное введение пропофола так же, как и бензодиазепинов. Единственное исследование показало повышение уровней провоспалительных цитокинов (ИЛ1 $\beta$ , ИЛ6, TNF $\alpha$ ) в плазме, сопровождающее длительное введение пропофола, в то же время при длительном введении бензодиазепинов выработка провоспалительных цитокинов уменьшалась. Чтобы избежать потенциально вредного эффекта длительной седации у больных в критическом состоянии, продолжительность седации и используемые дозировки должны быть уменьшены насколько это возможно, но не минимальные, так как эти пациенты иммунокомпрометированы. Рекомендованы ежедневные пробные пробуждения — диагностические «окна», чтобы уменьшить риск чрезмерной седации [4, 6, 7, 13].

### **Заключение**

Длительное время предполагалось, что общие анестетики отрицательно влияют на разные аспекты функционирования иммунной системы, либо косвенно изменяя ответ на стресс, либо непосредственно воздействуя на работу иммунокомпетентных клеток. Хотя эти эффекты кратковременны и имеют малую значимость для пациентов с нормальной иммунной системой, у пациентов с ранее существующими иммунными нарушениями или полиорганной недостаточностью, а также в группах пациентов высокого риска влияние анестетика и выбор техники анестезии может иметь важное клиническое значение для периоперационного системного воспалительного ответа.

Эффект анестетиков на иммуномодуляцию при воспалении сложен, иммуносупрессия может привносить как позитивный, так и негативный вклад. Следовательно, выбор и использование средства для общей анестезии зависит от иммунного статуса каждого пациента. Возможные опасности ассоциируются с периоперационной иммуносупрессией, включая повышенный риск метастазирования опухоли и инфекции.

### **Конфликт интересов / Conflict of interest**

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

## Список литературы / References

1. The systemic inflammatory response to anaesthesia and surgery. *Curr Anaesth Crit Care*. 2008; 19: 349–353.
2. Homburger J, Meiler S. Anesthesia drugs, immunity, and long-term outcome. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2006; 19: 423–428.
3. Vallejo R, Hord E, Barna S, et al. Perioperative immunosuppression in cancer patients. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2003; 22: 139–146.
4. Kurosawa S, Kato M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. *J Anesth*. 2008; 22: 263–277.
5. Kelbel I, Weiss M. Anesthetics and immune function. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2001; 14: 685–691.
6. Colcci D, Puig N, Hernandez P. Influence of anesthetic drugs on immune response: from inflammation to immunosuppression. *AO Anesthetics*. 2013; 1: 21–38.
7. Schneemilch C, Schilling T, Bank U. Effects of general anesthesia on inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004; 18: 493–507.
8. Cruz F, Rocco P, Pelosi P. Anti-inflammatory properties of anesthetic agents. *Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2017*. Edited by J.-L. Vincent. Springer, 2017: 401–413.
9. Elenkov I, Chrousos G. Stress hormones, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 966: 290–303.
10. Kennedy B, Hall G. Neuroendocrine and inflammatory aspects of surgery: do they affect outcome? *Acta Anaesthesiol Belg*. 1999; 50: 205–209.
11. Graham E. The influence of ether and ether anesthesia on bacteriolysis, agglutination and phagocytosis. *J Infect Dis*. 1911; 8: 147–175.
12. Simeonova G, Slovov E, Usunov R, et al. Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) during general and epidural anaesthesia in dogs. *Vet Res Commun*. 2008; 32: 619–626.
13. Fridman H, Newton C, Klein T. Microbial Infection, Immunomodulation, and Drugs of Abuse. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 209–219.
14. Yoon-Mi L, Byeng C, Kyung-Jin Y. Impact of volatile anesthetics on oxidative stress and inflammation. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 242709.
15. Blum F, Zuo Z. Volatile anesthetics-induced neuroinflammatory and anti-inflammatory responses. *Med Gas Res*. 2013; 3: 16.
16. Whitaker E, Christofi F, Quinn K, et al. Selective induction of IL-1 $\beta$  after a brief isoflurane anesthetic in children undergoing MRI examination. *J Anesth*. 2017; 31: 219–224.
17. Frohlich D, Rothe G, Schwall B, et al. Thiopentone and propofol, but not methohexitone nor midazolam, inhibit neutrophil oxidative responses to the bacterial peptide FMLP. *Eur J Anesthesiol*. 1996; 13: 582–588.
18. Jensen A, Dahlgren C. Propofol decreases random and chemotactic stimulated locomotion of human neutrophils in vitro. *Br J Anaesth*. 1993; 70: 99–100.
19. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, et al. Propofol inhibits human neutrophil function. *Anest Analg*. 1998; 87: 695–700.
20. Cleary T, Pickering L. Mechanisms of intralipid effect on polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Lab Immunol*. 1983; 11: 21–26.
21. Pirtinkangas C, Perttinen J, Salo M. Propofol emulsion reduces proliferative responses of lymphocytes from intensive care patients. *Intensive Care Med*. 1993; 19: 299–302.
22. Hoff G, Bauer I, Larsen B, et al. Modulation of endotoxin-stimulated TNF- $\alpha$  gene expression by ketamine and propofol in cultured human whole blood. *Anaesthesist*. 2001; 50: 494–499.
23. Al-Hashimi M, Scott W, Thompson J, et al. Editor's choice: Opioids and immune modulation: more questions than answers. *Br J Anaesth*. 2013; 111: 80–88.
24. Sacerdote P. Opioids and the immune system. *Palliat Med*. 2006; 20: s9-15.
25. Hernandez M, Flores L, Bayer B. Immunosuppression by morphine is mediated by central pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 267: 1336–1341.
26. Hall D, Suo J, Weber R. Opioid mediated effects on the immune system: sympathetic nervous system involvement. *J Neuroimmunol*. 1988; 83: 29-35.
27. Bidlack J. Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7: 719–723.
28. Ritten H, Brack A, Machelska H, et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology*. 2001; 95: 500–508.
29. Jacobs R, Kars M, Scheinichen D, et al. Effects of fentanyl on cellular immune functions in man. *Int J Immunopharmacol*. 1999; 21: 445–454.
30. Sacerdote P, Gaspani L, Rossoni G, et al. Effect of the opioid remifentanyl on cellular immune response in the rat. *Int J Immunopharmacol*. 2001; 1: 713–719.
31. Eberhardt K, Thimm B, Spring A, et al. Dose-dependent rate of nosocomial pulmonary infection in mechanically ventilated patients with brain oedema receiving barbiturates: a prospective case study. *Infection*. 1992; 20: 12–18.
32. Chanimov M, Berman S, Weissgarten J, et al. Substances used for local and general anaesthesia in culture. *Eur J Anaesth*. 2000; 17: 248–255.
33. Cavalcanti V, Santos C, Samary C, et al. Effects of short-term propofol and dexmedetomidine on pulmonary morphofunction and biological markers

in experimental mild acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014; 203:45-50.

34. Kang S, Kim Y, Hong T, et al. Effects of dexmedetomidine on inflammatory responses in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2013; 57:480-487.

35. Li B, Li Y, Tian S, et al. Anti-inflammatory effect of perioperative dexmedetomidine administered as an adjunct to general anesthesia: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2015; 5: 12342.

36. Memis D, Hekimoglu S, Vatan I, et al. Effects of midazolam and dexmedetomidine on inflammatory responses and gastric intramucosal pH to sepsis, in critically ill patients. *Br J Anaesth.* 2007; 98:550-552.

37. Zavala F, Haumont J, Lenfant M. Interaction of benzodiazepines with mouse macrophages. *Eur J Pharmacol.* 1984; 106: 561-566.

38. Nishna K, Akamatsu H, Mikawa K, et al. The inhibitory effects of thiopental, midazolam, and ketamine on human neutrophil functions. *Anesth Analg.* 1998; 86: 159-165.

39. Kim S, Son S, Lee S, et al. Midazolam inhibits proinflammatory mediators in the lipopolysaccharide-activated macrophage. *Anesthesiology.* 2006; 105: 105-110.

40. Loix S, De Kock M, Henin P. The anti-inflammation effects of ketamine: state of the art. *Acta Anaesthesiol Belg.* 2011; 62:47-58.

41. Welters I, Hafer G, Menzebach A, et al. Ketamine inhibits transcription factors activator protein 1 and nuclear factor-kappaB, Interleukin-8 production, as well as CD11b and CD16 expression: studies in human leukocytes and leukocytic cell lines. *Anesth Analg.* 2010; 110:934-941.

42. Kock M, Loix S, Lavand'homme P. Ketamine and peripheral inflammation. *CNS Neurosci Ther.* 2013; 19:403-410.

43. Hirota K, Lambert D. Ketamine: new uses for an old drug? *Br J Anaesth.* 2011; 107:123-126.

44. Hahnenkamp K, Herroeder S, Hollman M. Regional anaesthesia, local anaesthetics and the surgical stress response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004; 18:509-527.

45. Lassen H, Henriken E, Neukirch F, et al. Treatment of tetanus; severe bone marrow depression after prolonged nitrous-oxide anaesthesia. *Lancet.* 1956; 270:527-530.

46. Fellows I, Byrne A, Allison S. Adrenocortical suppression with etomidate. *Lancet.* 1983; 2: 54-55.

#### Информация об авторах:

Саввина Ирина Александровна, д.м.н., доцент, гл. науч. сотрудник «Российского научно-исследовательского нейрохирургического института им. проф. А. Л. Поленова» филиала ФГБУ «Наци-

ональный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, проф. кафедры анестезиологии и реаниматологии им. В. Л. Ваневского ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

48. Костарева Анна Александровна, к.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Федоров Антон Владимирович, к.б.н., зав. НИЛ молекулярно-клеточных механизмов атеросклероза Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Рутковский Роман Валерьянович, зав.отделением анестезиологии и реанимации с палатами интенсивной терапии № 12 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Распутина Дарья Алексеевна, врач анестезиолог-реаниматолог отделения анестезиологии и реанимации с палатами интенсивной терапии № 12 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Малхозова Анна Мухарбиевна, врач анестезиолог-реаниматолог отделения анестезиологии и реанимации с палатами интенсивной терапии № 12 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

#### Author information:

Irina A. Savvina, MD, PhD, Almazov National Medical Research Centre, chief research scientist of Russian Polenov Neurosurgical Institute, associate professor, North-West State Mechnikov Medical University, professor of the chair of anaesthesiology and reanimatology named after V.L.Vanevskiy;

Anna A. Kostareva, MD, PhD, Director of the Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Anton V. Fedorov, PhD, Head of the laboratory of molecular and cellular mechanisms of atherosclerosis, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Roman V. Rutkovskiy, Head of the department of anaesthesiology, reanimatology and intensive care, Almazov National Medical Research Centre;

Daria A. Rasputina, anaesthesiologist-reanimatologist of the department of anaesthesiology, reanimatology and intensive care, Almazov National Medical Research Centre;

Anna M. Malkhozova, anaesthesiologist-reanimatologist of the department of anaesthesiology, reanimatology and intensive care, Almazov National Medical Research Centre.

## **T2\* МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ РЕЛАКСОМЕТРИЯ В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ НЕИНВАЗИВНОЙ ОЦЕНКЕ ПЕРЕГРУЗКИ ЖЕЛЕЗОМ ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА**

**Титова А.М., Труфанов Г.Е., Фокин В.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр  
им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Контактная информация:**

Титова Анна Михайловна  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России  
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197341.  
E-mail: anisa33@mail.ru

*Статья поступила в редакцию 25.09.2017  
и принята к печати 14.11.2017.*

### **Резюме**

С целью объективной оценки перегрузки железом печени и сердца у больных с гемохроматозами различного генеза 60 пациентам была выполнена магнитно-резонансная томография (МРТ) с использованием методики T2\*- релаксометрии. Исследование проводили на высокопольном магнитно-резонансном томографе с индукцией магнитного поля 1,5 Тл.

Было проведено сопоставление данных МРТ с лабораторными данными пациентов, а именно, с концентрацией ферритина в сыворотке крови.

В результате проведенной работы доказано, что T2\* магнитно-резонансная релаксометрия является высокоэффективной методикой, в настоящее время позволяет предоставить самую точную информацию о перегрузке железом печени и сердца из неинвазивных методов исследования, и требует обязательного включения в протокол обследования пациентов при подозрении на наличие перегрузки железом, особенно при планировании терапии хелаторами железа.

**Ключевые слова:** Магнитно-резонансная томография (МРТ), T2\* магнитно-резонансная релаксометрия, перегрузка железом, гемохроматоз, печень, сердце.

*Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (5): 37–45.*

## T2 \* MAGNETIC-RESONANCE RELAXOMETRY IN NON-INVASIVE QUANTITATIVE IRON OVERLOAD ASSESSMENT OF LIVER AND HEART

Titova A.M., Trufanov G.E., Fokin V.A.

<sup>1</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

**Corresponding author:**

Anna M. Titova  
Almazov National Medical Research Centre  
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,  
Russia, 197341  
E-mail: anisa33@mail.ru

Received 25 September 2017;

accepted 14 November 2017.

### Abstract

For the purpose of an objective assessment of liver and heart iron overload in patients with hemochromatosis of various genesis, 60 patients underwent magnetic resonance imaging (MRI) using the T2 \*-relaxometry technique.

The study was performed on a high-field magnetic resonance scanner by induction of a magnetic field of 1.5 T.

A comparison was made of the data obtained during the MRI with the laboratory data of patients, namely, the concentration of serum ferritin.

As a result of the work it was shown that the technique T2 \* MR -relaxometry is effective, to date provides the most accurate information from non-invasive methods for examining iron overload, and requires inclusion in the protocol of patients with suspicion of iron overload, especially when planning therapy with iron chelators.

**Key words:** magnetic resonance imaging (MRI), magnetic resonance T2 \* -relaxometry, iron overload, hemochromatosis, liver, heart.

*For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (5): 37–45.*

### Введение

Перегрузка железом — состояние, формирующееся вследствие гиперабсорбции железа через желудочно-кишечный тракт, а также при многократных гемотрансфузиях эритроцитарной массы нуждающимся пациентам [1].

Перегрузка железом угрожает развитием таких патологических состояний, как сердечная недостаточность, прогрессирующий фиброз печени вплоть до цирроза, нарушение толерантности к глюкозе вплоть до сахарного диабета, нарушение функции и развития гипофиза и гонад у детей [2].

Диагностика перегрузки железом у пациентов с талассемией и онкогематологическими заболеваниями в последние десятилетия приобретает все большее значение в связи с возрастающим доступом к современным методам лечения, таким как трансплантация костного мозга и высокоэффективные линии химиотерапии. Применение данных методов

лечения позволяет достигать высоких показателей продолжительности жизни, определяет необходимость в улучшении качества жизни больных.

Избыточное накопление железа в организме при разнообразных заболеваниях системы крови — предиктор неблагоприятного исхода трансплантации костного мозга, которая является наилучшим методом лечения онкогематологических пациентов и пациентов с талассемией [3].

Способами оценки перегрузки организма железом в настоящее время являются (в порядке доступности): количественный гемотрансфузионный анамнез, сывороточная концентрация ферритина, степень насыщения трансферрина, магнитно-резонансная томография (МРТ) печени и сердца, пункционная биопсия печени [4].

Исследование сывороточного уровня ферритина является общедоступным методом оценки степени перегрузки железом, однако, у гематоло-

гических больных с перегрузкой железом не существует единого порогового значения уровня сывороточного ферритина, при котором следовало бы начинать терапию хелаторами, поскольку на него также влияют воспалительные и неопластические процессы. Необходимо дополнять изучение данного показателя другими исследованиями, дающими точную количественную оценку содержания железа в жизненно важных органах [1].

Биопсия печени, хоть и является самым точным методом определения концентрации железа [5], является инвазивной, болезненной и несет потенциальный риск инфицирования. На сегодняшний день биопсия печени все больше отходит на второй план и приобретает историческое значение, повсеместно вытесняясь магнитно-резонансной томографией печени и сердца [1].

Печень в первую очередь подвержена избыточному накоплению железа. Именно поэтому концентрация железа в печени (Liver Iron Concentration/ LIC) принята стандартом для оценки общей перегрузки организма железом, и высчитывается по формуле Angelucci: Общая нагрузка железом организма (мг/кг) =  $10,6 \times LIC$  (в мг/г) [4].

Оценка концентрации железа в миокарде (Myocardial Iron Concentration/MIC) производится по причине того, что перегрузка железом сердца является одной из главных причин летальности гемотрансфузионно-зависимых больных [4]. Отсутствие перегрузки железом печени не говорит об отсутствии перегрузки железом сердца [6]. Перегрузка железом других органов имеет менее важное значение в клинической практике.

Физиологического механизма экскреции избыточного количества железа не существует. Хелаторы железа — единственная группа препаратов, способствующая выведению ионов железа из организма. Однако, в связи с наличием побочных эффектов у хелаторов железа, а также их высокой стоимости, необходима объективная обоснованность их назначения. Поскольку железо в организме участвует в выполнении ряда важнейших биохимических функций, избыточное хелатирование может быть опасным, т.е. мониторинг хелатирования является обязательным условием лечения.

В настоящее время для неинвазивной оценки концентрации железа в тканях и органах человека используется методика магнитно-резонансной T2\*-релаксометрии. Методика основана на регистрации снижения интенсивности сигнала от участка ткани, насыщенного ионами трехвалентного железа. Для расчета содержания железа в печени и сердце используется оценка параметра времени релаксации T2\*, являющегося временем поперечной

релаксации в GRE-последовательности, представляющей собой комбинацию «истинной» релаксации и релаксации T2, вызванной неоднородностью магнитного поля.

Применение методики магнитно-резонансной T2\*- релаксометрии позволяет дать точную количественную оценку перегрузки организма железом, используя таблицы соответствия определенных значений T2\* конкретным концентрациям железа в исследуемых органах [6, 7]. Многие исследователи [4, 8] убеждены в необходимости включения методики магнитно-резонансной T2\*- релаксометрии в протокол обследования пациентов с подозрением на перегрузку железом, особенно при планировании терапии хелаторами железа.

### Цель исследования

Оценить возможность использования методики магнитно-резонансной T2\*-релаксометрии для объективной количественной оценки перегрузки железом печени и сердца у пациентов гематологического профиля, в качестве альтернативной или дополняющей методики, сравнить полученные данные с показателями концентрации ферритина сыворотки крови.

### Материалы и методы

Магнитно-резонансная T2\*-релаксометрия печени и сердца выполнена 60 пациентам с лабораторно подтвержденной перегрузкой железом. Среди них было 38 мужчин и 22 женщины. Средний возраст составил  $44,8 \pm 1,5$  лет. Показатель концентрации ферритина сыворотки крови у всех пациентов получен за один месяц до выполнения МРТ.

Распределение нозологических форм заболеваний пациентов представлено в таблице 1.

Из таблицы 1 следует, что наибольшее число нозологических форм составляли пациенты с миелодиспластическим синдромом (14) и первичным гемохроматозом (10). Реже встречались пациенты с лимфопролиферативными заболеваниями, также были больные гемохроматозом неуточненного генеза.

Среди обследованных пациентов 44 (73,3%) человека имели факт трансфузии эритроцитарной массы в анамнезе, остальные 16 (26,7%) не имели.

У всех пациентов были лабораторные исследования концентрации сывороточного ферритина, а у 44 трансфузионно зависимых пациентов были данные об общем количестве перелитой эритроцитарной массы.

Исследования проводили на высокопольном МР-томографе «Magnetom Espree» с индукцией магнитного поля 1,5 Тл с применением поверхностной матричной катушки для тела.

**Таблица 1. Нозологические формы заболеваний и количество обследованных пациентов**

| Заболевание                      | Количество пациентов |            |
|----------------------------------|----------------------|------------|
|                                  | Абс.                 | %          |
| Талассемия                       | 9                    | 15         |
| Миелодиспластический синдром     | 14                   | 23,3       |
| Апластическая анемия             | 9                    | 15         |
| Первичный гемохроматоз           | 10                   | 16         |
| Первичный миелофиброз            | 8                    | 13,3       |
| Лимфопролиферативные заболевания | 2                    | 3,3        |
| Миелопролиферативные заболевания | 6                    | 10         |
| Другие неуточненные заболевания  | 2                    | 3,3        |
| <b>ВСЕГО</b>                     | <b>60</b>            | <b>100</b> |

Исследования сердца на МР-томографе выполнялось с кардиосинхронизацией, исследования выполняли на задержке дыхания. Для получения МР-изображений применяли двухкамерную позицию по короткой оси, с применением 10 минимально отличающихся друг от друга значений TE (1,93...3,5...5,2...6,9...8,7...10,4...12,1...13,9...15,6...17,3 мс), TR = 600 мс, толщина среза — 10 мм. В области межжелудочковой перегородки (МЖП) выбирали участок ткани площадью не менее 1 см<sup>2</sup> (рис.1).

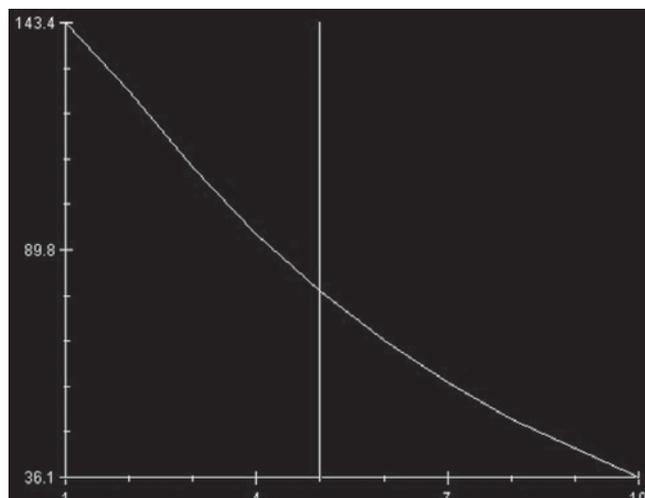
После получения МР-изображений с различным временем TE строили график спада интенсивности МР-сигнала (рис.1) с использованием встроенного приложения Mean Curve, а затем по времени T2\* определяли концентрацию железа в сердце:  $MIC = 45 \times (T2^*) - 1,22$  [6].

**Рисунок 1. Выбор ROI в сердце для построения графика падения интенсивности МР-сигнала**

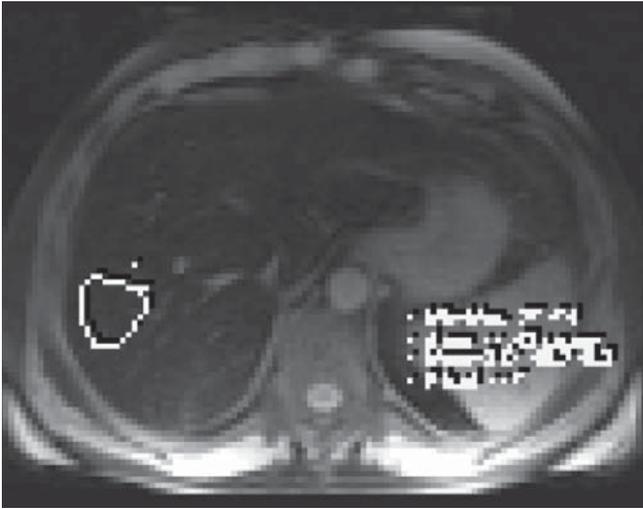


Для оценки содержания железа в печени МР-сканирование осуществляли на задержке дыхания при получении срезов в аксиальной плоскости, срез проходит через участки, наиболее обеднённые интерстициальными элементами с большим массивом паренхимы (как правило, сегменты S7, S8), с применением 12 минимально отличающихся друг от друга значений TE (1,3...2,5...3,6...4,8...5,9...7,1...8,3...9,4...10,6...11,7...12,9...14,1 мс), TR = 200 мс, толщиной среза — 10 мм. Выбирали наиболее бессосудистый участок паренхимы не менее 2 см<sup>2</sup> (рис.3), не менее чем на трех уровнях. Использовали встроенное приложение Mean Curve, строили график спада интенсивности МР-сигнала (рис.4). Далее исходя из величины T2\* и обратной для него R2\* вычисляли концентрацию железа в печени:  $LIC = 0,03 \times R2^* + 0,74$  [8].

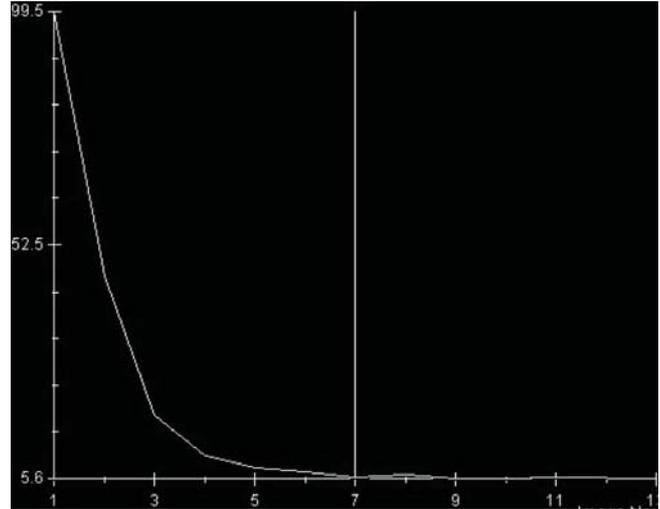
**Рисунок 2. График спада интенсивности МР-сигнала от участка миокарда**



**Рисунок 3. Выбор ROI в печени для построения графика падения МР-сигнала**



**Рисунок 4. График спада интенсивности МР-сигнала от участка паренхимы печени**



Результаты представлены в виде медианы (МЕ) и межквартильного интервала (LQ–UQ), с целью сравнения которых использован непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимым считался критерий достоверности  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждения**

В результате проведения магнитно-резонансной T2\*-релаксометрии сердца пациенты были разбиты на две группы: I группа: с выявленной перегрузкой железом миокарда — 4 (6,6%); II группа: перегрузка железом миокарда не выявлена — 56 (93,4%).

В I группе была выявлена перегрузка железом миокарда у 4 больных (6,6%), во всех случаях перегрузка имела умеренную степень выраженности (время T2\* — 10–15 мс, МПС — 1,65–2,71 мг/г).

Были сопоставлены данные лабораторных исследований (сывороточная концентрация ферритина, нормальные значения которой — до 1000мкг/л) с концентрацией железа в миокарде у пациентов с выявленной перегрузкой железом сердца (табл. 2).

Таким образом, лишь у одного пациента наличие перегрузки железом миокарда со сред-

ней степенью выраженности не подтвердилось лабораторно, но было выявлено благодаря магнитно-резонансной T2\*-релаксометрии, что потребовало немедленного назначения хелаторов железа.

Данный пациент, 27 лет, с диагнозом сидеробластная анемия, и колебаниями сывороточной концентрации ферритина 363–900 мкг/л за последний месяц (при норме до 1000 мкг/л) с более чем 100 гемотрансфузий в анамнезе, желтушными кожными покровами и повышением трансаминаз в крови, направлен на МРТ в связи с несоответствием клинической картины данным лабораторных исследований. Ниже представлены изображение участка межжелудочковой перегородки данного пациента (рис. 5) и график падения интенсивности МР-сигнала (рис. 6).

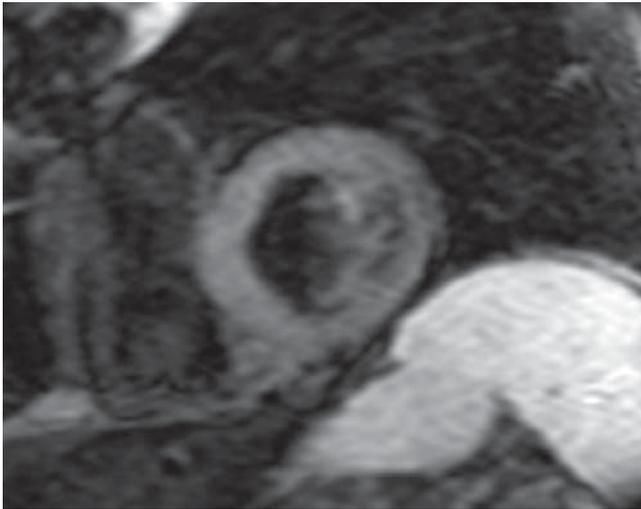
В результате проведения T2\* магнитно-резонансной релаксометрии печени, пациенты были разбиты на следующие группы и подгруппы:

I группа: перегрузки железом печени не выявлено — 8 (13,3%), типичный график падения интенсивности сигнала представлен на рис. 7 (а);

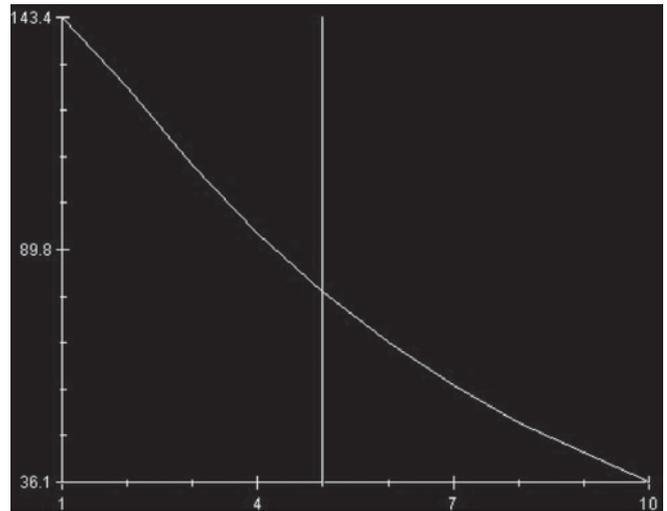
**Таблица 2. Сопоставление данных МРТ и лабораторных исследований**

| Пол и возраст пациента | Вид нозологии                | Концентрация железа в миокарде (мг/г) | Концентрация ферритина в сыворотке (мкг/л) |
|------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--|
| Мужчина, 53 года       | Первичный гемохроматоз       | 2,46                                  | 3825                                       |
| Мужчина, 27 лет        | Сидеробластная анемия        | 2,16                                  | 363-900                                    |
| Мужчина, 39 лет        | Талассемия                   | 1,73                                  | 3223                                       |
| Мужчина, 50 лет        | Миелодиспластический синдром | 2,15                                  | 2047                                       |

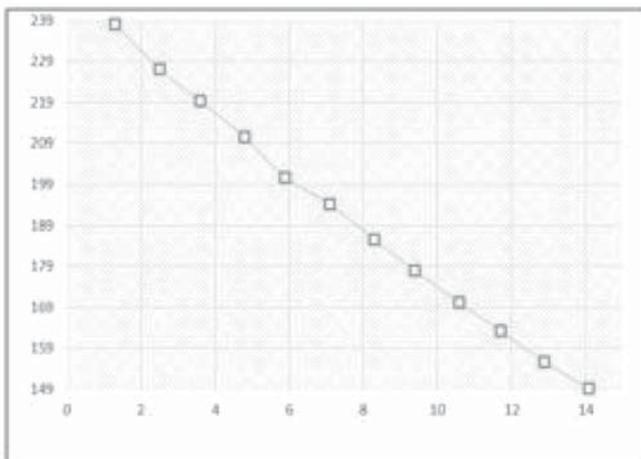
**Рисунок 5. Контрольный участок в области межжелудочковую перегородку**



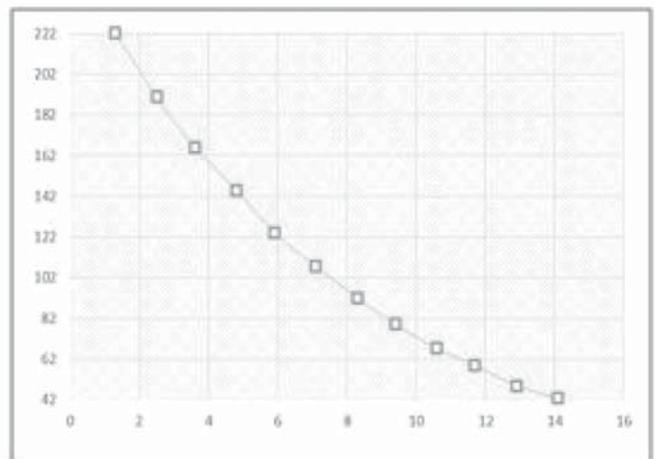
**Рисунок 6. График спада интенсивности сигнала от участка в области межжелудочковую перегородку**



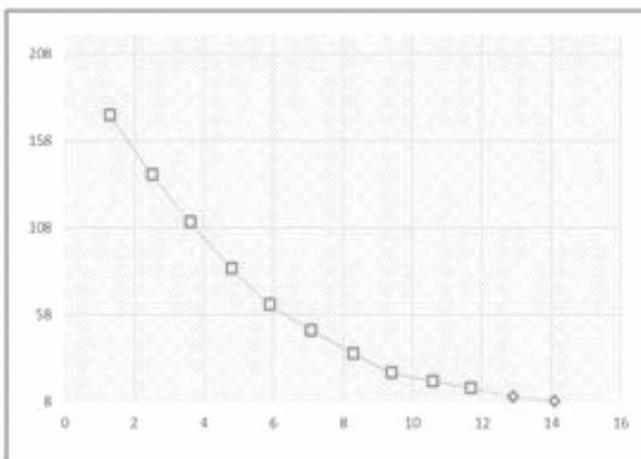
**Рисунок 7. Графики падения МР-сигнала.**



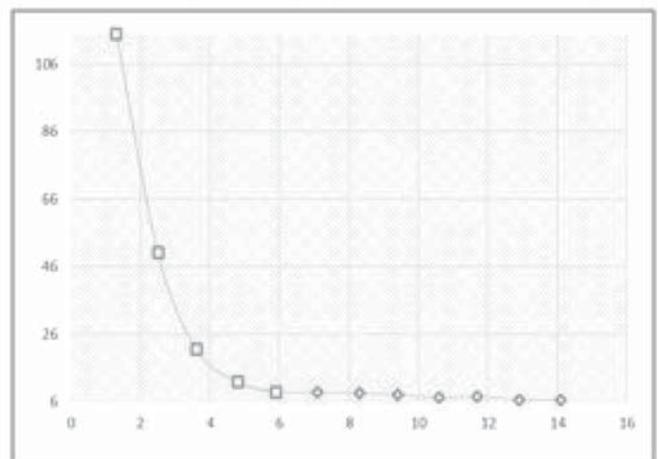
а



б



в



г

Ось Y — интенсивность сигнала, ось X — время TE. Четко прослеживается обратная зависимость: чем меньше время падения МР-сигнала, тем больше значение перегрузки железом

**Таблица 3. Сопоставление данных МРТ у пациентов без выявленной перегрузки печени и лабораторных данных**

| Пол и возраст пациента | Диагноз                      | Концентрация железа в печени (мг/г) | Концентрация ферритина в сыворотке (мкг/л) |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--|
| Женщина, 31 год        | Гемолитическая анемия        | 0,24                                | 124  |
| Мужчина, 30 лет        | Первичный гемохроматоз       | 1,31                                | 1011                                       |
| Мужчина, 62 года       | Первичный гемохроматоз       | 1,31                                | 170  |
| Мужчина, 14 лет        | Талассемия                   | 1,0                                 | 1651                                       |
| Женщина, 7 лет         | Талассемия                   | 1,21                                | 168,5                                      |
| Женщина, 57 лет        | Миелодиспластический синдром | 1,66                                | 165  |
| Мужчина, 25 лет        | Первичный гемохроматоз       | 1,11                                | 1051                                       |
| Мужчина, 38 лет        | Первичный гемохроматоз       | 1,31                                | 1466                                       |

II группа: с выявленной перегрузкой железом печени — 53 (86,6%):

— перегрузка легкой степени выраженности — 21 (35% от общего числа обследованных), типичный график падения интенсивности сигнала на рис.7(б);

— умеренно выраженная перегрузка — 19 (31,6% от общего числа обследованных), типичный график падения интенсивности сигнала на рис.7 (в);

— тяжелая перегрузка - 12 (20% от общего числа обследованных), типичный график падения интенсивности сигнала на рис. 7 (г).

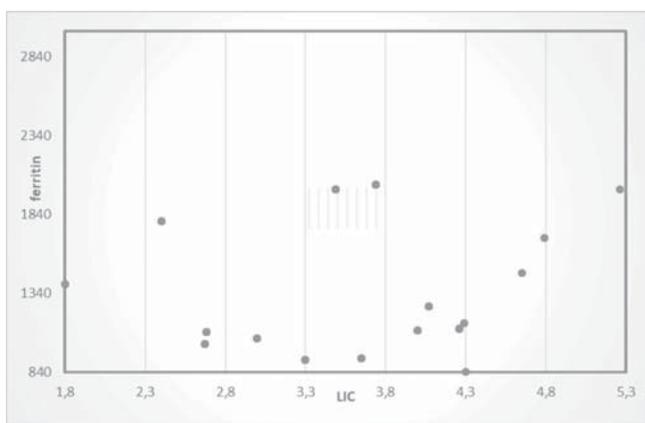
Были сопоставлены данные лабораторных исследований (сывороточная концентрация ферритина, нормальные значения которой — до 1000 мкг/л) с данными магнитно-резонансной T2\* релаксометрии

печени, при которой перегрузки железом органа выявлено не было ( $T2^* > 15,4$  мс, LIC > 2 мг/г). Данные представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что повышение сывороточной концентрации ферритина у 50% обследованных пациентов без перегрузки железом было неспецифическим (вероятно, указывало на сопутствующие воспалительные процессы в организме).

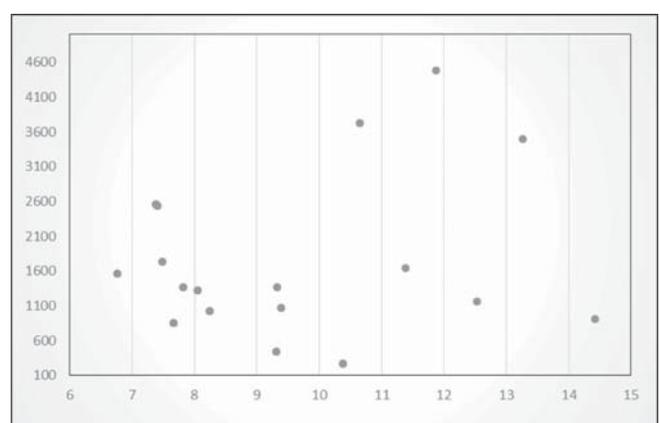
Были сопоставлены данные лабораторных исследований (сывороточная концентрация ферритина, нормальные значения которой — до 1000 мкг/л) с результатами магнитно-резонансной T2\* релаксометрии печени у 21 пациента, при которой была получена легкая степень перегрузки железом органа (время  $T2^* = 4,5 — 15,4$  мс; LIC = 2-7 мг/г) (график 1)

**График 1. Сопоставление результатов МРТ (T2\*-релаксометрии) у пациентов с выявленной легкой степенью перегрузки и данных лабораторных исследований**



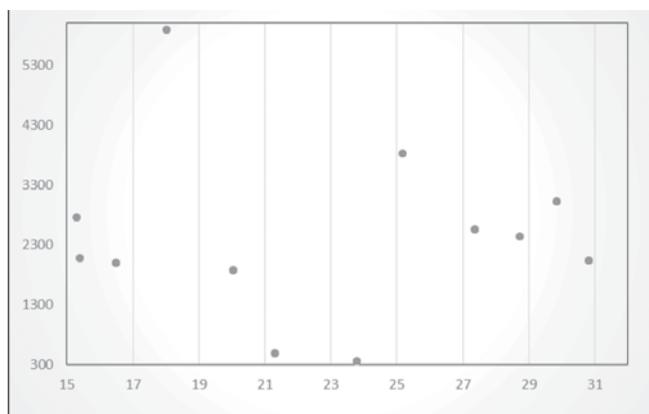
Ось X — LIC, ось Y — концентрация ферритина сыворотки крови.

**График 2. Сопоставление результатов МРТ с умеренной степенью перегрузки и данных лабораторных исследований**



Ось X — LIC, ось Y — концентрация ферритина сыворотки крови

**График 3. Сопоставление результатов МРТ (T2\*-релаксометрии) у пациентов с тяжелой степенью перегрузки и данных лабораторных исследований**



Ось X — LIC, ось Y — концентрация ферритина сыворотки крови

Из данного распределения следует, что у 14,2% пациентов с нормальными, но пограничными показателями ферритина сыворотки крови уже имелась легкая степень перегрузки. В случае с одним из пациентов, сывороточный ферритин которого превышал 10500 мкг/л (значение вне области графика), можно было бы ожидать пропорционально большее значение перегрузки печени, однако перегрузка легкой степени, вероятнее всего, свидетельствует о наличии в организме источника воспаления.

Были сопоставлены данные лабораторных исследований (сывороточная концентрация ферритина, нормальные значения которой — до 1000 мкг/л) с результатами магнитно-резонансной T2\* релаксометрии печени у 19 пациентов, при которой была получена умеренная степень перегрузки железом органа: (время T2\* = 2,1–4,5 мс; LIC = 7–15 мг/г) (график 2).

Из графика 2 следует, что у пациентов с умеренными (средними) степенями перегрузки железом также встречались как пограничные с нормой показатели ферритина сыворотки крови, так и экстремально низкие (265 мкг/л, нормальные в отсутствии патологии) для данной степени перегрузки (10,38 мг/г) значения ферритина сыворотки крови. В 84,2% случаев тенденции подъема ферритина все-таки отражала наличие перегрузки железом, однако не были им пропорциональны.

Были сопоставлены данные лабораторных исследований (сывороточная концентрация ферритина, нормальные значения которой — до 1000 мкг/л) с результатами магнитно-резонансной T2\* релаксометрии печени у 12 пациентов, при которой была получена тяжелая степень перегрузки железом органа (время T2\* <2,1 мс; LIC > 15 мг/г) (график 3).

В группе пациентов с тяжелой перегрузкой также определяется случай отсутствия повышения ферритина сыворотки крови (363 мкг/л), при концентрации железа в печени 21,3 мг/г. В основном же тенденция повышения ферритина при тяжелой степени перегрузки отвечает ожиданиям, в 83,3 % тяжелых перегрузок печени значения ферритина были выше 2000 мкг/л.

Аналогичные результаты были получены в исследованиях, посвященных изучению применения стандартных протоколов МРТ печени и ферритина сыворотки крови еще в 1995 году [9], а также более поздних исследовательских работах, в которых МРТ было выполнено уже с использованием T2\*-релаксометрии [10].

### Вывод

Магнитно-резонансная T2\*-релаксометрия является неинвазивным, высоко эффективным методом объективной количественной оценки перегрузки железом у пациентов гематологического профиля, в сравнении с показателем сывороточной концентрации ферритина, не являющимся специфичным. Магнитно-резонансную T2\*-релаксометрию целесообразно включить в протокол обследования пациентов при подозрении на наличие перегрузки железом, особенно при планировании терапии хелаторами железа.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

1. Wood J. Guidelines for quantifying iron overload. *Hematology*. 2014; 210–215.
2. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International Journal of Hematology*. 2008; 88 (1): 7–15.
3. Pullarkat V, Blanchard S, Tegtmeier B. Iron overload adversely affects outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 42: 799–805.
4. Wood J. Estimating tissue iron burden: current status and future prospects. *British Journal of Haematology*. 2015; 170: 15–28.
5. Sucak G, Yegin Z, Ozkurt Z. The role of liver biopsy in the workup of liver dysfunction late after SCT: is the role of iron overload underestimated? *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 42: 461–467.
6. Carpenter J, He T, Kirk P. On T2\* magnetic resonance and cardiac iron. *Circulation*. 2011; 123 (14): 1519–1528.

7. Anderson L, Holden S, Davis B. Cardiovascular T2-star (T2\*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *European Heart Journal*. 2001; 22: 2171–2179.

8. Garbowski M, Carpenter J, Smith G. Biopsy-based calibration of T2\* magnetic resonance for estimation of liver iron concentration and comparison with R2 Ferriscan. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2014; 16: 40–51.

9. Mazza P, Giua R, De Marco S. Iron overload in thalassemia: comparative analysis of magnetic resonance imaging, serum ferritin and iron content of the liver. *Haematologica*. 1995; 80 (5): 398–404.

10. Wood J. Diagnosis and management of transfusion iron overload: The role of imaging. *Am J Hematol*. 2007; 82 (12): 1132–1135.

#### **Информация об авторах:**

Титова Анна Михайловна, аспирант кафедры лучевой диагностики и медицинской визуа-

лизации, врач-рентгенолог отделения компьютерной томографии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Труфанов Геннадий Евгеньевич, д.м.н., профессор, заведующий НИО лучевой диагностики, заведующий кафедрой лучевой диагностики и медицинской визуализации ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Фокин Владимир Александрович, д.м.н., профессор, заведующий отделом лучевой диагностики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

#### **Author information:**

Anna M. Titova, PhD student, radiologist, National Almazov North-West Medical Research Centre ;

Gennadiy E. Trufanov, MD, Dr Sci., Prof., National Almazov North-West Medical Research Centre ;

Vladimir A. Fokin, MD, Dr Sci., Prof., National Almazov North-West Medical Research Centre.

## ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ПУРИНЕРГИЧЕСКОГО СИГНАЛИНГА НА Т-ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Головкин А.С.<sup>1</sup>, Серебрякова М.К.<sup>2</sup>, Жидулева Е.В.<sup>1</sup>,  
Муртазалиева П.М.<sup>1</sup>, Титов В.А.<sup>1</sup>, Иртюга О.Б.<sup>1</sup>,  
Моисеева О.М.<sup>1</sup>, Кробинец И.И.<sup>3</sup>, Кудрявцев И.В.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург

<sup>4</sup> ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ

### Контактная информация:

Головкин Алексей Сергеевич  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России  
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197341.  
E-mail: golovkin\_a@mail.ru

Статья поступила в редакцию 03.11.2017  
и принята к печати 20.11.2017.

### Резюме

**Актуальность.** Компоненты пуринергической системы (подобно цитокинам и хемокинам) принимают участие в регуляции функций различных клеток иммунной системы и развитии эффективного ответа, направленного на элиминацию внеклеточных и внутриклеточных патогенов, собственных измененных клеток и/или погибших клеток. Несмотря на активное исследование пуринергической регуляции в патогенезе многих заболеваний, уровень спонтанной экспрессии таких участников пуринергического сигналинга, как CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов здоровых доноров, мало изучен. **Целью** настоящего исследования было определение уровня экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, а также выявление возможных изменений, связанных с полом и возрастом обследуемых. **Материалы и методы.** В исследование включены 65 условно здоровых доноров в возрасте от 25 лет до 61 года. С использованием многоцветной проточной лазерной цитометрии на субпопуляциях Т-хелперов (Th), цитотоксических (Tcyt) и регуляторных (Tрег) Т-клеток на разных стадиях их дифференцировки, выявленных на основании экспрессии CD45R0 и CD62L — «наивные», фенотип CD45R0–CD62L+, клетки центральной памяти (СМ) — CD45R0+CD62L+, клетки эффекторной памяти (ЕМ) — CD45R0+CD62L–, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA) — CD45R0–CD62L–) оценивали уровни экспрессии CD39 и CD73. **Результаты.** У женщин количество CD73+ ЕМ (p = 0,027) и TEMRA (p = 0,006) цитотоксических Т-клеток было достоверно более высоким. Были выявлены положительные корреляционные связи с возрастом у CD39-позитивных «наивных» Th и Tcyt, а также ЕМ Tcyt; и отрицательные — с CD73+ «наивными» CD3+CD8+ клетками и СМ. Подтвердились предположения об уменьшении количества CD73+ клеток по мере повышения их «зрелости» по направлению «наивные» — СМ — ЕМ — TEMRA у цитотоксических Т-лимфоцитов. **Заключение.** Полученные результаты подтверждают предположение о влиянии пола и возраста на уровень экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов здоровых доноров и открывают перспективы их изучения у пациентов с различными заболеваниями.

**Ключевые слова:** пуринергическая регуляция, CD39, CD73, Т-лимфоциты, здоровые доноры

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (5): 46–60.

## PURINERGIC SIGNALING RECEPTORS EXPRESSION ON PERIPHERAL T-LYMPHOCYTES OF HEALTHY DONORS

Golovkin A. S.<sup>1</sup>, Serebryakova M. K.<sup>2</sup>, Zhiduleva E. V.<sup>1</sup>, Murtazaliev P. M.<sup>1</sup>, Titov V.A.<sup>1</sup>, Irtuga O. B.<sup>1</sup>, Moiseeva O. M.<sup>1</sup>, Krobiniec I. I.<sup>3</sup>, Kudryavtsev I. V.<sup>2,4</sup>

**Corresponding author:**

Alexey Golovkin  
National Almazov Medical Research Centre  
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,  
197341  
E-mail: golovkin\_a@mail.ru

<sup>1</sup> National Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg

<sup>2</sup> Institution of experimental medicine, St. Petersburg

<sup>3</sup> Russian research institute of hematology and transfusiology FMBA  
Russia, St. Petersburg

<sup>4</sup> Pavlov First Saint Petersburg medical university, St. Petersburg

Received 03 November 2017;  
accepted 20 November 2017.

### Abstract

**Background.** The components of the purinergic system participate in the function regulation of various immune system cells as well as in the development of an effective response aimed to extracellular and intracellular pathogens, altered and/or dead cells elimination. Despite the active research of purinergic regulation in the pathogenesis of many diseases, the level of spontaneous expression of such participants of purinergic signaling as CD39 and CD73 on the T-lymphocytes subpopulation of healthy donors has been little studied. **The aim** of the present study was to determine the expression of CD39 and CD73 on the peripheral T-lymphocytes subpopulations of healthy donors, and to identify possible changes related to the sex and age of the subjects. **Materials and methods.** The study included 65 healthy donors 25–61 years old. Multicolor flow cytometry was used to identify T-helpers (Th), T-cytotoxic (Tcyt), T-regulatory (Treg) cells and their subpopulations — Naïve (CD45R0–CD62L+), Central memory (CM) (CD45R0+CD62L+), Effector memory (EM) (CD45R0+CD62L–) and terminally differentiated CD45RA-positive effector cells (TEMRA) (CD45R0–CD62L–). Additionally CD39 and CD73 expression levels were detected. **Results.** The levels of CD73+ EM ( $p = 0,027$ ) and TEMRA ( $p = 0,006$ ) Tcyt in female subjects were significantly higher. Positive correlations with age were found in CD39+ Naïve Th and Tcyt and EM Tcyt. Negative correlations were detected with CD73+ Naïve and CM Tcyt. Assumptions that the number of CD73+ cells decreased in the direction of Naive-CM-EM-TEMRA in cytotoxic T-lymphocytes were confirmed. **Conclusions.** The results confirm the assumption of sex and age influence on the expression of CD39 and CD73 on the T-lymphocytes subpopulations of healthy donors

**Key words:** purinergic regulation, CD39, CD73, T-lymphocytes, healthy donors.

*For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (5): 46–60.*

В настоящее время ведется активное изучение роли пуринергического сигналинга в патогенезе широкого спектра заболеваний и патологических состояний, к числу которых относятся регуляция инфекционного и неинфекционного воспаления, опухолевого роста и метастазирования, реакции отторжения трансплантата, аутоиммунные заболевания, кальцификация элементов сердечно-сосудистой системы и т.д. Компоненты пуринергиче-

ской системы (подобно цитокинам и хемокинам) принимают участие в регуляции функций клеток иммунной системы и развитии эффективного ответа, направленного на элиминацию внеклеточных и внутриклеточных патогенов, собственных измененных клеток и/или погибших клеток [1, 2, 3, 4].

Внеклеточный АТФ как ключевой компонент пуринергической системы обладает широким спектром провоспалительных эффектов и участвует

в «тонкой» настройке иммунного ответа. Более того, АТФ относится к DAMP (от англ. «danger-associated-molecular-pattern») — эндогенным тканевым факторам, которые, в кооперации с другими сигналами, запускают и регулируют иммунный ответ. В частности, АТФ вовлечен в хемотаксис, продукцию активных форм кислорода фагоцитами и синтез цитокинов воспалительными клетками [1].

Аденозин обладает противоположными АТФ эффектами и играет ведущую роль в ограничении воспалительного ответа. Так, этот метаболит подавляет адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам микроциркуляторного русла, снижает уровень продукции активных форм кислорода нейтрофилами и угнетает синтез и секрецию провоспалительных цитокинов клетками различного происхождения [5]. С другой стороны, аденозин способствует выходу противовоспалительного IL10 из моноцитов, а также запускает продукцию VEGF (vascular endothelial growth factor) — мощного индуктора ангиогенеза и сосудистой проницаемости [6].

После выхода АТФ во внеклеточное пространство происходит дефосфорилирование данной молекулы различными сывороточными и мембранными ферментами. Основными нуклеотидазами, участвующими в этом процессе, являются CD39 (E-NTPDase1, от англ. «ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1») и CD73 (Ecto5'NTase, от англ. «ecto-5'-nucleotidase»). Первая метаболизирует АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ. Последний, в свою очередь, расщепляется до аденозина и фосфата с помощью поверхностного рецептора CD73 [7]. Таким образом, активность экзонуклеотидаз CD39 и CD73 обеспечивает баланс провоспалительного АТФ и противовоспалительного аденозина в очаге воспаления. Эти молекулы высоко экспрессируются на клетках многих тканей и органов: сердца, плаценты, легких, печени, кишечника, мозга, почек и др. Более того, данные мембранно-ассоциированные ферменты широко представлены на клетках иммунной системы: моноцитах, нейтрофилах, дендритных клетках, В-лимфоцитах, субпопуляциях Т-лимфоцитов [8].

В настоящее время показано, что пуринергическая регуляция контролирует активность Т-клеток. Предполагается, что пуриновые нуклеотиды и нуклеозиды играют заметную роль в проведении сигнала, необходимого для распознавания антигена Т-клетками при формировании иммунологического синапса [9]. АТФ участвует в реакциях специфического иммунного ответа посредством регуляции дифференцировки и функциональной активности регуляторных Т-клеток (Трег) [10]. Аденозин является антагонистом АТФ и в отношении Т-клеток. Он подавляет активность некоторых популяций

Т-клеток (например, проявление цитолитических свойств или синтез цитокинов), в частности, Т-хелперов 17 (Th17) [1], а также активирует Трег. Кроме того, аденозин подавляет дифференцировку Тхелперов (Th) - Th1 и Th2 за счет снижения уровня пролиферативной активности и продукции IL2 [11].

Экспрессия CD39 и CD73 была показана на регуляторных клетках мыши и человека, а также на других типах Т-клеток [8]. Вместе с тем широкое внедрение многоцветного анализа при изучении циркулирующих Т-клеток методом проточной лазерной цитометрии позволило выявить субпопуляции Т-лимфоцитов, не детектировавшиеся ранее [12, 13]. Это позволило провести как оценку фенотипа, так и определить функциональные характеристики клеток в свете их участия в системе пуринергической регуляции.

Несмотря на активное исследование пуринергической регуляции в патогенезе многих заболеваний, уровень спонтанной экспрессии таких участников пуринергического сигналинга, как CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов здоровых доноров, мало изучен. В настоящее время имеются лишь отдельные наблюдения о возможных возрастных и половых различиях [14]. Хотя именно этот аспект является наиболее важным на этапе изучения клинической значимости нарушений работы иммунной системы у пациентов с различными заболеваниями.

В связи с этим **целью** настоящего исследования было определение уровня экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, а также выявление возможных изменений, связанных с полом и возрастом обследуемых.

### Материал и методы

В исследование включены 65 условно здоровых доноров в возрасте от 25 лет до 61 года (медиана возраста 45 (41;49) лет). Мужчин — 31, женщин — 34 человека. Медиана возраста мужчин составила 43 (40;48) лет, женщин — 46 (41;52). На момент исследования на состояние здоровья жалоб не предъявляли, и все были признаны условно здоровыми. Критериями исключения были острые или обострения хронических заболеваний, аутоиммунные, онкологические, психические заболевания в анамнезе, а также изменения при стандартном клиническом и биохимическом лабораторном обследовании, выходящим за пределы референсных значений.

Все исследования проводились с информированного согласия обследуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных

медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Забор крови из кубитальной вены осуществляли натошак, в состоянии физического и эмоционального покоя вакуумными системами Vacuette с  $K_2EDTA$ . Все исследования проводились в день забора крови. Подготовку образцов для проведения цитофлуориметрического учета проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями [15].

#### *Моноклональные антитела и проточная цитометрия.*

Для выявления основных популяций Т-лимфоцитов и оценки уровня экспрессии ими CD39 и CD73 применялась следующая панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами — CD39-FITC (clone A1, cat. 328206, BioLegend, Inc., USA), CD25-PE (clone B1.49.9, cat. A07774, Beckman Coulter, USA), CD62L-ECD (clone DREG56, cat. IM2713U, Beckman Coulter, USA), CD45R0-PC5.5 (clone UCHL1, cat. IM2712U, Beckman Coulter, USA), CD4-PC7 (clone SFC112T4D11 (T4), cat 737660, Beckman Coulter, USA), CD8-APC (clone B9.11, cat. IM2469, Beckman Coulter, USA), CD3-APC-Alexa Fluor 750 (clone UCHT1, cat. A94680, Beckman Coulter, USA), CD73-Pacific Blue (clone AD2, cat. 344012, BioLegend, Inc., USA) and CD45-Krome Orange (clone J33, cat. A96416, Beckman Coulter, USA). Распределение антител по канал флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [16, 17]. Указанным выше набором моноклональных антител окрашивали 100 мкл периферической крови в соответствии с рекомендациями производителя. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330g в течение 7 минут, после чего надосады удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2-7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм.

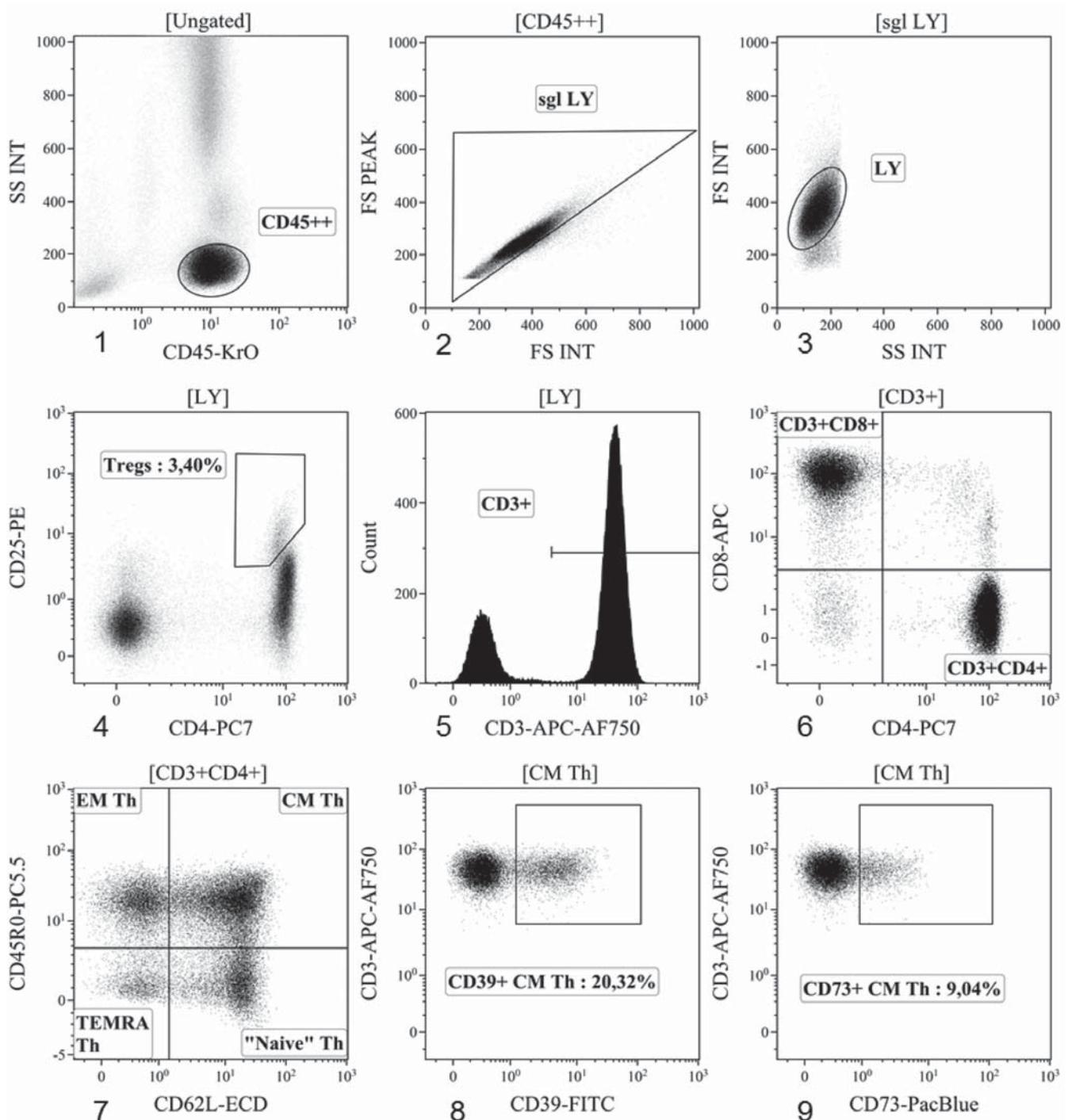
Все полученные результаты сравнивали в выборках для мужчин и для женщин, в разных возрастных группах (до 45 лет и старше 45 лет), а также

в зависимости от возраста с поправкой на пол обследуемых.

Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции и приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (25%; 75%). Дисперсионный анализ проводили с использованием теста ANOVA. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни, а также t-критерия Стьюдента, корреляционный анализ — критерием Спирмена. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Для выявления основных популяций Т-лимфоцитов периферической крови применяли алгоритм (тактику «гейтирования»), приведенный на рисунке 1. Для каждого из образцов анализировали не менее 40000 одиночных лимфоцитов, выделенных с использованием гистограмм 1–3 рисунка 1. Затем при помощи гистограммы 4 на основании яркой экспрессии поверхностного CD25 и наличия на поверхности клеток CD4 выделяли регуляторные Т-клетки (область «Tregs»), фенотип которых можно было описать как CD4+CD25bright. На основании результатов собственных предварительных исследований и данных литературы [18] можно утверждать что в рамках данной популяции Т-хелперов относительное содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих транскрипционный фактор FoxP3, не менее 90-92%, что позволяет применять данный методический подход для выявления популяции Трег. С использованием гистограммы 5 в рамках общей популяции лимфоцитов периферической крови выявляли Т-лимфоциты на основании экспрессии CD3 — линейного маркера Т-клеточной линии дифференцировки клеток. Далее при помощи гистограммы 6 общую популяцию Т-клеток подразделяли на Т-хелперы (Th) с фенотипом CD3+CD4+ и цитотоксические Т-лимфоциты (Tcyt) (CD3+CD8+). В ходе дальнейших исследований проводили анализ субпопуляционного состава Трег, Th и цитотоксических Т-клеток. На каждой из указанных популяций Т-лимфоцитов проводили оценку уровней экспрессии CD45R0 и CD62L, как это было описано ранее [19, 20]. На основании экспрессии CD45R0 и CD62L клетки указанных выше популяций Т-лимфоцитов (показано на примере Т-хелперов с фенотипом

**Рисунок 1. Тактика поэтапного гейтирования, применявшаяся для выявления основных субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови и анализа экспрессии поверхностных CD39 и CD73**



Гистограмма 1: по оси абсцисс — уровень экспрессии CD45; по оси ординат — боковое светорассеяние (SS), характеризующее структуру («сложность» организации) цитоплазмы клеток; в области «CD45++» находятся клетки с высокой экспрессией CD45 и низкими значениями бокового светорассеяния. Гистограмма 2: по оси абсцисс — интегральный сигнал прямого светорассеяния; по оси ординат — пиковый сигнал прямого светорассеяния; в области «sgl LY» находятся не слипшиеся лимфоциты, на гистограмме отображены клетки из области «CD45++» гистограммы 1. Гистограмма 3: по оси абсцисс — боковое светорассеяние (SS); по оси ординат — прямое светорассеяние (FS), характеризующее размер клеток; в области «лимфоциты» находятся клетки соответствующие по своим размерам и структуре популяции лимфоцитов периферической крови. Описание последующих этапов выявления основных популяций Т-лимфоцитов («тактика гейтирования») приведена в разделе «Материалы и методы».

CD3+CD4+) были разделены на «наивные» клетки с фенотипом CD45R0–CD62L+ (Naïve на гистограмме 7 рисунка 1), клетки центральной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L+ (CM), клетки эффекторной памяти, позитивные только по CD45R0 (EM) и «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA), на поверхности которых оба исследованных антигена отсутствовали. Далее каждую из выделенных субпопуляций Т-клеток анализировали при помощи двухпараметрических гистограмм по уровням экспрессии CD3 и CD39 (гистограмма 8 рисунка 1), а также CD3 и CD73 (гистограмма 9 рисунка 1), как это показано на гистограммах 8 и 9 рисунка на примере популяции Т-хелперов центральной памяти.

Гистограмма 1: по оси абсцисс — уровень экспрессии CD45; по оси ординат — боковое светорассеяние (SS), характеризующее структуру («сложность» организации) цитоплазмы клеток; в области «CD45++» находятся клетки с высокой экспрессией CD45 и низкими значениями бокового светорассеяния. Гистограмма 2: по оси абсцисс — интегральный сигнал прямого светорассеяния; по оси ординат — пиковый сигнал прямого светорассеяния; в области «sgl LY» находятся не слипшиеся лимфоциты, на гистограмме отображены клетки из области «CD45++» гистограммы 1. Гистограмма 3: по оси абсцисс — боковое светорассеяние (SS); по оси ординат — прямое светорассеяние (FS), характеризующее размер клеток; в области «лимфоциты» находятся клетки соответствующие по своим размерам и структуре популяции лимфоцитов периферической крови. Описание последующих этапов выявления основных популяций Т-лимфоцитов («тактика гейтирования») приведена в разделе «Материалы и методы».

### Результаты

Подходы к разделению Т-клеток на субпопуляции и возможные тактики гейтирования были описаны и апробированы нами ранее [12, 13, 21]. Анализ уровня экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов (рисунок 2) продемонстрировал неравномерность в зависимости от зрелости клеток.

Обозначения на рисунке: «Naïve» — «наивные» Т-лимфоциты с фенотипом CD45R0–CD62L+; CM — Т-лимфоциты центральной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L+; EM — Т-лимфоциты эффекторной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L–; TEMRA — «терминально-дифференцированные» клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45R0–CD62L–. N, C, E, T — различия с популяцией

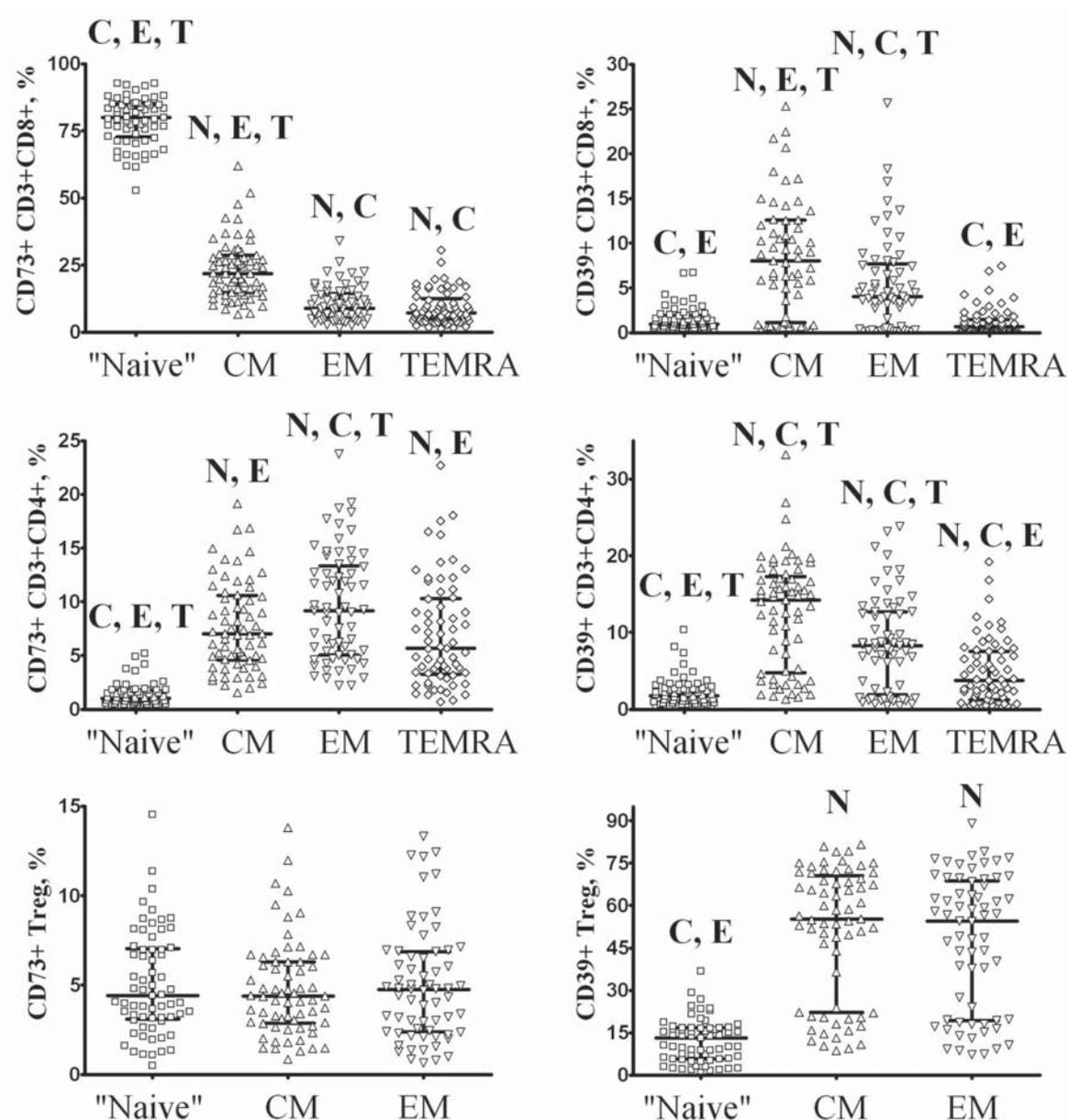
«наивных» клеток, клеток центральной памяти, клеток эффекторной памяти и клетками TEMRA достоверны при  $p < 0,05$  согласно U-критерию Манна-Уитни.

При анализе основных популяций цитотоксических Т-клеток, выявленных при помощи антител против CD45R0 и CD62L, отмечено постепенное снижение относительного содержания CD73-позитивных клеток в линии «наивные» — CM — EM — TEMRA, для которых эти величины составили 79,91 (72,89; 85,03)%, 21,88 (14,78; 28,60)%, 8,91 (5,28; 13,72)% и 7,15 (5,09; 11,84) % соответственно (различия между всеми популяциями были достоверны при  $p < 0,001$ , кроме EM и TEMRA, между которыми различий отмечено не было ( $p = 0,223$ , рисунок 2). При анализе уровня экспрессии CD39 наблюдалась несколько другая динамика между сравниваемыми популяциями Tcut. Данный антиген практически не обнаруживался на CD3+CD8+ клетках с фенотипом CD45R0–CD62L+ — 0,94 (0,36; 1,87)%, но его экспрессия достигала своего максимума на клетках с фенотипом CD45R0+CD62L+, около 8 (1,17; 12,58)% которых несли его на своей поверхности. Полученные для CM значения достоверно ( $p < 0,001$ ) превосходили показатели не только «наивных» Tcut, но и клеток EM ( $p < 0,001$ ), для которых эта величина составляла 4,04 (0,49; 7,53)%, и клеток TEMRA (0,69 (0,21; 1,47)%,  $p < 0,001$ ).

Проведенное нами исследование уровня CD73 на различных популяциях CD3+CD4+ клеток (рисунок 2) показало, что данная молекула лучше всего представлена на поверхности субпопуляций Th, уже прошедших антиген-зависимую стадию дифференцировки — 7,00 (4,63; 10,48)% и 9,18 (5,08; 13,24)% позитивных клеток среди CM и EM, соответственно ( $p = 0,002$ ). «Наивные» клетки данный антиген практически не экспрессировали (всего около 1% позитивных клеток), тогда как среди TEMRA относительное содержание CD73+ клеток находилось в пределах 5%. Что же касается CD39, то на «наивных» клетках данный антиген практически не обнаруживался (около 2% CD39+ клеток), тогда как увеличение экспрессии CD45R0 сопровождалась почти десятикратным увеличением ( $p < 0,001$ ) уровня CD39 в рамках данной популяции клеток. Снижение поверхностного CD62L и переход в стадию Т-хелперов эффекторной памяти приводило к двукратному снижению относительного содержания CD39-позитивных клеток (до 8,29 (2,27; 12,66)%). На зрелых эффекторных CD3+CD4+ лимфоцитах CD39 обнаруживался лишь на 3,75 (1,31; 7,54)% клеток.

Исследование субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов не выявило достоверных различий по экспрессии CD73 между «наивными»

**Рисунок 2. Относительное содержание CD73+ и CD39+ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и регуляторных Т-клеток различного уровня созревания**



Обозначения на рисунке: «Naive» — «наивные» Т-лимфоциты с фенотипом CD45R0–CD62L+; CM — Т-лимфоциты центральной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L+; EM — Т-лимфоциты эффекторной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L–; TEMRA — «терминально-дифференцированные» клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45R0–CD62L–. N, C, E, T — различия с популяцией «наивных» клеток, клеток центральной памяти, клеток эффекторной памяти и клетками TEMRA достоверны при  $p < 0,05$  согласно U-критерию Манна-Уитни.

клетками, клетками центральной и эффекторной памяти (рисунок 2). Тогда как относительное содержание CD39-позитивных клеток в рамках популяций CM и EM (55,22 (22,23; 69,52)% и 54,40 (19,38; 68,42)%, соответственно) достоверно (в обоих случаях  $p < 0,001$ ) превосходило значения, полученные для Treg с фенотипом CD45R0–CD62L+, среди которых лишь 13,19 (5,74; 16,65)% несли данную молекулу на своей поверхности.

При проведении сравнительного анализа относительного содержания CD73-позитивных лим-

фоцитов в рамках популяций цитотоксических Т-клеток, Th и Treg с учетом гендерных различий было выявлено достоверно более высокий уровень CD73+ клеток EM Tcyt ( $p = 0,027$ ) и TEMRA Tcyt ( $p = 0,006$ ) у женщин (таблица 1). В тоже время уровень CD39+ клеток у мужчин и женщин не различался ни по одной из исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов (таблица 2).

У здоровых доноров старшей возрастной категории (старше 45 лет) отмечался достоверно более низкий уровень «наивных» цитотоксических

**Таблица 1. Общий уровень CD73+ клеток на субпопуляциях Т-лимфоцитов в зависимости от пола доноров, % от искомой популяции, Me (25;75)**

| Популяция Т-клеток | Мужчины (n = 31)         | Женщины (n = 34)          | p            |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|
| Naïve Tcyt         | 79,39 (70,31;85,03)      | 80,69 (75,56;85,20)       | 0,478        |
| CM Tcyt            | 19,89 (12,50;27,61)      | 24,86 (16,25;28,63)       | 0,152        |
| <b>EM Tcyt</b>     | <b>6,34 (4,15;12,02)</b> | <b>10,41 (6,87;15,24)</b> | <b>0,027</b> |
| <b>TEMRA Tcyt</b>  | <b>5,67 (3,81;8,79)</b>  | <b>9,19 (6,17;16,32)</b>  | <b>0,006</b> |
| Naïve Th           | 0,74 (0,35;1,83)         | 1,05 (0,68;1,59)          | 0,494        |
| CM Th              | 7,20 (3,97;11,33)        | 6,94 (5,00;10,10)         | 0,823        |
| EM Th              | 8,15 (4,66;13,81)        | 9,38 (5,39;13,24)         | 0,599        |
| TEMRA Th           | 6,21 (3,16;10,23)        | 5,67 (3,42;10,92)         | 0,947        |
| Naïve Tper         | 3,97 (2,12;6,68)         | 4,73 (3,39;7,69)          | 0,131        |
| CM Tper            | 3,60 (2,59;6,08)         | 4,64 (3,26;6,68)          | 0,074        |
| EM Tper            | 4,16 (2,16;6,89)         | 4,98 (2,57;6,86)          | 0,368        |

**Таблица 2. Общий уровень CD39+ клеток на субпопуляциях Т-лимфоцитов в зависимости от пола доноров, % от искомой популяции, Me (25;75)**

| Популяция Т-клеток | Мужчины (n = 31)    | Женщины (n = 34)    | p     |
|--------------------|---------------------|---------------------|-------|
| Naïve Tcyt         | 1,05 (0,36;1,61)    | 0,84 (0,32;2,07)    | 0,984 |
| CM Tcyt            | 8,04 (0,87;13,60)   | 8,10 (1,76;12,52)   | 0,717 |
| EM Tcyt            | 3,93 (0,28;6,72)    | 4,44 (0,67;8,67)    | 0,415 |
| TEMRA Tcyt         | 0,81 (0,17;1,61)    | 0,65 (0,21;1,47)    | 0,669 |
| Naïve Th           | 2,13 (0,70;3,27)    | 1,25 (0,78;2,66)    | 0,214 |
| CM Th              | 12,68 (4,64;16,82)  | 15,13 (5,28;18,40)  | 0,267 |
| EM Th              | 8,29 (1,38;13,19)   | 8,13 (2,64;12,43)   | 0,838 |
| TEMRA Th           | 3,89 (0,83;8,10)    | 3,52 (1,31;6,99)    | 0,947 |
| Naïve Tper         | 13,82 (4,83;16,79)  | 11,58 (5,74;16,18)  | 0,824 |
| CM Tper            | 53,65 (22,02;69,52) | 58,09 (36,34;72,25) | 0,454 |
| EM Tper            | 44,00 (17,86;69,73) | 57,26 (19,58;68,42) | 0,331 |

Т-клеток, несущих на своей поверхности CD73 (младше 45 — 83,81 (78,33;87,13)%; старше 45 — 77,03 (71,13;82,90)%, при  $p = 0,007$ ). При этом такая закономерность была отмечена только у доноров-женщин. У мужчин достоверных отличий в уровне экспрессии CD39 и CD73 на основных популяциях Т-клеток в разных возрастных группах отмечено не было.

В отношении CD39-позитивных клеток закономерностей, связанных с разделением всех обследуемых на две возрастные группы, отмечено не было.

Вместе с тем при проведении корреляционного анализа количества позитивных по CD73 или

CD39 Т-лимфоцитов и возрастом доноров, была зафиксирована достоверная ( $p < 0,05$ ) отрицательная связь ( $r = -0,517$ ) между уровнем «наивных» Тcyt, экспрессирующих CD73 и возрастом доноров-мужчин. У доноров-женщин достоверных ( $p < 0,05$ ) корреляционных взаимосвязей с возрастом было зафиксировано больше. В частности отрицательные связи были отмечены с уровнем Naïve Tcyt CD73+ ( $r = -0,520$ ) и CM Tcyt CD73+ ( $r = -0,397$ ), а положительные с Naïve Tcyt CD39+ ( $r = 0,361$ ), EM Tcyt CD39+ ( $r = 0,367$ ) и Naïve Th CD39+ ( $r = 0,378$ ).

Анализ выявленных взаимосвязей свидетельствует о том, что уровень экспрессии CD73 цитотоксическими Т-лимфоцитами у обследованных представителей обоих полов связан с возрастом пациентов. Кроме того, наблюдаются существенные возрастные изменения суммарной экспрессии CD39 и CD73 у доноров-женщин. Вместе с тем для дальнейших исследований и определения нормативных значений по CD39+ и CD73+ Т-лимфоцитам различных субпопуляций проводился анализ уровня коэкспрессии изучаемых регуляторных молекул без учета половых и возрастных различий (таблица 3).

Уровень экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток выявил постепенное снижение CD73+CD39- клеток в линии «наивные» клетки — CM — EM — TEMRA (таблица 3). В то же время относительное содержание дважды-негативных (CD73-CD39-) в той же линии прогрессивно снижалось.

В отношении Т-хелперов отмечалась обратная тенденция. Так, относительное содержание CD73+CD39- среди «наивных» клеток было наименьшим, в то время как среди EM — наибольшим, сохраняя значительное присутствие и среди зрелых клеток популяции TEMRA. Большая часть субпопуляций CD3+CD4+ клеток была представлена CD73-CD39-. При этом наиболь-

шее количество дважды-негативных было отмечено среди «наивных» (97,12 (95,89; 98,05)%, а наименьшее — среди клеток центральной памяти (79,88 (75,24;84,78)%). Важно отметить, что в периферической крови условно здоровых доноров Т-хелперы, ко-экспресировавшие CD39 и CD73, практически не обнаруживались — их относительное содержание не превышало 0,20%.

Количество CD73-CD39- и CD73-CD39+ среди регуляторных Т-клеток центрально и эффекторной памяти распределялось примерно поровну. Среди «наивных» Трег и TEMRA Трег популяция CD73-CD39- преобладала.

### Обсуждения

Несмотря на то, что многими авторами признается существенное значение пуринаргической системы в регуляции процессов воспаления и функции непосредственно Т-клеток, работ по оценке уровня экспрессии CD39 и CD73 на поверхности субпопуляций циркулирующих Т-лимфоцитов совсем немного [22].

Уровень экспрессии CD39 на Т-лимфоцитах у возрастных пациентов выше, чем у молодых, причем уровень экспрессии является генетически детерминированным [14]. Таким образом, возможные

Таблица 3. Коэкспрессия CD39 и CD73 различными субпопуляциями Т-лимфоцитов.

| №  | Популяции  | Доля клеток (комбинация маркеров), % |                                      |   |                                     |
|----|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------------------|
|    |            | CD73+CD39-                           | CD73+CD39+                           | CD73-CD39-                              | CD73-CD39+                          |
| 1  | Naïve Tcyt | 79,38 (72,66;84,42) <sup>2,3,4</sup> | 0,31 (0,15;0,58) <sup>3,4</sup>      | 19,43 (14,72;26,09) <sup>2,3,4</sup>    | 0,60 (0,12;1,08) <sup>2,3</sup>     |
| 2  | CM Tcyt    | 21,67 (14,21;26,68) <sup>1,3,4</sup> | 0,51 (0,21;0,87) <sup>3,4</sup>      | 68,87 (61,54;76,27) <sup>1,3,4</sup>    | 7,16 (0,86;12,01) <sup>1,3,4</sup>  |
| 3  | EM Tcyt    | 8,75 (5,12;13,41) <sup>1,2</sup>     | 0,13 (0,03;0,35) <sup>1,2,4</sup>    | 85,26 (78,46;91,00) <sup>1,2,4</sup>    | 3,88 (0,45;7,12) <sup>1,2,4</sup>   |
| 4  | TEMRA Tcyt | 6,85 (5,06;11,81) <sup>1,2</sup>     | 0,07 (0,03;0,14) <sup>1,2,3</sup>    | 91,57 (86,54;94,28) <sup>1,2,3</sup>    | 0,62 (0,20;1,36) <sup>2,3</sup>     |
| 5  | Naïve Th   | 0,95 (0,40;1,53) <sup>6,7,8</sup>    | 0,06 (0,04;0,10) <sup>6,7,8</sup>    | 97,12 (95,89;98,05) <sup>6,7,8</sup>    | 1,69 (0,74;2,70) <sup>6,7,8</sup>   |
| 6  | CM Th      | 6,30 (4,44;10,28) <sup>5,7</sup>     | 0,36 (0,20;0,58) <sup>5,8</sup>      | 79,88 (75,24;84,78) <sup>5,8</sup>      | 13,47 (4,32;16,27) <sup>5,7,8</sup> |
| 7  | EM Th      | 8,91 (4,83;13,01) <sup>5,6,8</sup>   | 0,21 (0,10;0,37) <sup>5</sup>        | 83,21 (75,84;86,82) <sup>5,8</sup>      | 7,88 (2,05;12,49) <sup>5,6,8</sup>  |
| 8  | TEMRA Th   | 5,63 (3,10;10,13) <sup>5,7</sup>     | 0,12 (0,01;0,29) <sup>5,6</sup>      | 89,30 (84,67;93,41) <sup>5,6,7</sup>    | 3,70 (1,15;7,21) <sup>5,6,7</sup>   |
| 9  | Naïve Treg | 3,63 (2,50;5,81) <sup>10,11</sup>    | 0,71 (0,25;1,15) <sup>10,11,12</sup> | 83,20 (79,94;88,75) <sup>10,11,12</sup> | 12,37 (5,28;15,77) <sup>10,11</sup> |
| 10 | CM Treg    | 2,21 (1,30;3,93) <sup>9,12</sup>     | 1,81 (0,79;2,78) <sup>9</sup>        | 41,01 (29,40;70,51) <sup>9,12</sup>     | 53,88 (22,01;67,01) <sup>9</sup>    |
| 11 | EM Treg    | 2,50 (1,18;4,11) <sup>9,12</sup>     | 1,08 (0,61;2,88) <sup>9</sup>        | 42,29 (29,35;75,63) <sup>9,12</sup>     | 52,21 (19,07;62,50) <sup>9</sup>    |
| 12 | TEMRA Treg | 6,02 (0,01;9,38) <sup>10,11</sup>    | 0,01 (0,01;3,85) <sup>9</sup>        | 62,50 (43,37;79,20) <sup>9,10,11</sup>  | —                                   |

**Примечания:** <sup>1-12</sup> — различие с популяцией, обозначенной соответствующим номером, статистически значимо ( $p < 0,05$ ). Сравнения проводились только внутри соответствующих популяций клеток: Tcyt, Th, Treg.

возрастные особенности экспрессии целесообразно учитывать при анализе результатов пациентов с различными заболеваниями.

При исследовании субпопуляций Т-лимфоцитов было показано, что уровень экспрессии CD39 и CD73 на поверхности Т-клеток может меняться по мере их созревания и активации. Так, «наивные» цитотоксические Т-клетки экспрессируют экзонуклеотидазу CD73, которая быстро снижается при активации и дифференцировке в эффекторные Т-клетки. И наоборот, экспрессия CD39 увеличивается при активации Т-клеток. Клетки центральной памяти и эффекторной памяти экспрессируют обе нуклеотидазы – CD39 и CD73 — на своей поверхностной мембране [23].

Литературные данные указывают на то, что наличие CD39 на поверхностной мембране характерно в среднем для 6% общей популяции циркулирующих цитотоксических Т-клеток условно здоровых доноров [24]. При этом считается, что экспрессия CD39 может служить одним из признаков зрелых антиген-специфических CD3+CD8+ лимфоцитов, как это было показано для вирус-специфических клеток при ВИЧ-инфекции и хроническом вирусном гепатите С. По-видимому, длительная хроническая активация цитотоксических Т-клеток антигенами, которые не могут быть элиминированы из организма, приводит к накоплению пула CD39+ клеток в периферической крови. Это наблюдение подтверждается обнаруженной высокой корреляционной зависимостью между уровнем антиген-специфических CD39+CD8+CD3+ клеток в циркуляции и вирусной нагрузкой у больных ВИЧ и хроническим вирусным гепатитом С [24]. Более того, сходные результаты были получены в экспериментах с мышами, когда на фоне хронической инфекции, вызванной вирусом лимфоцитарного хориоменингита, в крови экспериментальных животных наблюдалось накопление CD39+CD8+ клеток. Вместе с тем в случае цитотоксических Т-лимфоцитов CD39 может рассматриваться в качестве одного из маркеров регуляторных CD8+ Т-клеток. Так, в условиях *in vitro* CD8+CD39+CD26– клетки периферической крови условно здоровых добровольцев обладали выраженной супрессорной активностью по отношению к активированным Т-хелперам [25]. В рамках другого исследования было показано, что CD39+CD8+ лимфоциты экспрессируют некоторые молекулы (CD25, Foxp3, LAG-3 и CCL4), характерные для «классических» регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4+CD25+FoxP3+ [26]. Данная популяция лимфоцитов была способна снижать эффективность антиген-специфической пролиферации Т-хелперов 1 типа в условиях

*in vitro*, тогда как подавление активности CD39 при помощи блокирующих антител частично отменяла этот эффект «регуляторных» CD3+CD8+ клеток.

Экспрессия экзонуклеотидаз на поверхности Т-клеток может поддерживать аутокринный аденозиновый сигналинг, который необходим для CD8+ Т-клеток памяти. Аденозин, продуцируемый CD73, является медиатором формирования системы, которая блокирует дифференцировку Т-клеток, что способствует более эффективному формированию долгоживущих Т-клеток памяти [23]. С другой стороны, было показано, что «наивные» CD45RA+CD45RO– CD8+ Т-клетки, экспрессирующие CD73, обладают низкой чувствительностью к активации *in vitro* при помощи анти-CD3 антител, но при добавлении в среду для культивирования анти-CD73 антител, уровень пролиферативной активности клеток резко увеличивался [27]. По мнению авторов, CD73 может участвовать в проведении сигнала внутрь клетки при активации, так как его активация при помощи специфических антител сопровождалась увеличением уровня фосфорилирования белков цитоплазмы. Следует отметить, что данные о роли самого CD73, а также формируемого им внеклеточного аденозина, в дифференцировке «наивных» CD8+ Т-клеток весьма фрагментарны, хотя некоторые авторы [23] предполагают, что продукция аденозина приводит к остановке дифференцировки Т-клеток в отсутствие сильной сигнализации через Т-клеточный рецептор, что может являться одним из потенциальных механизмов ограничения аутоагрессии при формировании клона антиген-специфических клеток.

Снижение уровня экспрессии CD73 на цитотоксических Т-лимфоцитах по мере созревания можно рассматривать как один из способов реализации эффекторных функций этих клеток в очаге воспаления. Наличие на поверхностной мембране CD73, способного генерировать во внеклеточном пространстве противовоспалительный аденозин, может ограничиваться функциональную активность CD3+CD8+ клеток по отношению к клеткам-мишеням посредством A2AR рецепторов. Именно поэтому определение нормативных показателей по экспрессии этой молекулы цитотоксическими Т-лимфоцитами является важной задачей, а полученные результаты могут найти применение в клинической лабораторной диагностике. Например, у больных с ANCA-ассоциированным васкулитом (ANtineutrophil Cytoplasmic Antibody) относительное содержание CD73+CD45RA– и CD45RA+ цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови было значительно ниже значений контрольной группы [28]. Более того, уровень CD73-позитивных клеток на

ходился в обратной зависимости с содержанием С-реактивного белка в сыворотке крови больных, а повышение количества этих клеток ассоциировалось с увеличением скорости клубочковой фильтрации и обнаружением микроРНК-31 — регулятора фактора, подавляющего активность HIF 1 $\alpha$  (гипоксия-индуцируемого фактора 1 альфа).

Субпопуляции клеток памяти Т-хелперов также могут нести на себе CD39 [29, 30]. Хотя для CD39+ Т-клеток и характерна АТФ-азная активность, они не обладают иммуносупрессивными свойствами. Вследствие этого было высказано предположение, что экспрессия CD39 клетками памяти может, наоборот, способствовать угнетению текущих воспалительных процессов или/и защищать эти клетки от АТФ-индуцированного апоптоза/некроза в условиях очага воспаления [30].

Принципиальные отличия между CD39+ и CD39– Т-хелперами были отмечены при исследовании функциональной активности этих популяций клеток в условиях *in vitro* [14]. Наличие CD39 на поверхностной мембране связано с более высоким уровнем экспрессии транскрипционного фактора T-bet, выраженной продукцией эффекторных цитокинов (IL4, IL17 и IFN $\gamma$ ) и сниженным синтезом IL2, что позволило рассматривать эти клетки в качестве зрелой эффекторной популяции Т-хелперов. Вместе с тем CD39-негативные Т-клетки эффективно секретируют IL2 и IL21, а при сокультивировании с аутологичными «наивными» В-лимфоцитами запускали дифференцировку В-клеток в сторону плазматических клеток. Кроме того, CD39+ Т-хелперы были более восприимчивы к проапоптотическим сигналам *in vitro* по сравнению с CD39– клетками. Перенос генетических конструкций, содержащих CD39, в цитоплазму CD39-негативных Т-клеток сопровождался увеличением уровня погибших клеток в образцах. Еще одной особенностью CD39+ Т-хелперов была более высокая экспрессия рецептора для аденозина A2AR, взаимодействие которого со своими лигандами в очаге воспаления сопровождается запуском апоптоза в эффекторных клетках, что способствует ограничению воспалительной реакции в тканях.

Как уже отмечалось выше, CD39+ Т-хелперы являются зрелыми или «поляризованными» эффекторами, способными к продукции широкого спектра цитокинов, специфичных для Th1, Th2 и Th17, но не фолликулярных Т-хелперов. Вместе с тем наличие на поверхности CD3+CD4+ клетки CD39 и CD161 одновременно позволяет выявить субпопуляцию Th17 [31]. Более того, CD39+CD161+ клетки периферической крови экспрессировали высокий уровень мРНК ключевых хемокиновых

рецепторов (CCR5, CCR6 и CXCR3) и рецепторов для цитокинов (TGFR1, IL23R и IL6R), характерных для Th17. В ответ на стимуляцию *in vitro* в клетках данной популяции увеличивался уровень экспрессии генов, кодирующих IL17, IL22 и транскрипционного фактора ROR $\gamma$ . В периферической крови и биоптатах слизистых оболочек больных с болезнью Крона уровень этих клеток был существенно выше такового условно здоровых доноров. Причем оценка относительного содержания клеток данной субпопуляции Т-хелперов в крови больных позволяла отличить активную форму болезни Крона от неактивной, что позволяет использовать оценку уровня CD39+CD161+CD4+ клеток в диагностических целях [32].

Уровень экспрессии поверхностного CD73 Т-хелперами периферической крови находится на весьма низком уровне при сравнении с цитотоксическими Т-лимфоцитами. Это соотносится с литературными данными, указывающими на то, что большая часть молекул CD73 обычно локализуется во внутриклеточном компартменте Т-хелперов (до 20% клеток), тогда как лишь 1–7% Т-хелперов несут ее на своей поверхности [33]. Вместе с тем, нами было отмечено увеличение относительного содержания CD73+ клеток в рамках субпопуляций CD3+CD4+ лимфоцитов, прошедших антиген-зависимую дифференцировку. Причем, относительно высокий уровень данного антигена сохранялся на клетках эффекторной памяти, способных покидать кровотоки и мигрировать в периферические ткани. Возможно, в случае Т-хелперов, подобно CD3+CD8+ лимфоцитам, CD73 и аденозин играют роль в ограничении функциональной активности потенциально аутореактивных клонов клеток. Эти механизмы могут быть реализованы как в рамках лимфоидной ткани, так и на периферии, когда мишенью для аденозина являются зрелые эффекторные лимфоциты. Например, Th17 могут нести CD39 и CD73 и угнетать иммунный ответ за счет продукции аденозина [34]. Одновременная экспрессия CD39 и CD73 на этих клетках регулируется факторами, которые индуцируют дифференцировку Th17, а именно провоспалительным IL6 и противовоспалительным TGF- $\beta$ .

Что же касается Трег как отдельной высоко специализированной популяции Т-хелперов, то уровень экспрессии CD39 на поверхностной мембране пропорционален уровню FOXP3 в их ядре [35]. Более того, существовали предложения об использовании CD39 в качестве дополнительного маркера всех Трег [7]. Катаболическая активность пары CD39/CD73 тесно связана с уровнем активации этих клеток. В экспериментах на лабораторных живот-

ных отмечалось, что повышенная активность CD39 на Трег наблюдается только после активации посредством Т-клеточного рецептора (35). Считается, что повышенный метаболизм АТФ является критическим для иммуносупрессивной активности регуляторных Т-клеток [36, 37]. Кроме того, высказано предположение, что усиленная активность CD39 облегчает выход этих клеток в очаги воспаления, где они снижают уровень внеклеточного АТФ, тем самым снижая опосредованную P2-рецепторами гибель Трег [35]. На CD39-дефицитных мышцах показано, что CD39 совместно с CD73 осуществляет внеклеточную продукцию аденозина, который опосредует значительную часть иммуносупрессивной и противовоспалительно активности Трег [8].

Уровень экспрессии CD39 регуляторными Т-лимфоцитами среди группы условно здоровых доноров может находиться в пределах от 10% до 60% клеток [35]. Однако при сравнении данной группы и больных рассеянным склерозом было отмечено, что у пациентов уровень CD39+ регуляторных Т-клеток в периферической крови снижен почти в два раза [33]. Сходные результаты были получены другой группой авторов, показавших, что в периферической крови больных с рецидивирующе-ремиттирующей формой заболевания уровень CD39+ Трег снижен по сравнению не только с группой контроля, но и с группой больных с вторично прогрессирующим рассеянным склерозом [38]. Увеличение уровня CD39+ регуляторных Т-клеток в циркуляции отмечалось при исследовании патогенеза хронического вирусного гепатита В [39]. Повышенное относительное содержание клеток данной популяции было повышено у больных с асимптомным носительством вируса при сравнении не только с условно здоровыми донорами, но и больными с активной формой хронического гепатита В, а также с пациентами, у которых наблюдалась острая или хроническая печеночная недостаточность, связанная с вирусом. Более того, увеличение CD39+ Трег в крови коррелировало с увеличением вирусной нагрузки, но обладала обратной зависимостью с уровнем аланинаминотрансферазы в сыворотке крови. Существенный прирост CD39-позитивных Трег в циркуляции отмечается и при онкологических заболеваниях [37]. Причем, как это было показано для больных с колоректальным раком, обнаруживается прямая зависимость между экспрессией CD39 на CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> Трег и уровнем мРНК рецептора для аденозина A2AR лейкоцитами периферической крови больных.

В нашем исследовании показано, что экспрессия CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов здоро-

вых доноров может иметь гендерные особенности. У женщин количество CD73+ позитивных EM и TEMRA цитотоксических Т-клеток было достоверно более высоким. Наряду с этим, мы подтвердили, что уровень экспрессии экзонуклеотидаз может быть связан с возрастом пациентов, что особенно хорошо заметно у женщин. Были выявлены положительные корреляционные связи с возрастом у «наивных» Tcyt CD39+, EM Tcyt CD39+, CD39+ «наивных» Th и отрицательные — с CD73+ «наивными» и CM Tcyt.

Подтвердились предположения об уменьшения количества CD73+ клеток по мере повышения их «зрелости» по направлению «наивные» — CM — EM — TEMRA среди цитотоксических Т-лимфоцитов. Относительно CD39+ клеток такой однозначной закономерности не прослеживалось. Однако, наблюдалась тенденция к увеличению относительного содержания CD39+ лимфоцитов в рамках клеток центральной памяти, «патрулирующих» Т-зависимые зоны лимфатических узлов и Пейеровых бляшек и способных осуществлять регуляторные функции в рамках лимфоидной системы. Клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L- способны к миграции в периферические ткани, и в состав данной популяции могут входить как регуляторные, так и антиген-специфические клетки. Тогда как при переходе в эффекторную фазу созревания CD3+CD8+ уровень CD39 снижается до минимальных значений, что, видимо, связано с необходимостью выполнять реакции контактного цитолиза в очаге проникновения патогена и активации под действием местных провоспалительных факторов.

Все субпопуляции Т-хелперов были представлены преимущественно дубль-негативными клетками. Вместе с тем позитивные по CD39 клетки относились преимущественно к клеткам центральной и эффекторной памяти. Скорее всего, низкий уровень экспрессии экзонуклеотидаз на Т-хелперах можно объяснить отсутствием активных воспалительных процессов у здоровых доноров.

### Заключение.

Пуриnergическая регуляция функционирования Т-клеток играет важную роль в иммунном ответе. Результаты исследований последних лет указывают на высокую значимость определения уровней CD39 и CD73 на различных популяциях циркулирующих Т-лимфоцитов в диагностике, мониторинге эффективности терапии и прогнозе многих заболеваний. Вместе с тем, для использования данных подходов в клинической лабораторной диагностике целесообразно определить нормативные

величины с учетом влияния половых и возрастных особенностей пациентов на изучаемые параметры. В нашем исследовании показано, что у женщин количество CD73+ позитивных EM и TEMRA цитотоксических Т-клеток было более высоким. Установлена связь между уровнем экспрессии экзонуклеотидаз и возрастом обследованных пациентов. Выявлены положительные корреляционные связи с возрастом у CD39-позитивных «наивных» Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, а также EM Tсут; тогда как отрицательные — с CD73+ «наивными» CD3+CD8+ клетками и клетками центральной памяти. Подтвердились предположения об уменьшения количества CD73+ клеток по мере повышения их «зрелости» по направлению «наивные» — CM — EM — TEMRA у цитотоксических Т-лимфоцитов.

#### Финансирование/Funding

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60199).

#### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

#### Список литературы / References

1. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Molecular Aspects of Medicine*. 2017; Vol. 55: 9–19.
2. Zhao H, Bo C, Kang Y, Li H. What else can CD39 tell us? *Front Immunol*. 2017; 8: 1–10.
3. Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*. 2009;147(S1):S172–81.
4. Serebryanay N.B. Nucleotides as regulators of the immune response. *Immunology*. 2010; 31 (5): 73–280. In Russian [Серебряная Н.Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа. *Иммунология*. 2010; 31 (5): 273–280].
5. Barletta KE, Ley K, Mehrad B. Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 856–864
6. Koscsó B, Csóka B, Selmečzy Z, et al. Adenosine Augments IL-10 Production by Microglial Cells through an A2B Adenosine Receptor-Mediated Process. *J Immunol*. 2012; 188 (1): 445–453.
7. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013; 19 (6): 355–367.
8. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204 (6): 1257–1265.
9. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (3): 201–212.
10. Trabanelli S, Očadlíková D, Gulinelli S, et al. Extracellular ATP Exerts Opposite Effects on Activated and Regulatory CD4+ T Cells via Purinergic P2 Receptor Activation. *J Immunol*. 2012; 189 (3): 1303–1310.
11. Csóka B, Himer L, Selmečzy Z, et al. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J*. 2008; 22 (10): 3491–3499.
12. Kudryavtsev IV. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Russian immunology journal*. 2014;8 (4(17)):947–964. In Russian [Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. *Российский иммунологический журнал*. 2014;8(4 (17)):947–964].
13. Kudryavtsev IV, Borisov AG, Krobinets II, et al. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T-cells subsets. *Medical immunology (Russia) = Meditsinskaya Immunologiya*. 2015; 17 (6): 525–538. In Russian [Кудрявцев, И.В., Борисов, А.Г., Кробинец, И.И., с соавт. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (6): 525–538].
14. Fang F, Yu M, Cavanagh MM, et al. Expression of CD39 on Activated T Cells Impairs their Survival in Older Individuals. *Cell Rep*. 2016; 14 (5): 1218–1231.
15. Khaidukov SV, Baidun LA, Zurochka AV, Totolyan Areg A. Standardized technology “study of peripheral lymphocytes subpopulations using flow cytometers-analyzers” (project). *Medical immunology (Russia) = Meditsinskaya Immunologiya*. 2012; 14 (3): 255–268. In Russian [Хайдуков С.В., Байдун, Л.А., Зурочка, А.В., Тотолян, Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект). *Медицинская иммунология*. 2012; 14 (3): 255–268].
16. Kudryavtsev IV, Subbotovskaya AI. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Medical immunology (Russia) = Meditsinskaya Immunologiya*. 2015; 17 (1): 19–26. In Russian [Кудрявцев, И.В., Субботовская АИ. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа. *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (1): 19–26].

17. Mahnke Y., Roederer M. Optimizing a Multicolor Immunophenotyping Assay. *Clin Lab Med.* 2007; 27 (3): 469–485.
18. Garcia Santana CA, Tung JW, Gulnik S. Human treg cells are characterized by low/negative CD6 expression. *Cytom Part A.* 2014; 85 (10): 901–908.
19. Kudryavtsev IV, Savitsky VP. Multicolor analysis of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T cells by flow cytometry. *Russian journal of immunology.* 2012; 6 (3 (1) (14): 94–97. In Russian [Кудрявцев, И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии. *Российский иммунологический журнал.* 2012;6(3(1)(14):94–97].
20. Kudryavtsev IV, Elezov DC. Analysis of the main peripheral cytotoxic T-lymphocytes subpopulations based on the expression of CD27, CD28, CD45R0 and CD62L. *Russian journal of immunology.* 2013; 7 (16) (2–3 (1)): 57–61. In Russian [Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. Анализ основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45R0 и CD62L. *Российский иммунологический журнал.* 2013; 7 (16) (2–3 (1)): 57–61].
21. Barbarash L, Kudryavtsev I, Rutkovskaya N, Golovkin A. T Cell Response in Patients with Implanted Biological and Mechanical Prosthetic Heart Valves. *Mediat inflammation.* 2016; 2016 (Article ID 1937564): 12 pages.
22. Sokhnevich NA, Khaziakhmatova OG, Yurova KA, et al. Phenotypic characterization and functional features of memory T- And B-cells. *Cell and tissue biology.* 2015; 57 (5): 311–318. In Russian [Сохневич, Н.А.; Хазиахматова, О.Г.; Юрова, К.А.; Шуплетова, В.В.; Литвинова ЛС. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти. *Цитология.* 2015; 57 (5): 311–318].
23. Bono MR, Fernandez D, Flores-Santibez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* 2015; 589 (22): 3454–3460.
24. Gupta PK, Godec J, Wolski D, et al. CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog.* 2015; 11 (10): 1–21.
25. Wen Z, Shimojima Y, Shirai T, et al. NADPH oxidase deficiency underlies dysfunction of aged CD8+ Tregs. *J Clin Invest.* 2016; 126 (5): 1953–1967.
26. Boer MC, van Meijgaarden KE, Bastid J, et al. CD39 is involved in mediating suppression by *Mycobacterium bovis* BCG-activated human CD8<sup>+</sup> CD39<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2013; 43 (7): 1925–1932.
27. Dinzani U, Redoglia V, Bragardo M, et al. Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlow (naive) CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1993; 151 (8): 3961–3970.
28. Kling L, Benck U, Breedijk A, et al. Changes in CD73, CD39 and CD26 expression on T-lymphocytes of ANCA-associated vasculitis patients suggest impairment in adenosine generation and turn-over. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 11683.
29. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhieh Y, et al. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J Immunol.* 2010; 185 (1): 134–143.
30. Zhou Q, Yan J, Wu Y, Sun X. Isolated CD39 Expression on CD4 + T Cells Denotes. *Am J Transplant.* 2009; 6 (2): 2303–2311.
31. Bai A, Moss A, Kokkotou E, et al. CD39 and CD161 Modulate Th17 Responses in Crohn's Disease. *J Immunol.* 2014; 193 (7): 3366–3377.
32. Bai A, Robson S. Beyond ecto-nucleotidase: CD39 defines human Th17 cells with CD161. *Purinergic Signal.* 2015;11 (3): 317–319.
33. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem.* 2010; 285 (10): 7176–7186.
34. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, et al. Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity.* 2012; 36 (3): 362–373.
35. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007;110(4):1225–1232.
36. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol;* 185 (4): 1993–1998.
37. Zhulai GA, Oleinik EK, Churov A V., et al. Significance of Treg cells for adenosine-mediated immune suppression in colorectal cancer. 2017; 19 (1): 89–94.
38. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009; 183 (11): 7602–7610.
39. Tang Y, Jiang L, Zheng Y, Ni B, Wu Y. Expression of CD39 on FoxP3+ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol.* 2012; 13 (1): 17.

**Информация об авторах:**

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Серебрякова Мария Константиновна, младший научный сотрудник отдела иммунологии Института экспериментальной медицины;

Жидулева Екатерина Викторовна, аспирант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Муртазалиева Патимат Муртазалиевна, аспирант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Титов Владислав Андреевич, аспирант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Иртюга Ольга Борисовна, к.м.н., научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Моисеева Ольга Михайловна, д.м.н., профессор, заведующая отделом некоронарогенных заболеваний сердца ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Кробинец Ирина Ивановна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изосерологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России»;

Кудрявцев Игорь Владимирович, к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии Института экспериментальной медицины; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»;

**Author information:**

Alexey S. Golovkin, MD, PhD, Principle investigator, institute of molecular biology and genetics, National Almazov medical research Centre;

Maria K. Serebryakova, Research Associate, immunology department, Institution of experimental medicine;

Ekaterina V. Zhiduleva, MD, PhD student, National Almazov medical research Centre;

Patimat M. Murtazaliev, MD, PhD student, National Almazov medical research Centre;

Vladislav A. Titov, MD, PhD student, National Almazov medical research Centre;

Olga B. Irtuga, MD, PhD, Senior Research Associate, National Almazov medical research Centre;

Olga M. Moiseeva, MD, PhD, professor, Head of the Research Department of Noncoronary Heart Disease, National Almazov medical research Centre;

Irina I. Krobinets, PhD, Senior Research Associate, Russian research institute of hematology and transfusiology FMBA Russia;

Igor V. Kudryavtsev, PhD, Senior Research Associate, immunology department, Institution of experimental medicine; assistant professor, department of immunology, Pavlov First Saint Petersburg medical university.

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ Z-ДИСКА, ПРИ ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА, ВЫЗВАННОЙ РЕНОВАСКУЛЯРНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В МОДЕЛИ «2 KIDNEY, 1 CLIP»

Князева А.А.<sup>1,2</sup>, Смолина Н.А.<sup>2</sup>, Кашерининов И.Ю.<sup>2</sup>,  
Вербило С.Л.<sup>2</sup>, Костарева А.А.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург, Россия

### Контактная информация:

Костарева Анна Александровна  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России  
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341  
e-mail: akostareva@hotmail.com

Статья поступила в редакцию 27.10.2017  
и принята к печати 20.11.2017.

### Резюме

**Актуальность.** Гипертрофия миокарда ассоциирована с риском развития различных сердечно-сосудистых заболеваний. Причинами возникновения патологической гипертрофии могут служить гемодинамические и нейрогуморальные факторы. На клеточном уровне в развитии гипертрофии важную роль играет элемент кардиомиоцита — Z-диск, белки которого участвуют в поддержании строения саркомера и различных сигнальных взаимодействиях. Вовлечение компонентов Z-диска в процесс развития гипертрофии остается недостаточно изученным. **Цель исследования.** Проанализировать экспрессию генов, кодирующих белки Z-диска, при гипертрофии миокарда, вызванной преимущественно нейрогуморальными факторами в модели реноваскулярной гипертензии «2 kidney, 1 clip». **Материалы и методы.** Модель «2 kidney, 1 clip» была реализована на крысах самцах линии Wistar. Животные были разделены на группы в соответствии со временем действия модели. Определение уровня экспрессии генов, кодирующих белки Z-диска, в миокарде крыс проводили при помощи ПЦР в реальном времени. **Результаты.** Показано изменение экспрессии генов *myh5*, *actn2*, *nbn1*: возрастание на ранних сроках (1, 2 недели) с последующим снижением до контрольного уровня в левом желудочке и постепенное возрастание к поздним срокам (8, 10 недель) в правом желудочке. Экспрессия гена *des* повышается на сроках 1 и 2 недели в левом и правом желудочках. **Выводы.** Время действия модели влияет на профили экспрессии генов, кодирующих структурные и сигнальные белки Z-диска при нейрогуморальном воздействии, и подтверждающих роль белков Z-диска в развитии гипертрофии левого и правого желудочков.

**Ключевые слова:** белки Z-диска, гипертрофия миокарда, реноваскулярная гипертензия

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (5): 61–68.

## EXPRESSION OF GENES ENCODING Z-DISC PROTEINS IN CARDIAC HYPERTROPHY CAUSED BY RENOVASCULAR HYPERTENSION IN «2 KIDNEY, 1 CLIP» MODEL

Knyazeva A.A.<sup>1,2</sup>, Smolina N.A.<sup>2</sup>, Kasherininov I.Y.<sup>2</sup>,  
Verbilo S.L.<sup>2</sup>, Kostareva A.A.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University,  
Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Saint Petersburg National Research University of Information  
Technologies, Mechanics and Optics, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Anna A. Kostareva  
Almazov National Medical Research Centre  
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg,  
Russia, 197341  
E-mail: akostareva@hotmail.com

Received 27 October 2017;  
accepted 20 November 2017.

### Abstract

**Background.** Cardiac hypertrophy is a violation of myocardium structure, that increases risk for development of various cardiovascular diseases. Pathological hypertrophy can be triggered by hemodynamic and neurohumoral factors. At cellular level structural element of cardiomyocytes Z-disk, containing a great number of proteins, plays a crucial role in hypertrophy progression. Involvement of Z-disk components in cardiac hypertrophy development is not thoroughly investigated. **Objective.** The goal of the work was to investigate expression of genes encoding Z-disk proteins in cardiac hypertrophy caused by renovascular hypertension. **Design and methods.** «2 kidney, 1 clip» model was performed on male Wistar rats. Animals were divided into groups regarding to model duration. Gene expression in right and left ventricles was analyzed by real-time PCR. **Results.** We demonstrated altered expression of *cmya5*, *actn2*, *nebl*: increase at the early stage (1, 2 weeks), followed by decrease to basal level in left ventricle and gradual increase to the later stage (8, 10 weeks) in right ventricle. *Des* was upregulated at the early stage in both ventricles. **Conclusion.** Stage of hypertrophy progression could affect expression of genes, encoding Z-disk proteins. Thus, confirming involvement of Z-disk proteins in cardiac hypertrophy development caused by neurohumoral factors in left and right ventricles.

**Key words:** Z-disk proteins, cardiac hypertrophy, renovascular hypertension

For citation: *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*. 2017; 4 (5): 61–68

### Список сокращений

ГЛЖ — гипертрофия левого желудочка  
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
кДНК — комплементарная ДНК  
мРНК — матричная РНК  
ПЦР — полимеразная цепная реакция  
ПЦР-рв — ПЦР в реальном времени  
РАС — ренин-ангиотензиновая система  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
СНС — симпатическая нервная система

### Введение

Гипертрофия миокарда — это процесс изменения геометрии камер сердца, при котором увеличивается объем миокарда, как правило, за счет

утолщения стенок левого или правого желудочков. Развитие гипертрофии происходит преимущественно вследствие увеличения размеров, а не количества отдельных кардиомиоцитов, что связано с их терминально дифференцированным состоянием и низким потенциалом к делению.

На ранних этапах гипертрофия миокарда развивается как адаптивный ответ организма на внешние физиологические нагрузки, и, будучи направленным на поддержание работоспособности сердца, является обратимым процессом. При патологической (необратимой) гипертрофии, связанной с хроническими изменениями гемодинамических параметров, например, артериальной гипертензией или стенозом аортального клапана, значительно

повышается риск развития фиброза, ишемии и, как следствие, сердечной недостаточности.

Факторы, влияющие на развитие гипертрофии, можно разделить по типу воздействия. Выделяют гемодинамические факторы, включающие перегрузку объемом или давлением, и негемодинамические, к которым относят нейрогуморальные факторы [1]. Примером нейрогуморального механизма является установление гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ) вследствие вторичной гипертензии, вызванной стенозом почечной артерии. В этом случае основную роль играет долгосрочная активация ренин-ангиотензиновой системы (РАС) [2]. Кроме того, на экспериментальных моделях показано повышение активности симпатической нервной системы при реноваскулярной гипертензии [3].

Детальные клеточные механизмы развития гипертрофии миокарда остаются не до конца описанными. В настоящее время значительное внимание уделяется процессу механотрансдукции — трансформации механического воздействия в последующую активацию эффекторных молекул и сигнальных каскадов в клетках. В процессе механотрансдукции в кардиомиоцитах ключевую роль играет область Z-диска миофибрилл [4]. Было показано, что Z-диск изменяет свою структуру и форму в зависимости от того, в каком состоянии находятся мышечные клетки, покоя или сокращения [5]. Обсуждается роль Z-диска как «рецептора растяжения» в кардиомиоцитах, так как некоторые белки Z-диска являются биохимическими сенсорами и вовлечены в реакцию на напряжение в саркомере [6]. Так, в области Z-диска расположен небольшой участок одного из основных белков мышечных клеток тайтина (titin). Взаимодействие тайтина с некоторыми Z-ассоциированными белками обеспечивает правильную сборку миофибрилл и определяет сигнальные пути при механотрансдукции [7]. Таким образом, Z-диск является не только структурной границей саркомера, но и играет важную роль во внутриклеточном сигналинге, соединяя элементы клеточной мембраны, цитоскелета и ядра [8]. Наиболее изученными белками, входящими в состав Z-диска, являются  $\alpha$ -актинин-2 ( $\alpha$ -actinin-2), десмин (desmin), белки, содержащие LIM-домены, кальсарцин-1 (calsarcin-1), небулетт (nebullette), миоподин (myopodin), миосприн (myosprin), однако их участие в процессе развития гипертрофии миокарда исследовано недостаточно. Целью данной работы стало изучение влияния гипертрофии миокарда, вызванной преимущественно нейрогуморальными факторами, на экспрессию ряда генов, кодирующих белки Z-диска.

## Материалы и методы

**Животные модели.** На базе вивария Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» были проведены операции по экспериментальному моделированию реноваскулярной гипертензии «2 kidney, 1 clip». Крысам-самцам линии Wistar в возрасте 8 недель было выполнено клипирование левой почечной артерии. Все крысы были разделены на группы в зависимости от времени, прошедшего после операции до выведения из эксперимента и забора материала. Каждая группа соответствовала одной временной точке — 1 неделя (n = 12), 2 недели (n = 10), 3 недели (n = 11), 5 недель (n = 11), 8 недель (n = 8) или 10 недель (n = 12) после операции, где n соответствует числу животных в группе. Также существовала контрольная группа интактных животных (n = 14), которым операцию не проводили.

При выведении из эксперимента животным под газовой анестезией изофлураном («Foran», Abbott Laboratories, Великобритания) в концентрации 2,2% проводили вскрытие грудной клетки и изъятие сердца. Сердце помещали в раствор PBS, тщательно отделяли сосуды и предсердия и измеряли массу оставшегося миокарда. Далее выделяли миокард левого и правого желудочков. Образцы замораживали в жидком азоте, затем перемещали на хранение в морозильную камеру (T = -80°C) до момента выделения РНК.

**Выделение РНК из ткани и ПЦР в реальном времени.** Для выделения РНК из ткани небольшую часть замороженного миокарда левого и правого желудочков отдельно гомогенизировали в присутствии реагента Extract RNA (Evrogen, Россия) в гомогенизаторе TissueLyzer (QIAGEN, США) в соответствии с протоколом производителя реагента для выделения. Качественную и количественную оценку выделенных образцов производили при помощи спектрофотометра Nanodrop 3300 (Thermo Scientific, США), также проводили электрофоретический анализ образцов в 1% агарозном геле для контроля целостности выделенной РНК.

ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. На матрице мРНК, предварительно обработанной ДНКазой, была получена кДНК методом обратной транскрипции в соответствии с рекомендациями набора MMLV RT Kit (Evrogen, Россия). Для определения экспрессии гена ppra при помощи ПЦР в реальном времени (ПЦР-рв) с системой SYBR были подобраны олигонуклеотидные праймеры (прямой : 5' CCCTCCGATAGATCTGCCCT 3', обратный : 5' CTCTGGTCCACAACGAAATTGG 3'). Для всех остальных генов интереса были

использованы коммерческие системы для ПЦР-рв с гидролизной пробой (TaqMan Gene Expression Assay, AppliedBiosystems, США). Расчет относительного количества мРНК производили методом «ΔΔCt» нормировкой на референсный ген actb [9]. В качестве контроля выступала группа интактных животных.

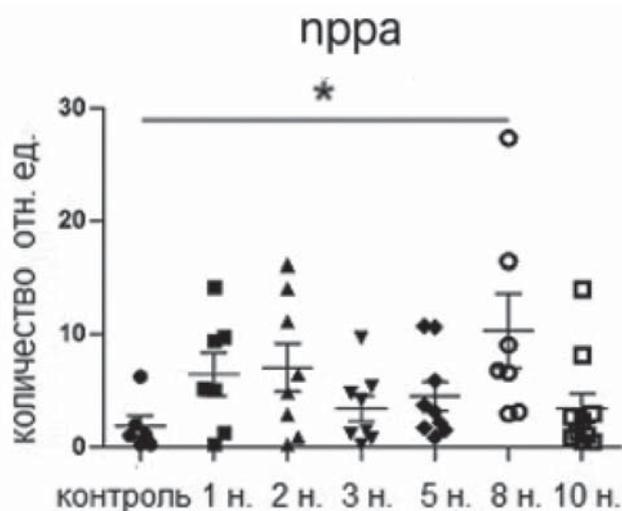
Используемые коммерческие системы праймеров для генов:

1. actn2;
2. des;
3. csrp3;
4. ldb3;
5. fh11;
6. fh12;
7. nebl;
8. smya5;
9. actb.

Реакцию проводили на амплификаторе 7500 Real-TimePCRSYSTEM (LifeTechnologies, США).

**Статистический анализ данных.** Обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения 7500 Real TimePCR SystemsSoftware, предоставленного производителем в комплекте с прибором. Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism (США). Для множественных сравнений с контрольной группой использовали параметрический статистический тест ANOVA. Различия признавались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде точечных диаграмм размаха со средним значением и стандартной ошибкой среднего. Кластеризация генов и временных групп

**Рисунок 1. Увеличение уровня мРНК гена prra в миокарде левого желудочка в модели реноваскулярной гипертензии**



\*  $p < 0,05$  относительно контрольной группы

была выполнена при помощи программы Cluster 3.0, последующая визуализация данных представлена в программе Java TreeView.

### Результаты

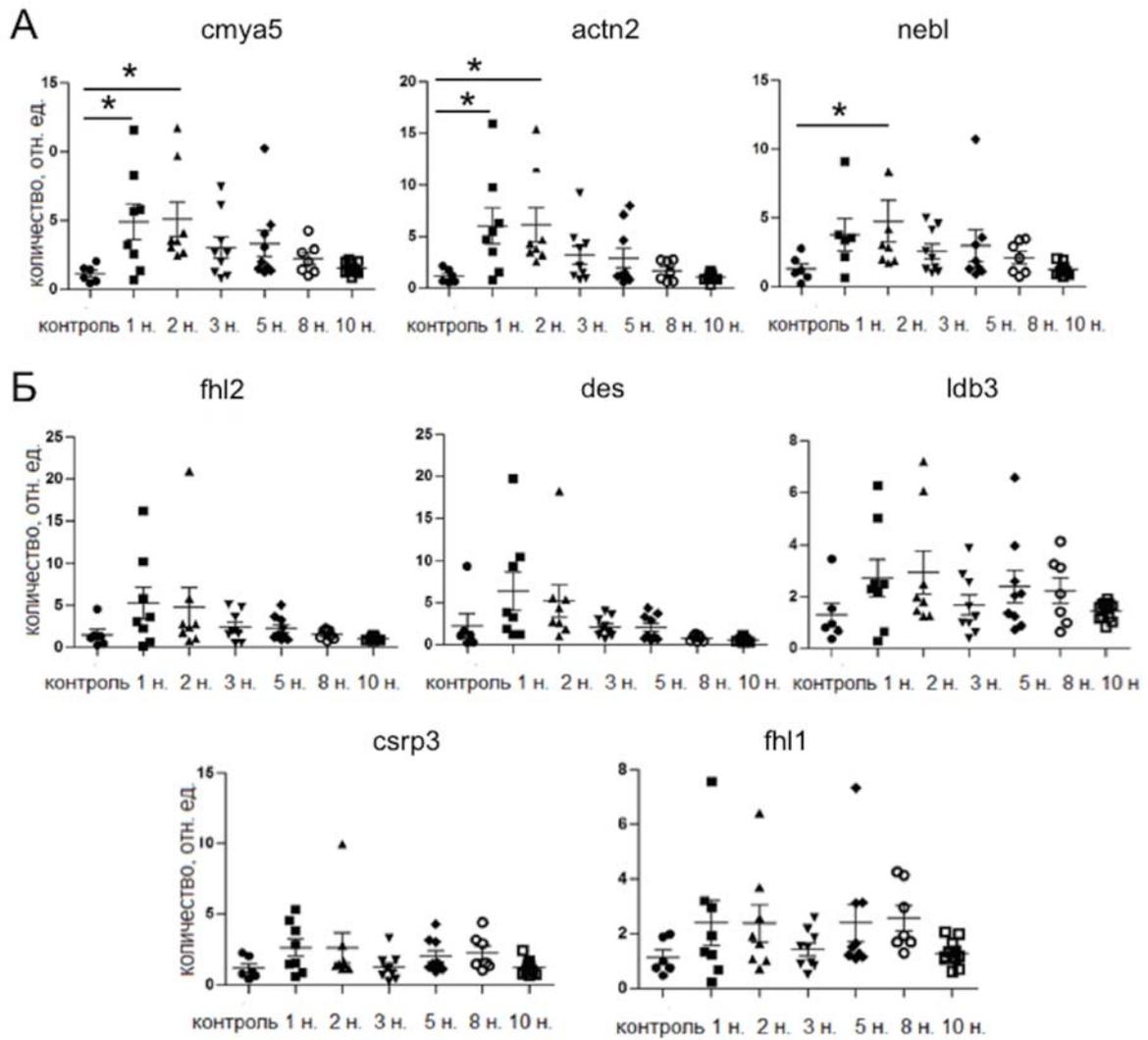
Экспрессия гена prra в качестве молекулярного маркера была измерена для оценки развития гипертрофии в модели «2 kidney, 1 clip». Для этого проводили ПЦР-рв с системой SYBR и образцами кДНК, выделенных из левого желудочка (рис. 1). Уровень мРНК prra имел значительное повышение в группе «8 недель», однако наблюдалось увеличение и на ранних сроках в группах «1 неделя» и «2 недели».

В образцах левого желудочка у животных из временных групп «1 неделя» и «2 недели» отмечалось увеличение уровня экспрессии генов smya5, actn2, nebl, а на поздних сроках (в группах «8 недель» и «10 недель») наблюдалось снижение до контрольного уровня (рис. 2а). Экспрессия следующих анализируемых генов — des, ldb3, fh12, fh11, csrp3 — не изменялась ни в одной временной точке по сравнению с контрольной группой (рис. 2б). Показано, что экспрессия некоторых генов (des, fh12, ldb3) соответствовала динамике возрастания на ранних сроках подобно тому, что наблюдается для smya5, actn2, nebl.

Для более наглядного представления профилей экспрессии проводили иерархическую кластеризацию генов и экспериментальных групп на основе данных экспрессии (рис. 3). Снижение или повышение экспрессии определяли после нормализации входных данных относительного количества мРНК.

Опираясь на полученные результаты по экспрессии генов в левом желудочке, а именно на отсутствие каких-либо изменений в профилях групп «3 недели» и «5 недель», для правого желудочка выделение РНК и последующий анализ при помощи ПЦР-рв проводили только для образцов четырех временных групп: «1 неделя», «2 недели», «8 недель», «10 недель». При анализе экспрессии генов в правом желудочке были обнаружены различия в динамике экспрессии, в соответствии с чем все гены были разделены на две группы. В первую группу были включены гены: smya5, actn2, ldb3, nebl, экспрессия которых постепенно возрастала к поздним срокам в течение всего эксперимента со значимым увеличением в группах 8 и 10 недель (Рис. 4а). Во второй группе экспрессия генов des, fh11, csrp3 усиливалась только на ранних сроках (во временных точках «1 неделя» и «2 недели») с последующим снижением, либо с поддержанием уровня (рис. 4б).

Рисунок 2. Уровень мРНК генов, кодирующих белки Z-диска, в левом желудочке



А — уровень мРНК генов *cmya5*, *actn2*, *nebl* в миокарде левого желудочка в группах «1, 2, 3, 5, 8, 10 недель»; \*  $p < 0,05$  относительно контрольной группы; Б — уровень мРНК генов *fh12*, *des*, *ldb3*, *csrp3*, *fh11* в миокарде левого желудочка в группах «1, 2, 3, 5, 8, 10 недель»; \*  $p < 0,05$  относительно контрольной группы

Рисунок 3. Динамика экспрессии генов в левом желудочке

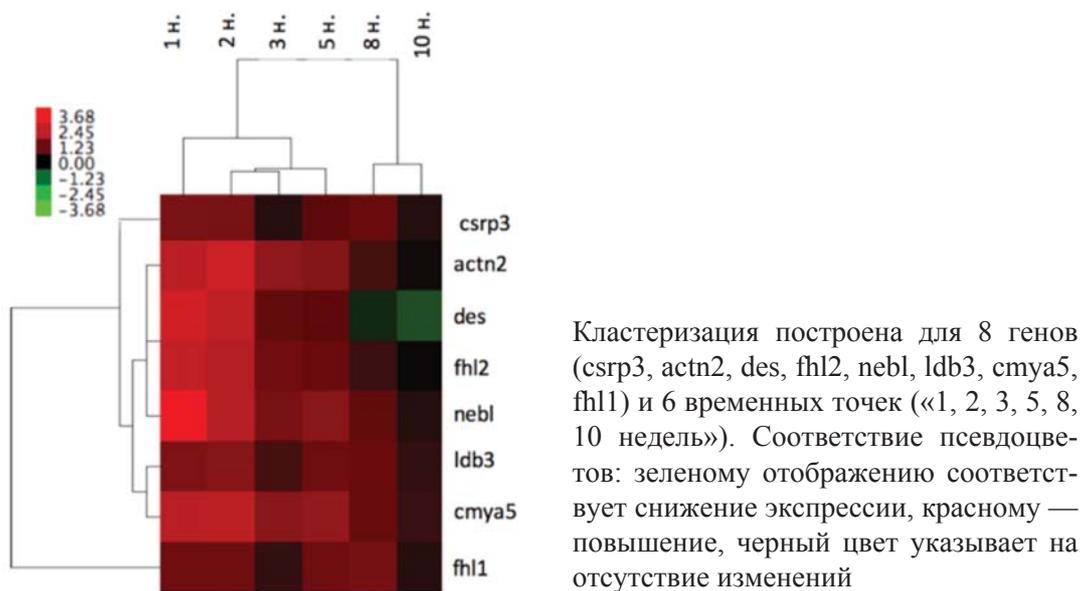
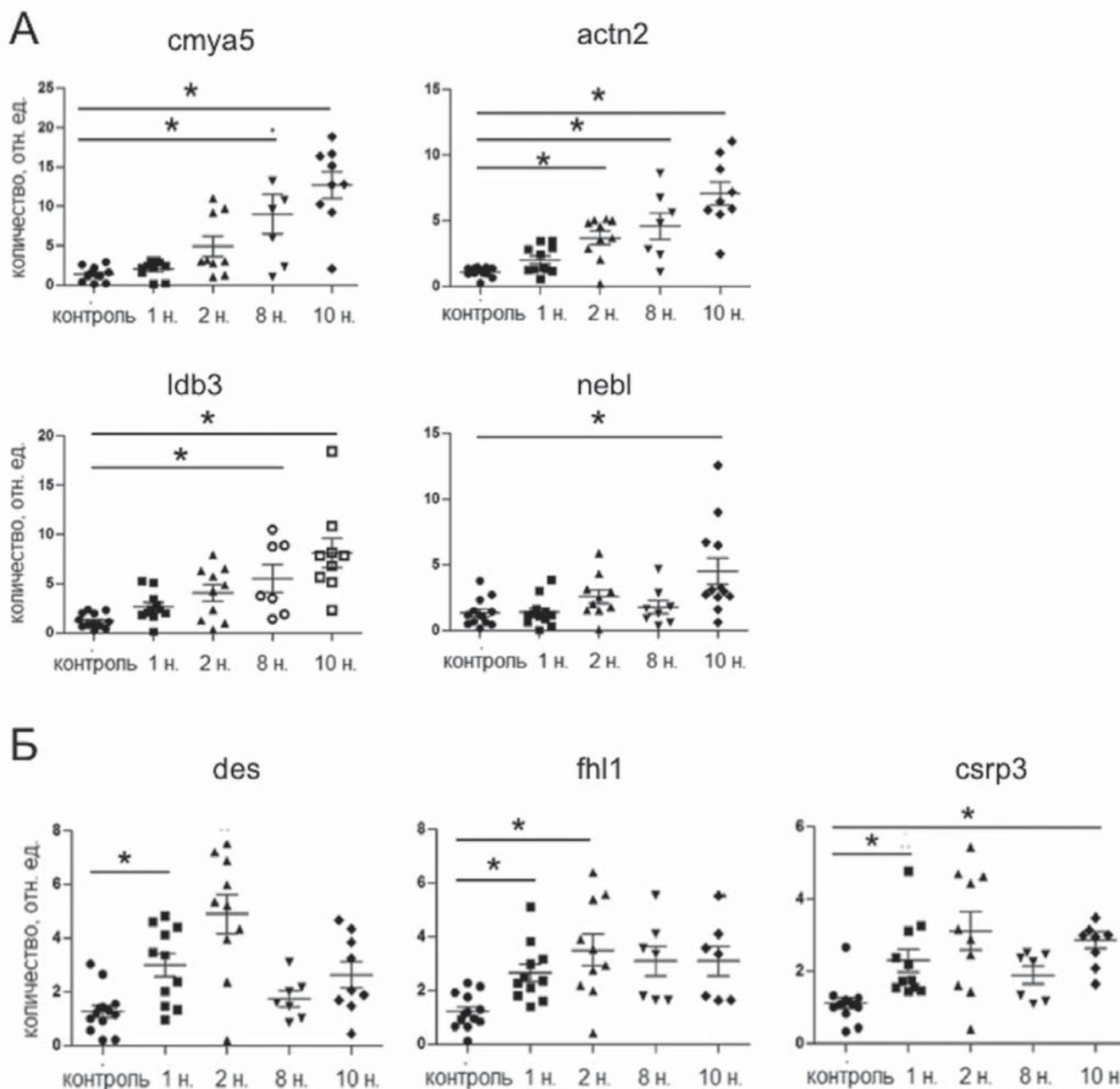


Рисунок 4. Уровень мРНК генов, кодирующих белки Z-диска, в правом желудочке



А — уровень мРНК генов *ctua5*, *actn2*, *ldb3*, *nebl* в миокарде правого желудочка в группах: «1, 2, 8, 10 недель»; \*  $p < 0,05$  относительно контрольной группы; Б — уровень мРНК генов *des*, *fh1*, *csrp3* в миокарде правого желудочка в группах «1, 2, 8, 10 недель»; \*  $p < 0,05$  относительно контрольной группы

Аналогично была проведена кластеризация генов и экспериментальных групп на основе данных по относительному количеству мРНК генов интереса для образцов миокарда правого желудочка (рис. 5).

**Обсуждение.** В настоящей работе показано, что в модели реноваскулярной гипертензии «2 kidney, 1 clip» можно выделить группу генов, которые демонстрируют схожие профили экспрессии на уровне мРНК. В левом желудочке гены *ctua5*, *actn2* и *nebl* увеличивали экспрессию на ранних сроках

(1–2 недели). Ранее было выявлено, что усиление активности симпатической нервной системы происходит на начальной стадии развития гипертензии в модели «2 kidney, 1 clip» [10]. Можно предположить, что гены *ctua5*, *actn2* и *nebl* участвуют в развитии гипертрофии левого желудочка при реализации реноваскулярной модели в ответ на быструю активацию СНС при гипертензии вследствие угнетения барорефлекса.

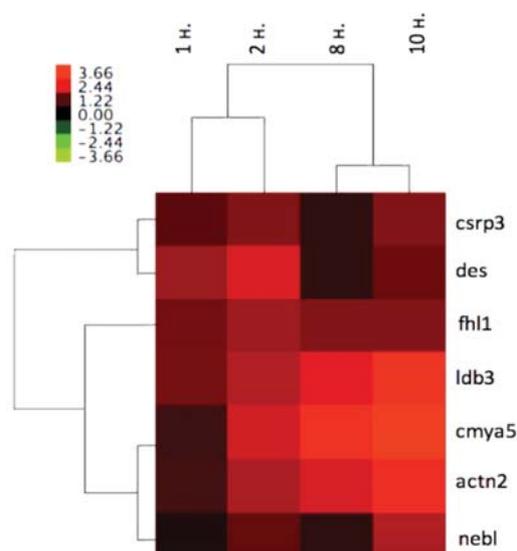
В нашей работе показано, что при гипертрофии миокарда, индуцируемой реноваскулярной ги-

пертензией, в левом желудочке на ранних сроках возрастает уровень экспрессии гена *сmya5*, кодирующего белок миосприн. Литературные данные подтверждают повышение экспрессии миоспина при гипертрофии. Предыдущие работы по исследованию гипертрофии кардиомиоцитов крыс показали, что обработка изолированных клеток фенилэфрином индуцировала увеличение уровня мРНК миоспина по сравнению с контролем [11].

Белки альфа-актинин-2 (*actn2*) и небулетт (*nebl*) в основном выполняют структурные функции. Молекулы  $\alpha$ -актинина-2 представляют гомодимеры, выравненные в антипараллельную структуру и образующие поперечные сшивки актиновых филаментов, определяя их поляризованную ориентацию, кроме того, к  $\alpha$ -актинину-2 присоединяются многие сигнальные белки, например, принадлежащие семейству LIM-белков [12]. Существуют доказательства того, что функции белка небулетт заключаются в стабилизации актиновых филаментов, более того, небулетт напрямую взаимодействует с десмином [13]. Десмин (*des*) является главным промежуточным филаментом кардиомиоцитов и отвечает за поддержание структуры цитоскелета клетки и правильной организации миофибрилл. На экспериментальных моделях показано, что при ремоделировании миокарда вследствие гипертрофии экспрессия десмина увеличивается [14]. Таким образом, белки, формирующие структуру такого важного компонента цитоскелета, как Z-диск, демонстрируют усиленный синтез мРНК при общем увеличении размера клетки.

Эффекты в правом желудочке при гипертрофии левого желудочка могут иметь более адаптивную природу. Такая связь может быть опосредована физическим взаимодействием общих мышечных волокон, внутрисердечной гемодинамикой и динамикой в малом кругу кровообращения [15]. Адаптация может объяснять различия профилей экспрессии генов *сmya5*, *actn2* и *nebl* в правом по сравнению с левым желудочком, а именно, стабильность на ранних и повышение на поздних сроках действия модели (8-10 недель). На поздних сроках большое влияние может оказывать активация РАС (повышение уровня ангиотензина-2 в плазме) и, как следствие, вазоконстрикция и развитие гиперволемии [16]. Рост экспрессии генов *fhl1* и *csrp3* на ранних сроках, а гена *ldb3* на поздних сроках в правом желудочке свидетельствует о том, что каскады с участием сигнальных белков (FHL1, MLP и LDB3 соответственно) возможно подвержены влиянию разных нейрогуморальных систем. Таким образом, более раннее изменение уровня мРНК некоторых генов может быть связано с активацией СНС. Дол-

**Рисунок 5. Динамика экспрессии генов в правом желудочке**



Кластеризация построена для 7 генов (*csrp3*, *des*, *fhl1*, *ldb3*, *cmya5*, *actn2*, *nebl*) и 4 временных точек («1, 2, 8, 10 недель»). Соответствие псевдоцветов: зеленому отображению соответствует снижение экспрессии, красному — повышение, черный цвет указывает на отсутствие изменений

госрочная регуляция кровяного давления опосредована преимущественно РАС, поэтому изменение экспрессии некоторых белков Z-диска на поздних сроках, вероятно, регулируются данной нейрогуморальной системой.

### Выводы

При негемодинамической нагрузке, опосредованной вазоренальной гипертензией, гены *actn2*, *des*, *nebl*, *cmya5*, *fhl2*, *ldb3*, кодирующие белки Z-диска, имеют схожую динамику возрастания экспрессии в левом желудочке на ранних сроках, что, возможно, связано эффектом активации симпатической нервной системы, в то время как в правом желудочке эти гены усиливают экспрессию на более поздних сроках, что может быть опосредовано другим нейрогуморальным механизмом, связанным с гиперволемией и активацией РАС.

### Финансирование / Funding

Представленные в работе данные были получены при поддержке гранта Российского Научного Фонда, соглашение 14-15-00745-П.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

**Список литературы / References**

1. Kahan T, Bergfeldt L. Left ventricular hypertrophy in hypertension: its arrhythmogenic potential. *Heart*. 2005; 91: 250–256.
2. Herrmann SM, Textor SC. Current Concepts in the Treatment of Renovascular Hypertension. *Am J Hypertens*. 2017. [Epub ahead of print].
3. Tsyrlin VA, Galagudza MM, Kuzmenko N V., Pliss MG, Rubanova NS, Shcherbin YI. Arterial Baroreceptor Reflex Counteracts Long-Term Blood Pressure Increase in the Rat Model of Renovascular Hypertension. *PLoS One*. 2013; 8 (6): 1–9.
4. Hoshijima M. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2006; 290 (4): H1313-25.
5. Knöll R, Buyandelger B, Lab M. The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011; 2011: 569–628.
6. Lyon RC, Zanella F, Omens JH, Sheikh F. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2015; 116 (8): 1462–1476.
7. Tabish AM, Azzimato V, Alexiadis A, Buyandelger B, Knöll R. Genetic epidemiology of titin-truncating variants in the etiology of dilated cardiomyopathy. *Biophys Rev* [Internet]. 2017; 9 (3): 207–223.
8. Frank D, Frey N. Cardiac Z-disc signaling network. *J Biol Chem*. 2011; 286 (12): 9897–9904.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods* [Internet]. 2001; 25 (4): 402–408.
10. Oliveira-sales EB, Colombari E, Abdala AP, Campos RR, Paton JFR. Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model. 2016; 1(November 2015): 67–80.
11. Nakagami H, Kikuchi Y, Katsuya T, Morishita R, Akasaka H, Saitoh S, et al. Gene polymorphism of myospryn (cardiomyopathy-associated 5) is associated with left ventricular wall thickness in patients with hypertension. *Hypertens Res*. 2007; 30 (12): 1239–1246.
12. Sequeira V, Nijenkamp LLAM, Regan JA, Velden J Van Der. Biochimica et Biophysica Acta The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *BBA - Biomembr* [Internet]. 2014; 1838 (2): 700–722.
13. Hernandez DA, Bennett CM, Dunina-Barkovskaya L, Wedig T, Capetanaki Y, Herrmann

H, et al. Nebulette is a powerful cytolinker organizing desmin and actin in mouse hearts. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2016; 27: mbc.E16-04-0237.

14. Monreal G, Nicholson LM, Han B, Joshi MS, Phillips AB, Wold LE, et al. Cytoskeletal remodeling of desmin is a more accurate measure of cardiac dysfunction than fibrosis or myocyte hypertrophy. *Life Sci* [Internet]. 2008; 83 (23–24): 786–794.

15. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, et al. Right ventricular function and failure: Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*. 2006; 114 (17): 1883–1891.

16. Te Riet L, Van Esch JHM, Roks AJM, Van Den Meiracker AH, Danser AHJ. Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations. *Circ Res*. 2015; 116 (6): 960–975.

**Информация об авторах:**

Князева Анастасия Алексеевна, магистр ФГАОУ ВО «СПбПУ Петра Великого»;

Смолина Наталья Александровна, к.б.н., н.с. Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Кашерининов Игорь Юрьевич, врач анестезиолог-реаниматолог ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Вербилло Сергей Леонидович, врач функциональной диагностики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна, к.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

**Author information:**

Anastasia A. Knyazeva, master student Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic university;

Natalia A. Smolina, PhD, researcher Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Igor Y. Kasherininov, anesthesiologist-resuscitator Almazov National Medical Research Centre;

Sergey L. Verbillo, functional diagnostic practitioner Almazov National Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, MD, Director of Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.