



Complex Issues of Cardiovascular Diseases

Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний

3/2017

**Научно-практический рецензируемый журнал
Scientifically-practical reviewed journal**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

главный редактор академик РАН **Л. С. Барбараш**
зам. гл. редактора д-р мед. наук, чл.-корр. РАН **О. Л. Барбараш**
д-р мед. наук, проф. **Г. В. Артамонова**
научный редактор д-р мед. наук, проф. **Е. В. Григорьев**

ЧЛЕНЫ РЕДКОЛЛЕГИИ:

д-р мед. наук, проф. **С. А. Бернс**
д-р мед. наук **В. И. Ганюков**
д-р мед. наук **О. В. Груздева**
д-р мед. наук **С. В. Иванов**
д-р мед. наук **В. В. Кашталап**
д-р биол. наук **Ю. А. Кудрявцева**
д-р мед. наук **С. А. Макаров**
д-р мед. наук **С. Е. Мамчур**
д-р мед. наук **Р. С. Тарасов**
д-р мед. наук **А. Н. Сумин**

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

академик РАН **Б. Г. Алесян** (Москва)
д-р мед. наук, проф. **О. Ю. Александрова** (Москва)
академик РАН **Л. И. Афтanas** (Новосибирск)
чл.-корр. РАН **С. А. Бойцов** (Москва)
академик РАН **М. И. Воевода** (Новосибирск)
д-р мед. наук, проф. **А. А. Гарганеева** (Томск)
д-р мед. наук, проф. **И. М. Давидович** (Хабаровск)
академик РАН **А. М. Караськов** (Новосибирск)
академик РАН **Р. С. Карпов** (Томск)
д-р мед. наук, проф. **Е. Д. Космачева** (Краснодар)
чл.-корр. РАН **Ю. Б. Лишманов** (Томск)
академик РАН **Ю. П. Никитин** (Новосибирск)
академик РАН **С. В. Попов** (Томск)
академик РАН **В. П. Пузырев** (Томск)
д-р мед. наук, проф. **И. В. Самородская** (Москва)
проф. **А. М. Сейфалиан** (Лондон, Англия)
д-р мед. наук, проф. **И. И. Староверов** (Москва)
д-р мед. наук, проф. **А. Т. Тепляков** (Томск)
д-р биол. наук, проф. **И. Г. Халиулин** (Бристоль, Англия)
академик РАН **И. Е. Чазова** (Москва)
д-р мед. наук, проф. **А. М. Чернявский** (Новосибирск)
д-р мед. наук, проф. **Г. А. Чумакова** (Барнаул)
д-р мед. наук, проф. **В. М. Шипулин** (Томск)
академик РАН **Е. В. Шляхто** (Санкт-Петербург)
д-р мед. наук, проф. **Я. Л. Эльгудин** (Кливленд, США)

EDITORS

Editor-in-Chief RAS academician **L. S. Barbarash**
Deputy Editor-in-Chief RAS cor. member **O. L. Barbarash**
Prof. **G. V. Artamonova**
Science editor Prof. **E. V. Grigoriev**

EDITORIAL STAFF:

Prof. **S. A. Berns**
Dr. **V. I. Ganyukov**, PhD
Dr. **O. V. Gruzdeva**, PhD
Dr. **S. V. Ivanov**, PhD
Dr. **V. V. Kashtalap**, PhD
Dr. **Yu. A. Kudryavtseva**, PhD
Dr. **S. A. Makarov**, PhD
Dr. **S. E. Mamchur**, PhD
Dr. **R. S. Tarasov**, PhD
Dr. **A. N. Sumin**, PhD

EDITORIAL BOARD MEMBERS:

RAS academician **B. G. Alekhan** (Moscow)
Prof. **O. Yu. Aleksandrova** (Moscow)
RAS academician **L. I. Aftanas** (Novosibirsk)
RAS cor. member **S. A. Boytsov** (Moscow)
RAS academician **M. I. Voevoda** (Novosibirsk)
Prof. **A. A. Garganeeva** (Tomsk)
Prof. **I. M. Davidovich**, PhD (Khabarovsk)
RAS academician **A. M. Karaskov** (Novosibirsk)
RAS academician **R. S. Karpov** (Tomsk)
Prof. **E. D. Kosmacheva** (Krasnodar)
RAS cor. member **Yu. B. Lishmanov** (Tomsk)
RAS academician **Yu. P. Nikitin** (Novosibirsk)
RAS academician **S. V. Popov** (Tomsk)
RAS academician **V. P. Puzyrev** (Tomsk)
Prof. **I. V. Samorodskaya** (Moscow)
Prof. **A. M. Seifalian** (London, UK)
Prof. **I. I. Staroverov** (Moscow)
Prof. **A. T. Teplyakov** (Tomsk)
Prof. **I. G. Khaliulin**, PhD (Bristol, UK)
RAS academician **I. E. Chazova** (Moscow)
Prof. **A. M. Chernyavsky** (Novosibirsk)
Prof. **G. A. Chumakova** (Barnaul)
Prof. **V. M. Shipulin** (Tomsk)
RAS academician **E. V. Shlyakhto** (Saint Petersburg)
Prof. **Ya. L. Elgudin** (Cleveland, USA)

DOI: 10.17802/2306-1278-2017-6-3

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор). Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-63011 от 10 сентября 2015 г.

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Кемеровская обл., г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Журнал представлен в следующих международных базах данных и информационно-справочных изданиях: (РИНЦ) **Российский индекс научного цитирования**, **Ulrich's International Periodicals Directory**. Решением Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ научно-практический рецензируемый журнал «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертационных исследований на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Полнотекстовые версии всех номеров размещены в Научной электронной библиотеке: www.elibrary.ru и Научной электронной библиотеке «CYBERLENINKA»: www.cyberleninka.ru. Правила публикации авторских материалов и архив номеров: www.kemcardio.ru.

Информация о подписке: www.kemcardio.ru. Подписка по каталогу «Роспечать»: индекс подписки – 25217.

Воспроизведение опубликованных материалов без письменного согласия редакции не допускается. Авторские материалы могут не отражать точку зрения редакции. Ответственность за достоверность информации в рекламных публикациях несет рекламодатель.

Периодичность: четыре раза в год.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ORIGINAL STUDIES

- К. Ю. Клышников, Е. А. Овчаренко, Н. А. Щеглова, Л. С. Барбараш**
«Функциональные характеристики биопротезов «ЮниЛайн»» 6
- В. Г. Матвеева, Л. В. Антонова, В. В. Севостьянова, Е. А. Великанова, Е. О. Кривкина, Т. В. Глушкова, Ю. И. Ходыревская, О. Л. Барбараш, Л. С. Барбараш**
«Модификация RGD-пептидами сосудистых графтов малого диаметра из поликапролактона: результаты экспериментального исследования» 13
- И. А. Кирилова, В. Т. Подорожная, Ю. П. Шаркеев, С. В. Николаев, А. В. Пененко, П. В. Уваркин, А. С. Ратушняк, В. В. Чебодаева, Е. А. Анастасиева, С. К. Голушко, А. В. Корель**
«Свойства деминерализованного костного матрикса для биоинженерии тканей» 25
- Ю. В. Байракова, А. В. Понасенко, М. В. Хуторная, А. А. Кузьмина, Я. В. Казачек, О. Л. Барбараш**
«Роль полиморфизмов гена *CRP* в возникновении фибрилляции предсердий у пациентов ИБС» 37
- Ш. Б. Саая, И. С. Захарова, М. К. Живень, А. И. Шевченко, А. М. Смирнова, П. П. Лактионов, А. О. Степанова, А. В. Ромащенко, А. М. Волков, Е. Л. Завьялов, Е. А. Покушалов, Л. Н. Иванова, С. М. Закиян, А. А. Карпенко**
«Био- и гемосовместимость тканеинженерных конструкций из поликапролактона, заселенных человеческими эндотелиальными и гладкомышечными клетками, после имплантации в брюшную аорту мышам SCID» 47
- П. М. Ларионов, Н. А. Маслов, Е. О. Папаева, А. С. Юношев, А. Г. Самохин, В. П. Терещенко, В. В. Павлов, А. Т. Титов**
«Анализ перфузионных свойств скаффолда» 64
- Р. С. Тарасов, А. Н. Казанцев, А. Н. Коков, А. В. Безденежных, Н. В. Кондрикова, Т. Ю. Сергеева, И. Н. Сизова, Л. С. Барбараш**
«Трехлетние результаты медикаментозного и хирургического реперфузионного лечения пациентов, перенесших тромбоэмболию легочной артерии: исходы, клинический статус, состояние легочной перфузии» 71
- Д. М. Рудакова, Н. Г. Веселовская, Г. А. Чумакова, Е. С. Осипова**
«Предикторы коронарного атеросклероза у мужчин с метаболическим синдромом» 84
- K. U. Klyshnikov, E. A. Ovcharenko, N. A. Scheglova, L. S. Barbarash**
«Functional characteristics of biological protection «UniLine»» 6
- V. G. Matveeva, L. V. Antonova, V. V. Sevostyanova, E. A. Velikanova, E. O. Krivkina, T. B. Glushkova, Yu. I. Khodyrevskaya, O. L. Barbarash, L. S. Barbarash**
«Modification by RGD-peptides of vascular grafts of small diameter from polycaprolactone: experimental study results» 13
- I. A. Kirilova, V. T. Podorozhnaya, Yu. P. Sharkeev, S. V. Nikolaev, A. V. Penenko, P. V. Uvarkin, A. S. Ratushnyak, V. V. Chebodaeva, E. A. Anastasieva, S. K. Golushko, A. V. Korel**
«Properties of the demineralized bone matrix for bioengineering of tissue» 25
- Yu. V. Bayrakova, A. V. Ponasenko, M. V. Khutornaya, A. A. Kuzmina, Ya. V. Kazachek, O. L. Barbarash**
«The role of polymorphisms of *CRP* gene in occurrence of atrial fibrillation in CAD patients» 37
- Sh. B. Saaya, I. S. Zakharova, M. K. Zhiven, A. I. Shevchenko, A. M. Smirnova, P. P. Laktionov, A. O. Stepanova, A. V. Romashenko, A. M. Volkov, Y. L. Zavyalov, Y. A. Pokushalov, L. N. Ivanova, S. M. Zakian, A. A. Karpenko**
«Bio - and hemocompatible tissue-engineered polycaprolactone scaffolds seeded by human endothelial and smooth muscle cells after implantation in the abdominal aorta of SCID mice» 47
- P. M. Larionov, N. A. Maslov, E. O. Papaeva, A. S. Yunoshev, A. G. Samokhin, V. P. Tereshchenko, V. V. Pavlov, A. T. Titov**
« Analysis of the perfusion properties of the scaffold» 64
- R. S. Tarasov, A. N. Kazantsev, A. N. Kokov, A. V. Bezdenezhny, N. V. Kondrikova, T. Y. Sergeeva, I. N. Sizova, L. S. Barbarash**
«Three-year results of medical and surgical reperfusional treatment of patients transposed by thromboembolia of pulmonary artery: outcome, clinical status, state of pulmonary perfusion» 71
- D. M. Rudakova, N. G. Veselovskaya, G. A. Chumakova, E. S. Osipova**
«Predictors of coronary atherosclerosis at men with the metabolic syndrome» 84

**Р. А. Мухамадияров, В. В. Севостьянова,
Д. К. Шишкова, М. В. Насонова,
С. Ф. Зинчук, Ю. А. Кудрявцева** 93

«Применение композиционного контраста для исследования биологических объектов методом сканирующей электронной микроскопии»

**P. A. Muhamadiarov, V. V. Sevostianova,
D. K. Shishkova, M. V. Nasonova, S. F. Zinchuk,
U. A. Kudryavceva**

«Composite contrast using to research biological objects by scanning electron microscopy»

**Д. Д. Косягина, П. Н. Завырылина, 104
Д. Ю. Седых, И. С. Быкова, В. В. Кашталап**
«Факторы, ассоциированные с поздним обращением за медицинской помощью при инфаркте миокарда»

**D.O. Kosyagin, P. N. Zavyrilina, D. Yu. Sedih,
I. S. Bykova, V. V. Kashtalap**

«Factors associated with delays in seeking medical care in myocardial infarction»

**А. Н. Коков, Н. К. Брель, В. Л. Масенко, 113
О. В. Груздева, В. Н. Каретникова,
В. В. Кашталап, О. Л. Барбараш**
«Количественная оценка висцерального жирового депо у больных ишемической болезнью сердца с использованием современных томографических методик»

**A. N. Kokov, N. K. Brel, V. L. Masenko, O. V. Gruzdeva,
V. N. Karetnikova, V. V. Kashtalap, O. L. Barbarash**

«Quantitative assessment of visceral adipose depot in patients with ischemic heart disease by using of modern tomographic methods»

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ОБЗОРЫ

ANALYTICAL REVIEWS

К. А. Айтбаев, И. Т. Муркамилов
«Ожирение и метаболический синдром: 120
патофизиологическая роль кишечной
микробиоты и потенциальные возможности
альтернативной терапии»

K. A. Aitbaev, I. T. Murkamilov

«Obesity and metabolic syndrome: pathophysiological role of gut microbiota and potential of the alternative therapy»

**А. И. Лотков, В. Г. Матвеева, Л. В. Антонова,
О. А. Кашин, А. Н. Кудряшов** 131
«Основные направления модификации поверхности металлических эндоваскулярных стентов в решении проблемы рестенозов (обзор, 2 часть)»

**A. I. Lotkov, V. G. Matveeva, L. V. Antonova,
O. A. Kashin, A. N. Kudryashov**

«Surface modification of bare-metal stents for preventing restenosis (part 2)»

**Д. К. Шишкова, М. В. Насонова,
Ю. А. Кудрявцева** 143
«Этиология, патогенез и профилактика спаечного процесса»

D. K. Shishkova, M. V. Nasonova, Y. A. Kudryavtseva

«Etiology, pathogenesis and prevention of adhesive disease»

Igor Khaliulin, Leonid N. Maslov

«Problem of heart salvation during reperfusion. Opioid receptor agonists as a possible solution»

150

М. Ю. Синицкий, А. В. Понасенко, О. В. Груздева 155
«Генетический профиль и секретом адипоцитов висцеральной и подкожной жировой ткани у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями»

M. Y. Sinitsky, A. V. Ponasenko, O. V. Gruzdeva

«Genetic profile and secretome of adipocytes from visceral and subcutaneous adipose tissue in patients with cardiovascular diseases»

**Ю. А. Аргунова, С. А. Помешкина,
А. А. Иноземцева** 166
«Возможности физических тренировок как фактора ишемического preconditionирования перед выполнением коронарного шунтирования (обзор литературы)»

**Y. A. Argunova, S. A. Pomeshkina,
A. A. Inozemtseva**

«Potential benefits of exercise training as a factor of ischemic preconditioning prior to coronary artery bypass grafting (review)»

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Третий номер нашего журнала посвящен применению в медицине биотехнологий, основу которых составляют молекулярная биология, генная инженерия, микробиология, химические технологии и ряд других наук. Благодаря биотехнологическим методам создаются новые лекарственные препараты, имплантаты для замещения пораженных органов и тканей, вакцины и сыворотки. Достижения современной биотехнологии активно используются и при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Применение биологических протезов клапана сердца продлевает жизнь пациентам с приобретенными и врожденными пороками сердца. В статье Клышников К.Ю. и соавторов показано, что отечественные ксеноперикардальные биопротезы «ЮниЛайн», предназначенные для аортальной позиции, демонстрируют удовлетворительные гидродинамические показатели в эксперименте, сопоставимые с существующими мировыми аналогами.

Для замещения пораженных сосудов малого диаметра активно разрабатываются тканеинженерные конструкции с использованием биополимерных каркасов (матриц) и культур клеток. Данные исследования ведутся одновременно несколькими коллективами ученых. Антонова Л.В. и соавторы (г. Кемерово) для придания поверхности полимерных сосудистых графтов функциональной активности применяют модификацию RGD-пептидами, что способствует более ранней эндотелизации внутренней поверхности и повышению проходимости графтов в эксперименте. Исследователи из г. Новосибирска, Саая Ш.Б. с коллегами для повышения био- и гемосовместимости тканеинженерные конструкции заселяли эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Результаты обоих исследований демонстрируют перспективность выбранных направлений.

Тематике созданию матриц для тканевой инженерии, или так называемых скаффолдов, посвящены статьи Кириловой И.А. и Ларионова П.М. с соавторами. Показано, что обработка протоколов измерения микроморфологических, пьезоэлектрических и транспортных свойств у материалов потенциальных матриц является важным аспектом при создании технологии биоинженерии тканевых имплантатов для восстановительной хирургии.

Разработка новых подходов к изучению биологических объектов позволяет исследовать микроструктурные особенности контактов между твердым материалом и биологическими тканями, анализировать клеточный состав на границе имплант-живая ткань. Инновационные подходы при изучении биологических образцов методом сканирующей электронной ми-



кроскопии продемонстрировали в своей работе Мухамадияров Р.А. и соавторы.

Вторая часть настоящего выпуска посвящена аналитическим обзорам. Современные представления об этиологии и патогенезе спаечного процесса, который зачастую сопровождает операции на открытом сердце, позволят создать радикальное средство, предотвращающее спаечный процесс, которое будет способствовать снижению количества осложнений в послеоперационном периоде (Шишкова Д.К. и соавторы). В статье Синицкого М.Ю. с соавторами проанализированы особенности профиля адипокинов и цитокинов, секретируемых различными типами жировой ткани, а также данные об изменении экспрессии ряда ключевых генов в адипоцитах, полученных из различных жировых депо, у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Изучению висцеральной жировой ткани, оказывающей непосредственное влияние на развитие атеросклероза, метаболического синдрома и других патологических состояний, ассоциированных с ожирением, с использованием современных томографических методик посвящена статья коллектива авторов под руководством Кокова А.Н.

Уважаемые коллеги! Я надеюсь, что содержание настоящего номера представляет интерес для специалистов различных направлений – врачей, биологов, химиков, биотехнологов. Интеграция знаний различных областей науки позволит создавать инновационные технологии и продукты для применения в клинической практике с целью повышения качества жизни пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Главный редактор, академик РАН



Л.С. Барбараш

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ORIGINAL STUDIES

УДК 616.126.52

DOI: 10.17802/2306-1278-2017-6-3-6-12

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОПРОТЕЗОВ «ЮНИЛАЙН»

К. Ю. КЛЫШНИКОВ¹, Е. А. ОВЧАРЕНКО¹, Н. А. ЩЕГЛОВА², Л. С. БАРБАРАШ¹

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

²*ЗАО «НеоКор», Кемерово, Россия*

Целью работы явилась оценка гидродинамических характеристик биопротезов клапана сердца «ЮниЛайн», предназначенных для протезирования клапана аорты.

Материалы и методы. В исследовании использовали три биопротеза «ЮниЛайн» (ЗАО «НеоКор», Россия) типоразмером 21, 23, 25 мм, предназначенных для клинического применения. Оценка гидродинамических параметров проводили в установке пульсирующего потока Vivitro (Vivitro Labs, Канада), имитирующей работу «левой» половины сердца. Оценка гидродинамической функции всех протезов осуществляли при создании физиологического режима работы установки – ударный объем = 70 мл; минутный объем = 5 л/мин; среднее давление в камере, имитирующей аорту = 100 мм рт.ст.

Результаты. Средний транспротезный градиент составил 5,4-15,5 мм рт. ст.; максимальный транспротезный градиент составил 11,9-25,2 мм рт.ст.; эффективная площадь отверстия 1,38-2,15 см²; фракция регургитации 1,5-3,905%; индекс производительности, рассчитанный по посадочному диаметру проходного отверстия протеза = 47,4-68,5%.

Заключение. Биопротезы «ЮниЛайн», предназначенные для аортальной позиции, демонстрируют удовлетворительные гидродинамические in vitro показатели, сопоставимые с существующими мировыми аналогами, в то же время, существующая конструкция биопротеза обладает потенциалом углубленной оптимизации створчатого аппарата.

Ключевые слова: протез клапана сердца, гидродинамика, аортальный клапан, транспротезный градиент, регургитация.

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BIOLOGICAL PROTECTION «UNILINE»

K. U. KLYSHNIKOV¹, E. A. OVCHARENKO¹, N. A. SCHEGLOVA², L. S. BARBARASH¹

¹*Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia*

²*NeoCor LLC, Kemerovo, Russia*

The aim of the work was to evaluate the hydrodynamic characteristics of the heart valve bioprosthesis «UniLine», intended for prosthetics of the aortic valve.

Materials and methods. In the contest three prostheses «UniLine» with a size of 21, 23, 25 mm, intended for clinical use. The evaluation of the hydrodynamic parameters was carried out in a Vivitro pulsating flow setup (Vivitro Labs, Canada) simulating the operation of the «left» half of the heart. Estimated hydrodynamic function of all prostheses when creating the physiological mode of operation of the unit - impact volume = 70 ml, minute volume = 5 l/min, mean aortic pressure = 100 mmHg.

Results. The average trans-prosthetic gradient was 5.4-15.5 mmHg.; the maximum trans-prosthetic gradient was 11.9-25.2 mmHg; effective orifice area 1.38-2.15 cm²; regurgitation fraction 1.5-3.905%; productivity index, calculated from the inner orifice diameter 47.4-68.5%.

Conclusion. Bioprostheses «UniLine», intended for aortic position, demonstrated satisfactory hydrodynamic in vitro characteristics, comparable with existing world analogues. The existing design has the potential to increase

hydrodynamic efficiency, but requires advanced approaches and methods, such as FSI, for its implementation.

Keywords. Heart valve prosthesis, hydrodynamics, aortic valve, trans-prosthetic gradient, regurgitation.

Введение

Протезирование является наиболее распространенной практикой коррекции приобретенных пороков клапанов сердца – по данным на 2015 год, количество таких вмешательств составило в России 11224. Полная замена пораженного клапана особенно актуальна для позиции аорты, для которой из всех 6252 операций в 2015 году провели 6164 протезирования (98,6%) [1]. Существующие клинические осложнения, недостатки функционирования и особенности использования отечественных и зарубежных протезов обуславливают отсутствие «золотого» стандарта таких изделий и постоянное их совершенствование [2–4]. Поиск и оценка перспективных путей оптимизации протеза клапана сердца напрямую зависит от анализа его гидродинамических характеристик – основной функции, определяющей эффективность и безопасность работы протеза.

Успешный опыт клинического использования протезов клапана сердца «ЮниЛайн» (ЗАО «НеоКор», Россия) демонстрирует его высокую эффективность как в ближайшем, так и в отдаленном периодах. Однако наличие гемодинамически значимых эффектов – ненулевого пикового и среднего транспротезного градиентов, связанных с несовершенством створчатого аппарата, обуславливают определение путей оптимизации конструкции [5]. В связи с этим, целью данной

работы явилась оценка гидродинамических показателей биопротезов клапана аорты «ЮниЛайн» для определения потенциальных возможностей его улучшения.

Материалы и методы

В работе оценивали гидродинамические показатели трех биопротезов «ЮниЛайн», предназначенных для аортальной позиции: типоразмеров 21, 23, 25 мм. Конструктивно изделие относится к каркасным протезам, в которых основную поддерживающую роль выполняет опорный каркас, выполненный из полипропилена в сочетании с нитиновой проволокой. Сочетание жесткого полимерного и мягкого сверхэластичного компонента позволяет, с одной стороны, надежно поддерживать форму конструкции, противодействуя сдавливающим силам выводного отдела левого желудочка; с другой стороны – обеспечить подвижность комиссуральных стоек и частичное демпфирование гидродинамического удара на закрывающиеся створки. На комбинацию опорных каркасов монтируют створчатый аппарат и обшивку, выполненные из биологического материала – ксеноперикарда, консервированного диглицидиловым эфиром этиленгликоля [6]. В основании протеза располагается синтетическая пришивная манжета, повторяющая по форме фиброзное кольцо клапана аорты (рис.1А).

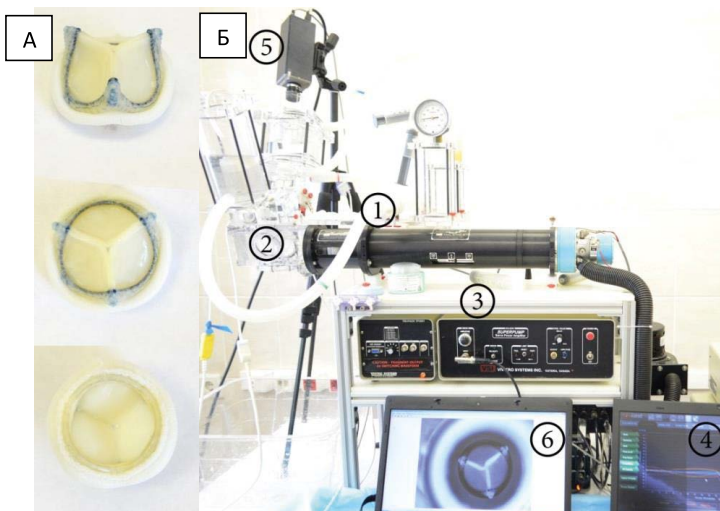


Рисунок 1.

а) – биопротезы клапана аорты «ЮниЛайн»,

б) стенд гидродинамический:

- 1 – установка пульсирующего потока;
- 2 – камеры, имитирующие камеры сердца;
- 3 – блок управления параметрами установки;
- 4 – система для сбора и анализа текущих параметров работы протеза;
- 5 – высокоскоростная камера для анализа работы створок;
- 6 – потоковое видео работы протеза в реальном времени.

Исследование проводили в установке пульсирующего потока Vivitro (Vivitro Labs, Канада), имитирующей работу «левой» половины сердца – желудочка, предсердия и аорты, с дополнительным включением модели периферического сопротивления, аналогичного работе периферической сосудистой системы (рис.1Б). Оценку гидродинамической функции всех протезов осуществляли при создании физиологического режима работы установки – ударный объем = 70 мл, минутный объем = 5 л/мин, среднее давление в аорте = 100 мм рт.ст. В качестве рабочей жидкости использовали 0,9% раствор NaCl комнатной температуры. В ходе испытания оценивали значения давления «перед» протезом – в камере, имитирующей левый желудочек; давление «после» протеза – в камере, аналогичной корню аорты. Также фиксировали поток жидкости через клапан встроенным датчиком. Исследуемые показатели анализировали в течение 10 циклов в устоявшемся режиме [7]. На основании исходных данных работы протеза в программном обеспечении Vivitro рассчитывали:

1) Средний (ΔP_{mean}) и максимальный (ΔP_{peak}) транспротезный градиент, как среднюю и максимальную разность, соответственно, показаний датчиков давления «перед» и «после» протеза.

2) Эффективную площадь отверстия (ЕОА) – по формуле (1), исходя из показателя среднеквадратичного прямого потока за цикл (2):

$$EOA = \frac{q_{vRMS}}{51,6 \cdot \sqrt{\frac{\Delta P}{\rho}}} \quad (1)$$

$$q_{vRMS} = \sqrt{\frac{\int_{t_1}^{t_2} q_v^2(t) dt}{t_2 - t_1}} \quad (2)$$

где q_{vRMS} – среднеквадратичное значение прямого потока; ΔP – транспротезный градиент, ρ – плотность испытательной жидкости; $q_v(t)$ – мгновенный поток при времени t ; $t_2 - t_1$ – время прямого потока [8].

3) Фракцию регургитации (FR), как долю, приходящуюся на общие потери потока жидкости (запирающий объем (CV) + объем регургитации (V_{per})) (рис.2) по отношению к прямому потоку (FV), т.е.:

$$FR = \frac{CV + V_{\text{per}}}{FV} * 100 \quad (3)$$

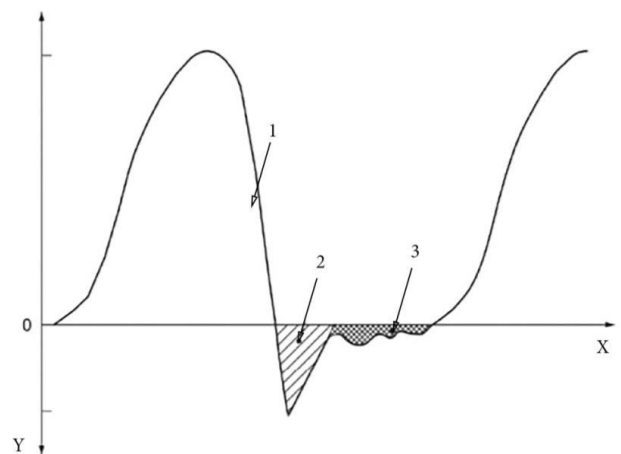


Рисунок 2. Схема определения фракции регургитации (FR): X – ось времени; Y – показания датчика потока; 1 – прямой поток (FV); 2 – запирающий объем (CV); 3 – объем регургитации (V_{reg})

4) Индекс производительности (PI) как отношение эффективной площади отверстия ЕОА к геометрической площади проходного отверстия протеза, рассчитанной по посадочному диаметру [9], составляющей – 2,54; 3,14 и 3,80 см² для 21, 23 и 25 типоразмера, соответственно.

$$PI = \frac{EOA}{S} * 100 \quad (4)$$

Дополнительно с помощью системы высокоскоростной съемки FastVideo-250 (НПО «Астек», Россия) осуществляли видеосъемку работы протеза со скоростью 250 кадров/сек для качественной оценки функционирования створчатого аппарата и подвижности опорного каркаса [10].

Результаты и обсуждение

Количественные результаты проведенного исследования представлены в табл.1.

Количественные характеристики, полученные в исследовании, согласуются с данными зарубежных аналогов – каркасных биопротезов Perimount (Edwards LifeSciences, США) аналогичных диаметров [11] (рис.3). Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной гидродинамической эффективности исследуемых протезов «ЮниЛайн».

Таблица 1.

Гидродинамические характеристики протезов «ЮниЛайн»

Показатель	«ЮниЛайн» 21	«ЮниЛайн» 23	«ЮниЛайн» 25
ΔP_{mean} , мм рт.ст.	15,5	5,4	7,5
ΔP_{peak} , мм рт.ст.	25,2	11,9	13,1
ЕОА, см ²	1,38	2,15	1,8
RF, %	1,562	3,905	3,822
PI, %	54,3	68,5	47,4

Примечание: ΔP_{mean} – средний и ΔP_{peak} – пиковый транспротезный градиент, ЕОА – эффективная площадь отверстия, RF – фракция регургитации, PI – индекс производительности.

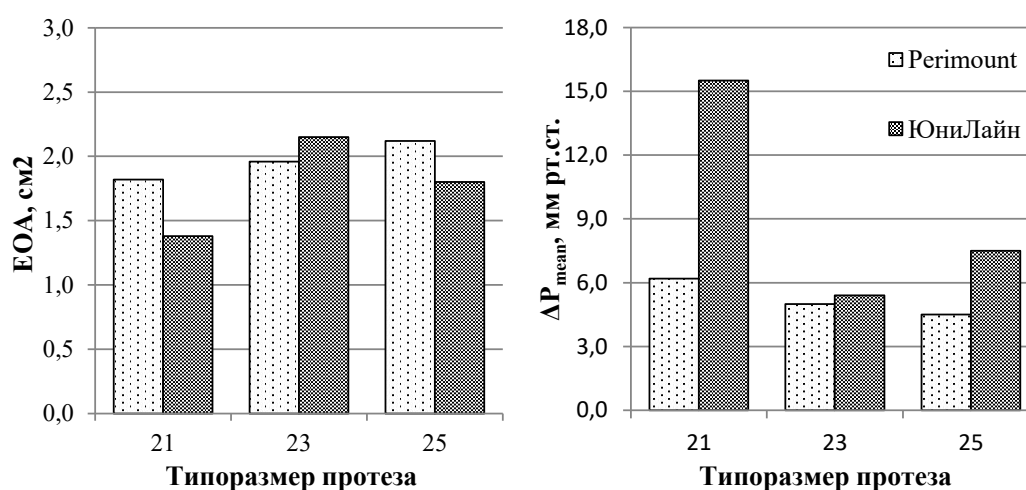


Рисунок 3. Гидродинамические характеристики аналога – биопротеза Perimount и исследуемых образцов «ЮниЛайн»: ΔP_{mean} – средний транспротезный градиент, ЕОА – эффективная площадь отверстия.

Качественный анализ работы протезов (рис. 4) демонстрирует схожее поведение для всех трех типоразмеров: створчатый аппарат работает симметрично, образуя геометрическое проходное отверстие, близкое к окружности.

Однако возникающее натяжение свободного края створчатого аппарата приводит к куполообразному раскрытию створок, наблюдаемому во всех случаях. Данный эффект незначительно снижает площадь отверстия и, как следствие, гидродинамическую эффективность протезов. Данные литературы свидетельствуют о том, что в процессе длительного функционирования протезов клапанов сердца происходит значительное растяжение биологического материала [12] вследствие особенностей микроструктуры ксеноперикарда – наличия извитых волокон коллагена [13, 14]. Т.е. «недостаток» длины свободного края возможно будет компенсирован его

удлинением в относительно ближайшем периоде работы изделия в кровотоке.

Более значимые эффекты возникают в закрытом состоянии. Несмотря на то, что створки формируют плотный, герметичный контакт, подтвержденный незначительной фракцией регургитации (до 3,9%), возникает «закручивание» свободного края (рис. 4), наблюдаемое для всех трех типоразмеров. В исследованиях компьютерного моделирования, описанных в литературе, показано, что подобный эффект возможен вследствие чрезмерной высоты зоны коаптации [15]. Возникающий избыток по высоте в биологической ткани искажает геометрию зоны смыкания, вызывая асимметричное и неравномерное распределение напряжения в материале, т.е. возникновение «концентраторов напряжения». Подобные участки могут существенно снижать циклоустойкость конструкций – ключевой пока-

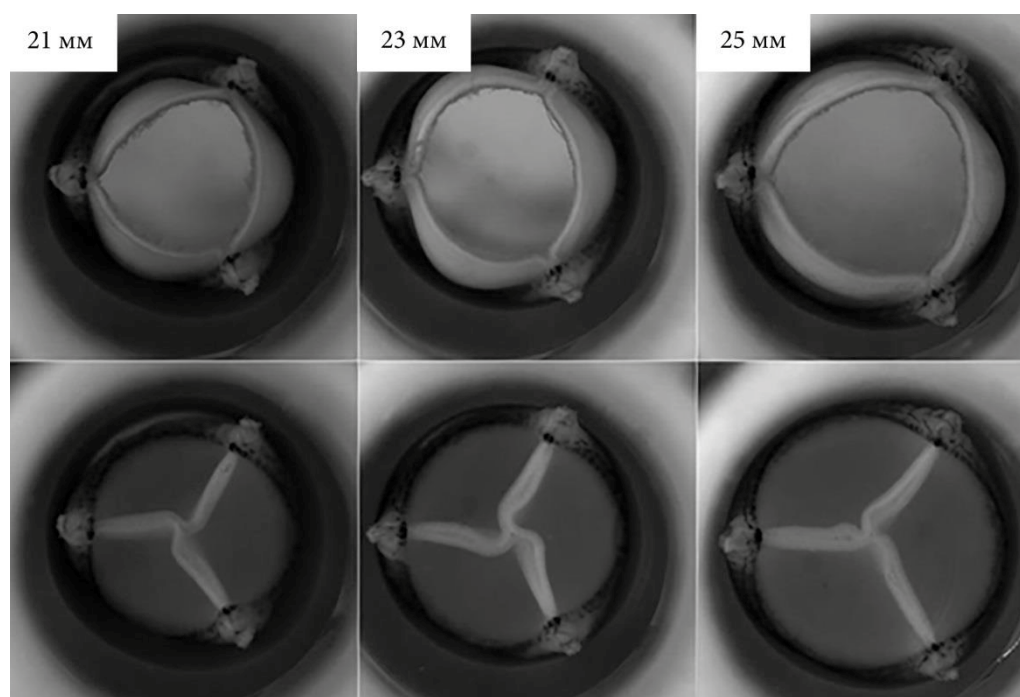


Рисунок 4. Качественная оценка работы створчатого аппарата исследуемых протезов – 21, 23, 25 типоразмеров, в полностью закрытом и полностью открытом состояниях

затель надежности работы биопротеза, приводя к раннему выходу из строя всего изделия и необходимости проведения повторного вмешательства [16]. Помимо структурной дегенерации материала створок вследствие длительного циклического разрушения, возникающие участки высокого напряжения существенно ускоряют кальцификацию биоматериала – основную причину дисфункции подобных устройств [17]. Стоит отметить, что описанный эффект «закручивания» будет лишь усугубляться с течением времени вследствие тех же процессов, возникающих в материале, – растяжения в процессе длительной нагрузки. Тем не менее, клиническая практика использования (начиная с 2011 г.) протезов «ЮниЛайн» позволяет судить о достаточном запасе усталостной прочности биоматериала, применяемого в конструкции исследуемых протезов [5, 18].

Перспективным направлением дальнейших исследований будет являться сопряженный анализ твердотельного моделирования и моделирования потоков (Fluid-Structure Interaction, FSI). Подход сочетает в себе гидродинамическую оценку работы протеза его элементов и реакцию «твёрдого тела» в ответ на изменения потока. Такой комплексный подход к виртуальному проек-

тированию и оценке влияния модификаций того или иного элемента биопротеза на его функцию и безопасность позволит выработать наиболее эффективные варианты оптимизации конструкции [19].

Заключение

Биопротезы «ЮниЛайн», предназначенные для аортальной позиции, демонстрируют удовлетворительные гидродинамические *in vitro* показатели, сопоставимые с существующими мировыми аналогами, в то же время, существующая конструкция биопротеза обладает потенциалом углубленной оптимизации створчатого аппарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия – 2015. Болезни и врожденные anomalies системы кровообращения. М.: НЦС-СХ им. А.Н. Бакулева; 2016.

Bokeria L.A., Gudkova R.G. Cardiovascular surgery - 2015. Diseases and congenital anomalies of the circulatory system. М.: NTSSSH them. A.N.

Bakuleva; 2016. [In Russ].

2. Vesey J.M., Otto C.M. Complications of prosthetic heart valves. *Curr Cardiol Rep.* 2004; 6(2):106-11. PMID: 14759353.

3. Seiler C. Management and follow up of prosthetic heart valves. *Heart.* 2004; 90(7):818-824. doi:10.1136/hrt.2003.025049.

4. Кудрявцева Ю.А., Насонова М.В., Глушкова Т.В., Акентьева Т.Н., Бурого А.Ю. Сравнительный анализ биоматериала, потенциально пригодного для создания протеза аортального клапана сердца для транскатетерной имплантации. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* 2013; 120(50): 66-69.

Kudryavtseva Y. A., Nasonova M. V., Glushkova T. V., Akentieva T. N., Burago A. Yu. Comparative analysis of the biological material potentially suitable for the creation of the aortic heart valve prosthesis for transcatheter implantation. *Siberian Medical Journal (Irkutsk).* 2013; 120(50): 66-69. [in Russ].

5. Караськов А.М., Журавлева И.Ю., Астапов Д.А., Стасев А.Н., Демидов Д.П., Одаренко Ю.Н., Барбараш Л.С. Клинико-гемодинамические результаты применения биопротезов «ЮниЛайн» в аортальной позиции. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия.* 2014; 7(4): 87-91.

Karaskov A.M., Zhuravleva I.Yu., Astapov D.A., Stasev A.N., Demidov D.P., Odarenko Yu.N., Barbarash L.S. Clinico-hemodynamic results of using bioprostheses uniline in the aortic position. *Cardiology and cardiovascular surgery.* 2014; 7(4): 87-91. [In Russ].

6. Журавлева И.Ю., Кудрявцева Ю.А., Климов И.А., Барбараш Л.С. Сравнительная оценка сшивающей активности новых консервантов из класса эпоксисоединений. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2007; 9(2): 44-48.

Zhuravleva I.Yu., Kudryavtseva Yu.A., Klimov I.A., Barbarash L.S. Comparative evaluation of the crosslinking activity of new preservatives from the class of epoxy compounds. *Bulletin of transplantology and artificial organs.* 2007; 9(2): 44-48. [In Russ].

7. Бокерия Л.А., Николаев Д.А., Божедомова Е.П., Фадеев А.А. Влияние методики расчета на in vitro оценку эффективной площади проходного отверстия протезов клапанов сердца. *Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН сердечно-сосудистые заболевания.* 2013; 14(2): 21-26.

Bokeria L.A., Nikolaev D.A., Bozhedomova E.P., Fadeev A.A. Influence of the in vitro calculation technique on the evaluation of the effective area of the opening of the prosthesis of the heart valves. *Bulletin of the Center A.N. Bakulev RAMS cardiovascular diseases.* 2013; 14 (2): 21-26. [In Russ].

8. Клышников К.Ю., Овчаренко Е.А., Мальцев Д.А., Журавлева И.Ю. Сравнительная характеристика гидродинамических показателей биопротезов клапанов сердца «ЮниЛайн» и «ПериКор». *Клиническая физиология кровообращения.* 2013; 1: 45-51.

Klyshnikov K.U., Ovcharenko EA, Maltsev DA, Zhuravleva I.Yu. Comparative characteristics of the hydrodynamic parameters of the bioprosthetic valves of the heart valves «UniLine» and «PeriCor». *Clinical physiology of blood circulation.* 2013; 1: 45-51. [In Russ].

9. Орловский П.П., Гриценко В.В., Юхнев А.Д. и др. Искусственные клапаны сердца. Гидродинамика искусственных клапанов сердца. М.: 2007.

Orlovsky P.P., Gritsenko V.V., Yukhnev A.D. Artificial heart valves. *Hydrodynamics of artificial heart valves.* М.: 2007.[In Russ].

10. Овчаренко Е.А., Клышников К.Ю., Саврасов Г.В., Глушкова Т.В., Барбараш Л.С. Исследование гидродинамической функции малоинвазивного биопротеза клапана аорты. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2016; 5(2): 39-45.

Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.Yu., Savrasov G.V., Glushkova T.V., Barbarash L.S. Investigation of the hydrodynamic function of a minimally invasive aortic valve bioprosthesis. *Complex problems of cardiovascular diseases.* 2016; 5(2): 39-45. [In Russ].

11. Marquez S, Hon RT, Yoganathan AP. Comparative hydrodynamic evaluation of bioprosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2001; 10(6):802-11.

12. Martin C., Sun W. Fatigue damage of collagenous tissues: experiment, modeling and simulation studies. *J Long Term Eff Med Implants.* 2015; 25(1-2):55-73.

13. Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.Y., Glushkova T.V., Kudryavtseva Y.A., Nyshtayev D.V., Savrasov G.V. Xenopericardial graft selection for valve apparatus of transcatheter heart valve bioprosthesis. *Biomedical Engineering.* 2016; 49(5): 1-5.

14. Овчаренко Е.А., Клышников К.Ю., Глуш-

кова Т.В., Нуштаев Д.В., Кудрявцева Ю.А., Саврасов Г.В. Выбор ксеноперикардального лоскута для створчатого аппарата транскатетерных биопротезов клапанов сердца. Медицинская техника. 2015; 5: 1-4.

Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.U., Glushkova T.V., Nushtaev D.V., Kudryavtseva Y. A., Savrasov G.V. The choosing of the xenopericardial patch for transcatheter heart valve. Medical equipment. 2015; 5: 1-4. [in Russ]

15. Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.Yu., Glushkova T.V., Nyshtaev D.V., Kudryavtseva Yu.A., Savrasov G.V. Xenopericardial Graft Selection for Valve Apparatus of Transcatheter Heart Valve Bioprosthesis. Biomedical Engineering. 2016; 49(5): 253-257. doi: 10.1007/s10527-016-9543-0.

16. Martin C., Sun W. Simulation of long-term fatigue damage in bioprosthetic heart valves: effects of leaflet and stent elastic properties. Biomechanics and modeling in mechanobiology. 2014; 13(4):759-770. doi:10.1007/s10237-013-0532-x.

17. Balachandran K., Sucosky P., Jo H.,

Для корреспонденции:

Клышников Кирилл Юрьевич

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7 (923) 516-68-66,

E-mail: klyshnikovK@gmail.com

Yoganathan A. P. Elevated Cyclic Stretch Induces Aortic Valve Calcification in a Bone Morphogenic Protein-Dependent Manner. The American Journal of Pathology. 2010; 177(1):49-57.

18. Караськов А.М., Железнев С.И., Рогулина Н.В., Сапегин А.В., Одаренко Ю.Н., Левадин Ю.В. и др.. Отечественный биологический протез нового поколения «ЮниЛайн» в хирургии митрального порока: первый опыт. Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2017; 59(2): 98-104.

Karas'kov A.M., Zheleznev S.I., Rogulina N.V., Sapegin A.V., Odarenko Yu.N., Levadin Yu.V. et al. Domestic biological prosthesis of the new generation «UniLine» in surgery for mitral malformation: the first experience. Thoracic and cardiovascular surgery. 2017; 59(2): 98-104. [In Russ].

19. Borazjani I. A review of fluid-structure interaction simulations of prosthetic heart valves. J Long Term Eff Med Implants. 2015; 25(1-2):75-93. PMID: 25955008.

Статья поступила 09.06.2017.

For correspondence:

Klyshnikov Kirill

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

Tel. +7 (923) 516-68-66,

E-mail: klyshnikovK@gmail.com

МОДИФИКАЦИЯ RGD-ПЕПТИДАМИ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА: РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

**В. Г. МАТВЕЕВА, Л. В. АНТОНОВА, В. В. СЕВОСТЬЯНОВА, Е. А. ВЕЛИКАНОВА,
Е. О. КРИВКИНА, Т. В. ГЛУШКОВА, Ю. И. ХОДЫРЕВСКАЯ,
О. Л. БАРБАРАШ, Л. С. БАРБАРАШ**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

Резюме. Для придания поверхности полимерных сосудистых графтов функциональной активности использованы RGD-пептиды, являющиеся сайтами связывания с интегриновыми рецепторами клеток.

Цель исследования. Изучить влияние модификации RGD-пептидами сосудистых графтов малого диаметра из поликапролактона на проходимость, скорость и качество эндотелизации внутренней поверхности после имплантации графтов в брюшную часть аорты мелких лабораторных животных.

Материалы и методы. Графты диаметром 2 мм были изготовлены методом электроспиннинга из поликапролактона (PCL графты). Поверхность графтов была модифицирована RGD-пептидами посредством карбодиимидного связывания (PCL-RGD графты). До имплантации исследована морфология поверхности, физико-механические и вязкоэластические свойства PCL и PCL-RGD графтов. PCL (n=16) и PCL-RGD графты (n=16) имплантировали в брюшную аорту крыс на 1, 3, 6, 9 месяцев, с последующим изучением гистологической и иммунофлуоресцентной картины.

Результаты. Морфология поверхности и вязкоэластические свойства PCL и PCL-RGD графтов не имели существенных различий. Проподимость PCL-RGD графтов на всех сроках имплантации была на 50% выше по сравнению с PCL, а частота развития гранулематозного воспаления - в среднем, в 2 раза меньше. Присутствие на внутренней поверхности PCL-RGD графтов эндотелиальных клеток с фенотипом CD31+vWF+ зарегистрировано уже через 1 месяц имплантации, на PCL-графтах - через 3 месяца.

Заключение. Модификация PCL-графтов RGD-пептидами способствовала повышению проходимости графтов, более ранней эндотелизации внутренней поверхности, а также снижению выраженности гранулематозного воспаления.

Ключевые слова: сосудистые графты, модификация, RGD-пептиды.

MODIFICATION BY RGD-PEPTIDES OF VASCULAR GRAFTS OF SMALL DIAMETER FROM POLYCAPROLACTONE: EXPERIMENTAL STUDY RESULTS

**V. G. MATVEEVA, L. V. ANTONOVA, V. V. SEVOSTYANOVA, E. A. VELIKANOVA,
E. O. KRIVKINA, T. B. GLUSHKOVA, YU. I. KHODYREVSKAYA,
O. L. BARBARASH, L. S. BARBARASH**

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia.

Abstract. To endow the luminal surface of the vascular grafts of functional, we applied arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-containing peptides, which are the ligands for integrins.

The aim to study the effect of modification of small-diameter vascular grafts from polycaprolactone on the patency, speed and quality of endothelization of the internal surface after implantation of grafts into the abdominal part of the aorta of small laboratory animals by the RGD peptides.

Materials and methods. Vascular grafts diameter 2 mm were fabricated of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) using electrospinning following optional conjugation with RGD peptides by the method of carbodiimide binding. The surface morphology, physical-mechanical properties of PCL and PCL-RGD grafts was studied before implantation. Either PCL and PCL-RGD grafts were implanted into abdominal aorta of rats for 1, 3, 6, or 9 months following explantation along with the adjacent aortic regions and further histological and immunofluorescence examination.

Results. We found that immobilization of RGD peptides at the luminal surface did not alter structure and

mechanical properties of PCL grafts. Primary patency of the RGD-treated grafts was 50% higher while the prevalence of inflammation was 2-fold lower compared to PCL grafts at all the time points. Moreover, we identified CD31+vWF+ cells at the luminal surface of RGD-PCL grafts as early as 1 month postimplantation in comparison with 3 months postimplantation in PCL grafts.

Conclusion. Immobilization of RGD peptides at the PCL grafts increases the primary grafts patency, induces rapid endothelialization and decreases granulomatous inflammation.

Key words: vascular grafts, modification, RGD-peptides.

Введение

В настоящее время не существует идеального решения проблемы дефицита подходящих аутологичных кровеносных сосудов малого диаметра (<6мм), предназначенных для проведения операций по восстановлению кровотока в ишемизированных органах и тканях. Ведется активный поиск вариантов использования различных полимеров для создания протезов сосудов малого диаметра [1]. Однако почти все полимерные материалы, применяемые для создания искусственных сосудов, несут тромбогенный потенциал.

Наиболее предпочтительным и физиологичным вариантом повышения биосовместимости поверхности сердечно-сосудистых имплантатов является ее эндотелизация, обеспечивающая защиту от тромбообразования и гиперплазии неointимы [2]. Эндотелизацию графтов возможно проводить *in vitro*, однако данный подход высокотехнологичный и требует много времени, поэтому его использование будет ограничено плановыми вмешательствами [3]. Для экстренной сердечно-сосудистой хирургии весьма перспективно применение биофункционализированных материалов, способных к быстрой спонтанной эндотелизации *in situ* [3].

Придание искусственной поверхности свойств внеклеточного матрикса (ECM) благодаря иммобилизации белков, являющихся сайтами для связывания с интегриновыми рецепторами клеток, позволяет улучшить клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию и выживание клеток. В структуре большинства белков ECM присутствует пептидная последовательность аргинин – глицин – аспарагиновая кислота (RGD), которая определяет адгезионные свойства белков и представляет собой сайты клеточной адгезии. На мембране эндотелиальных и эндотелиальных прогениторных клеток (EC/EPC) широко представлены интегрины $\alpha v \beta 3$ и $\alpha 5 \beta 1$, являющиеся рецепторами для RGD-последовательности [4]. Иммобилизация RGD-пептидов на поверхности полимера позволит создать сайты адгезии эндо-

телиальных клеток, повысить тромборезистентность и биосовместимость материала.

Ранее мы показали успешность конъюгирования RGD-пептидов с поверхностью графтов на основе поликапролактона (poly(ϵ -caprolactone), PCL) через карбодиимид, который известен как метод химического перекрестного связывания нулевой длины [5]. Кроме того, в эксперименте *in vitro* доказано положительное влияние RGD-модификации на клеточную интеграцию [6].

Цель исследования

Изучение влияния модификации RGD-пептидами сосудистых графтов малого диаметра из поликапролактона на проходимость, скорость и качество эндотелизации внутренней поверхности после имплантации графтов в брюшную часть аорты мелких лабораторных животных.

Материалы и методы

Изготовление сосудистых графтов из PCL

PCL графты диаметром 2 мм изготавливали на аппарате электроспиннинга Nanon-01A (MECC, Япония) из 14% раствора PCL (Sigma–Aldrich) в хлороформе при напряжении 15 kV, скорости подачи раствора 0,5 мл/ч, расстоянии до коллектора 150 мм, с использованием иглы 22G.

Модификация PCL графтов RGD-пептидами

С целью активации полимерных поверхностей графты обрабатывали 10% этилендиаминном (ЭДА) в 2-пропаноле [7], промывали 0,3% Tween-20 и высушивали. Конъюгирование полимера с RGD-пептидами выполнено с помощью линкерного раствора карбодиимида. Синтез RGD-содержащей биомолекулы (лауриновая кислота-глицин-аргинин-глицин-аспарагиновая кислота-глицин-аминокапроновая кислота (LA-GRGDG-AHex) выполнен по методу, описанному ранее Sedaghati с соавт. [8]. RGD-пептиды были растворены до концентрации 0,2 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 0,05% Tween-20. Для конъюгации полимера с

RGD-пептидами графты обрабатывали линкерным раствором, промывали ФСБ и далее инкубировали с раствором RGD-пептидов, после этого полученные PCL-RGD графты промывали и высушивали.

Изучение морфологии графтов

Морфологию поверхности PCL и PCL-RGD графтов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Япония). Предварительно осуществляли золото-палладиевое напыление образцов размером 0,5×0,5 см. Размер волокон и пор, а также пористость материала определяли по полученным изображениям с использованием программы ImageJ. Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение (mean (SD)).

Оценка физико-механических свойств

Вырубку образцов осуществляли в продольном направлении сосудистого сегмента. В каждой группе было испытано по 6 образцов.

Прочность и упруго-деформативные свойства полимерных графтов PCL и PCL-RGD оценивали в условиях одноосного растяжения образцов на универсальной испытательной машине (Zwick/Roell, Германия). Прочность материала оценивали по максимальному напряжению при растяжении (МПа). Эластичность и жесткость материала оценивали по относительному удлинению, скорректированному с учетом характера разрушения образцов (%), и модулю Юнга (МПа) соответственно. Модуль Юнга определяли в качестве касательной к кривой растяжения в области малых деформаций (0-5 % по оси абсцисс) для каждой группы, где выполнялся закон Гука, т.е. наблюдалась линейная зависимость напряжения от удлинения. Контролем служили подкожная вена нижней конечности и внутренняя грудная артерия (n = 6 для каждой контрольной группы), полученные от пациентов, подвергшихся аортокоронарному шунтированию после подписания ими информированного согласия. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом.

Измерение COMPLAINTности графтов проводили на оригинальной установке артериального пульсирующего потока крови с замкнутой системой циркуляции. Для перфузии в установке применяли гепаринизированную цельную кровь, смешанную с физиологическим раствором в соотношении 2:1. Участки PCL и PCL-RGD графтов длиной 50 мм (n = 6) подсоединяли по одно-

му к установке и погружали в ванну с 0,9% NaCl. Измерение растяжения стенки графтов проводили цветным дуплексным сканированием (Picus, Pie Medical Systems, США). Растяжение стенки рассчитывали, исходя из диаметров просвета каждого сегмента в конце систолы и диастолы. Использовали параметры пульсового давления 30, 60, 90 мм рт.ст.

Комплаентность (C) рассчитывали по формуле:

$$C (\%/\text{мм.рт.ст} \times 10^{-2}) = ((Ds - Dd) / Dd \times 104) / (Ps - Pd),$$

где P, D, s и d – давление, диаметр, систола и диастола соответственно.

Имплантация графтов в брюшную аорту крыс

Графты PCL (n=16) и PCL-RGD (n=16) имплантировали 6-месячным самцам крысам Wistar массой 400-450 г. Процедуры осуществляли в соответствии с требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986). Животных вводили в наркоз изофлураном. Графты с внутренним диаметром 2 мм и длиной 10 мм, стерилизованные этиленоксидом, имплантировали в брюшную часть аорты крыс ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации. Крыс с имплантированными графтами выводили из эксперимента через 1, 3, 6 и 9 месяцев (n=4 в каждой группе). Графты выделяли с участками прилегающей аорты.

Гистологическое исследование

Образцы, фиксированные в формалине, дегидратировали в изопропанол, заключали в парафин (Electron Microscopy Sciences) и изготавливали поперечные срезы толщиной 5 мкм. После депарафинизации окрашивали раствором гематоксилина Харриса и 1% раствора эозина Y. Препараты изучали на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Иммунофлуоресцентное исследование

Из замороженных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм и наносили на стекла, покрытые L-полилизин. Блокировку неспецифического связывания проводили бычьим сывороточным альбумином (Sigma-Aldrich, США) в ФСБ. На срезы наносили смесь неконъюгированных первичных антител к CD31 (ab119339, Abcam, Англия) и CD34 крысы (ab185732), или антитела к коллагену I (ab28028) и коллагену IV крысы (ab6586), или антитела к фактору фон Виллебранда (vWF), конъюгированные с FITC (ab8822) и инкубировали при температуре +4°C в течение ночи. Срезы с неконъюгированны-

ми первичными антителами инкубировали со смесью соответствующих вторичных антител конъюгированные с красителями AlexaFluor 568 (ab175473) и AlexaFluor 488 (ab150105), и докрашивали ядерным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США). Готовые срезы заключали под стекло и анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ

Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Для нормального распределения данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Данные, имеющие распределение, отличное от нормального, представлены в виде медианы (М) и 25 и 75% процентилей. Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни, достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

Графты изготавливали методом электроспиннинга, что позволяет имитировать архитектуру естественного внеклеточного матрикса и добиваться высокого отношения площади поверхности к объему [9]. При проведении сканирующей электронной микроскопии выявлено, что графты PCL и PCL-RGD обладали однородной, высокопористой структурой, образованной хаотично расположенными изогнутыми нитями (рис. 1 а, б). Пористость PCL и PCL-RGD образцов не различалась и определялась в пределах 50% (49,7 и 49,08%, соответственно). Однако средний диаметр волокон в модифицированных графтах повышался (PCL 2,03 (0,69) μm , PCL-RGD 2,46 (1,13) μm , $p < 0,05$), при этом достоверного изменения площади пор не отмечалось (mean (SD) PCL 23,59 (26,8), PCL-RGD 34,25 (47,75) μm^2) (рис. 2).

В отличие от немодифицированных образцов матриксы, конъюгированные с RGD-пептидами, имели выпуклости на нитях полимера, хорошо заметные при большом увеличении (рис. 1 в).



Рисунок 1. СЭМ внутренней поверхности полимерных графтов: А. PCL (ув. $\times 1000$); Б. PCL-RGD (ув. $\times 1000$); В. PCL-RGD (ув. $\times 2500$)

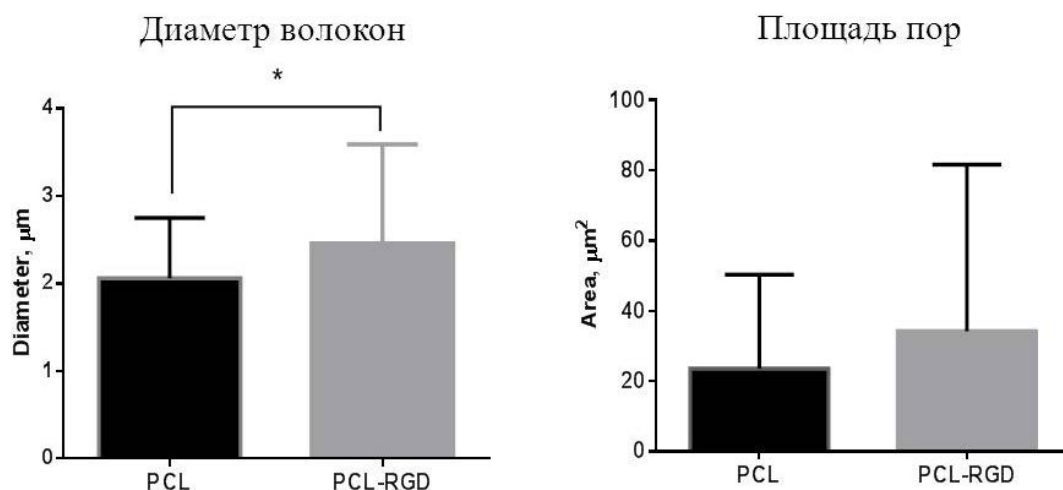


Рисунок 2. Диаметр волокон и площадь пор PCL и PCL-RGD графтов (mean(SD))

Данные неровности, предположительно, представляют собой иммобилизованные на поверхности RGD-биомолекулы. Таким образом, иммобилизация RGD-пептидов на графтах из PCL повышает толщину волокон, но существенно не изменяет пористость.

Изучение физико-механических свойств показало, что внутренняя грудная артерия (А.Маммариа), являющаяся «золотым» стандартом при операциях АКШ, имеет значительные

отличия по прочностным и упруго-деформативным свойствам от подкожной вены нижних конечностей (V.Saphena), которая также применяется при данном виде операций. Артерии значительно менее прочны и растяжимы, чем вены ($p<0,03$).

По прочности PCL графты превосходят А.Маммариа, однако уступают V.Saphena ($p<0,05$) (рис. 3, табл. 1). PCL графты более растяжимы по сравнению с нативными сосудами, при

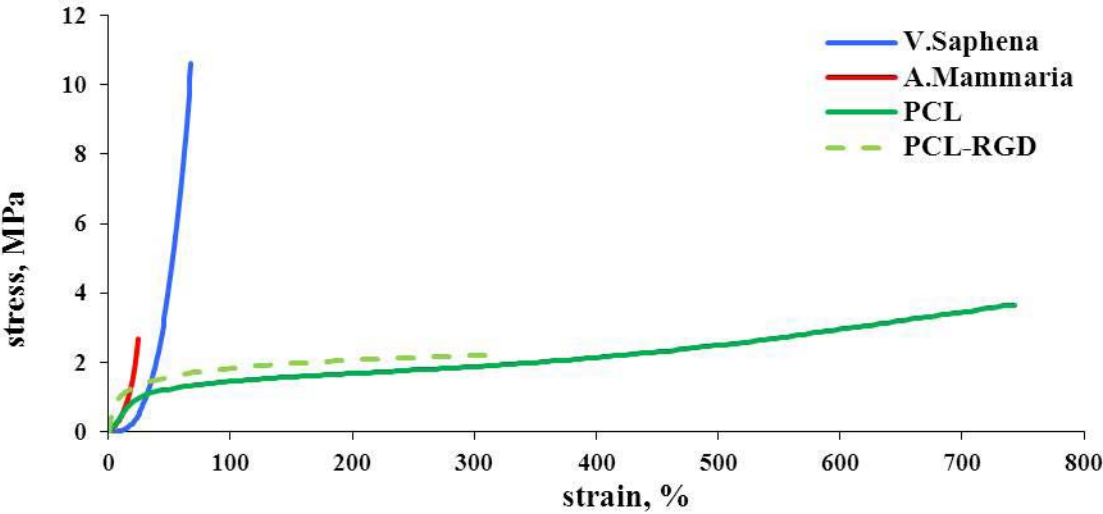


Рисунок 3. Механические свойства исследуемого материала, зависимость напряжения от удлинения

этом они обладают большей жесткостью. Модификация PCL графтов RGD-пептидами снижала прочность образцов, делая их схожими с А.Маммариа. Снижение гиперэластичности (относительного удлинения ($p<0,05$)) модифицированных RGD-пептидами PCL графтов также является положительным моментом. Однако мо-

дификация способствовала повышению жесткости полимерных каркасов ($p<0,05$).

Комплаентность представляет собой изменение объема структуры по отношению к изменению давления. Изучена комплаентность при различных показателях пульсового давления –

Таблица 1.

Механические свойства PCL, PCL-RGD графтов и нативных сосудов

Вид материала	Прочность, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга (Емод), МПа
A.Mammaria	2,48 (1,09-3,25)	29,86 (25,50-41,60)	2,34 (1,53-2,95)
V.Saphena	10,03 (7,83-12,13)*	76,9 (62,80-83,90)*	1,26 (0,84-1,75)
PCL	3,72 (3,35-4,51) */**	779,92 (743,35-802,31) */**	4,025 (3,52-5,71) */**
PCL-RGD	2,16 (1,76-2,56) **/#	318,04 (189,88-347,10) * **/#	16,2 (12,80-16,90) */**/#

Примечание: * – $p<0,03$ различия с показателями А.Маммариа, ** – $p<0,03$ различия с V.Saphena, # – $p<0,05$ различия с показателями PCL графтов

низких (30 мм рт.ст), средних (60 мм рт.ст) и высоких (90 мм рт.ст). При низких показателях пуль-

сового давления комплаентность артерий ниже, чем вен, но выше комплаентности графтов (табл.

2). При среднем пульсовом давлении различия между венами, артериями и графтами уменьшались, а при высоком – нивелировались. В то же время комплаентность PCL, PCL-RGD графтов не различалась, что свидетельствовало об отсутствии влияния модификации RGD-пептидами на

вязко-эластические свойства графтов.

Таким образом, иммобилизация RGD-пептидов приводит к позитивным и негативным изменениям механических свойств сосудистых графтов из PCL, однако не оказывает влияния на комплаентность.

Таблица 2.

Комплаентность (%/мм.рт.ст.*10-2) PCL, PCL-RGD графтов и нативных сосудов

Вид материала	С при 30 мм рт.ст.	С при 60 мм рт.ст.	С при 90 мм рт.ст.
A.Mammaria	18,3±12,8	8,9±7,3	3,5±1,1
V.Saphena	24,2±13,1	3,4±0,9	2,1±1,0
PCL	6,1±5,2	4,7±3,6	2,8±2,1
PCL-RGD	6,4±5,5	4,2±3,1	3,2±1,2

Для оценки влияния RGD-пептидов на проходимость графтов, эндотелизацию и процесс формирования сосудистой стенки использовали экспериментальную модель с протезированием брюшной аорты крысы [10]. В опытной и контрольной группах не отмечено смерти крыс от раннего тромбоза: животные дожили до положенного срока выведения из эксперимента, а имплантированные графты оставались проходимы.

Через 1 месяц имплантации внутренний просвет 100% PCL-RGD графтов оставался полностью проходим, тогда как в просвете 50% немодифицированных графтов выявлены пристеночные тромбы, перекрывавшие большую часть просвета графтов (рис. 4, табл. 3). В стенке

половины немодифицированных графтов вне зависимости от наличия или отсутствия в просвете пристеночного тромба выявлено воспаление по типу гранулематозного: большое количество гигантских многоядерных клеток инородного тела, макрофаги, фибробласты. В проходимых немодифицированных графтах на внутренней поверхности формировалась тонкая неоинтима в форме полулуния. Эндотелиоподобные клетки расположены на неоинтима единично и в группах. Клеточность стенок графтов умеренная, более выраженная в наружных 2/3. Гранулематозного воспаления не выявлено. В немодифицированных графтах с тромбом неоинтима отсутствовала.

Таблица 3.

Относительное количество проходимых графтов в группах на различных сроках имплантации

Вид графта	% проходимых графтов			
	1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.
PCL	50	25	50	50
PCL-RGD	100	75	100	100

Через 3 месяца имплантации пристеночные тромбы обнаружены в 75% PCL и 25% PCL-RGD графтах (рис. 4, табл. 3). На фоне наличия тромба в просвете графтов неоинтима и эндотелиальный слой не формировались. В проходимых графтах на внутренней поверхности сформирована тонкая неоинтимальная выстилка, покрытая непрерывным слоем вытянутых эндотелиоподобных клеток в модифицированных графтах и группами клеток в немодифицированных. Вне зависимости от наличия или отсутствия тромба в просвете графтов гранулематозное воспаление

в стенке отмечено в 50% PCL и 25% PCL-RGD графтов.

Спустя 6 месяцев имплантации просвет 50% PCL графтов и 100% PCL-RGD графтов был свободен от тромбов, выстлан тонкой неоинтимой, покрытой монослоем эндотелиальных клеток, в модифицированных графтах и прерывистым слоем – в немодифицированных (рис. 4, табл. 3). Соответственно большая часть просвета 50% PCL – графтов была занята пристеночным реканализированным тромбом. Клеточность стенок 75% PCL графтов очень высокая за счет грануле-

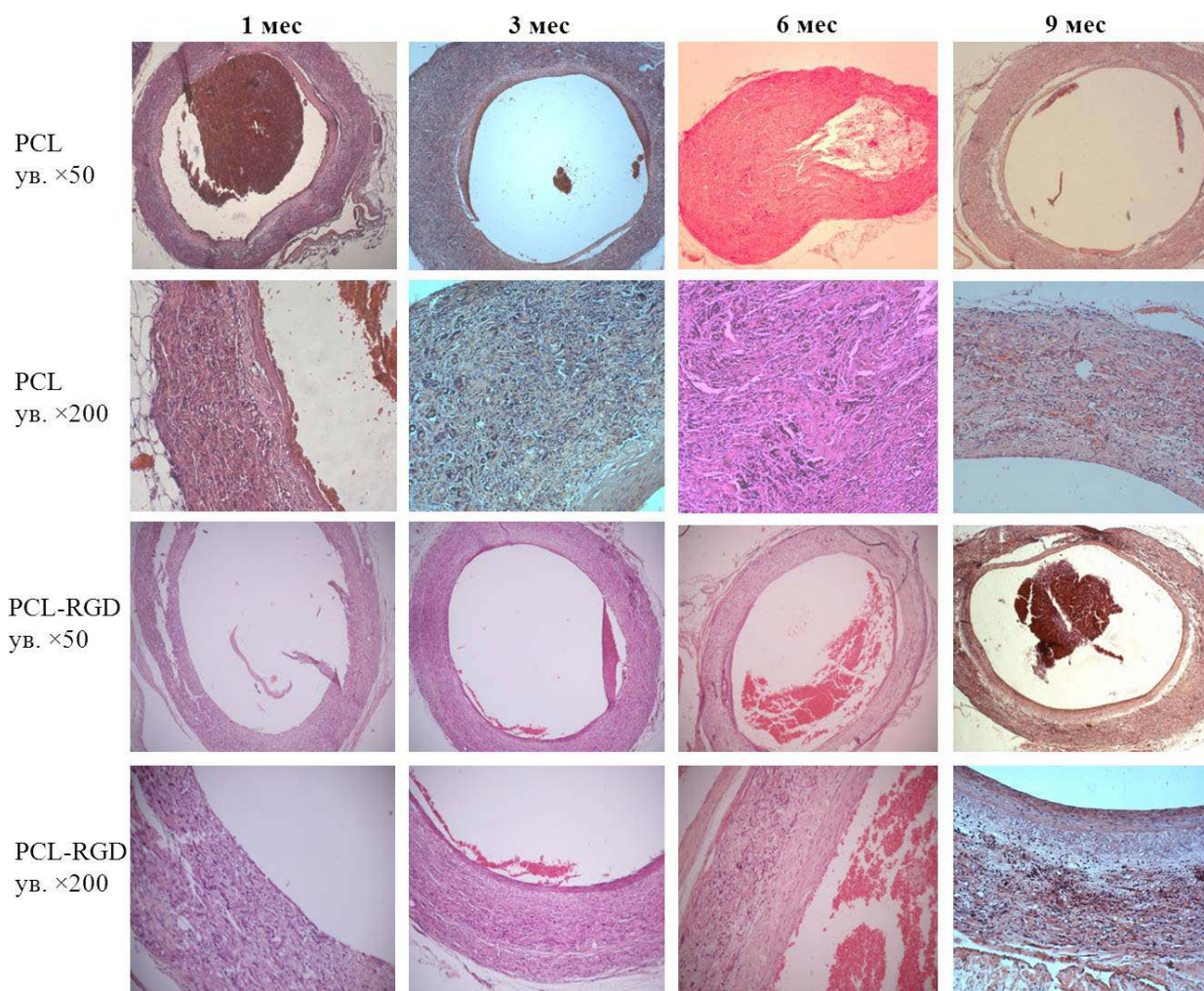


Рисунок 4. Результаты гистологического исследования эксплантированных PCL и PCL-RGD графтов: окраска гематоксилин-эозин

матозного воспаления, которое в 25% привело к выраженной гипертрофии стенки графта. В PCL-RGD графтах гранулематозного воспаления не выявлено: стенка графтов равномерно заселена клетками, представленными фибробластами, макрофагами и единичными гигантскими многоядерными клетками инородного тела.

Через 9 месяцев имплантации 50% PCL графтов были полностью проходимы, на внутренней поверхности отмечено формирование тонкой неоинтимы, покрытой слоем эндотелиоподобных клеток (рис. 4, табл. 3). В оставшейся половине PCL графтов обнаружены пристеночные организованные реканализированные тромбы, практически полностью перекрывавшие просвет данных графтов. Через 9 месяцев имплантации проходимость PCL-RGD графтов по-прежнему составила 100%. Внутренняя поверхность графтов выстлана тонкой неоинтимой, покрытой

слоем эндотелиоподобных клеток. Клеточные элементы в стенке немодифицированных и модифицированных графтов распределены равномерно и представлены фибробластами, макрофагами и единичными клетками инородных тел. Гранулематозного воспаления не выявлено.

Пройодимость модифицированных RGD-пептидами графтов на всех сроках имплантации была в среднем на 50% выше по сравнению с немодифицированными, а частота развития гранулематозного воспаления в среднем в 2 раза меньше.

Для подтверждения эндотелиальной дифференцировки выстилающих внутреннюю поверхность графтов клеток и выяснения природы их источника было проведено флуоресцентное окрашивание поверхностных рецепторов CD34 и CD31. Выбор данных маркеров связан с тем, что на мембране циркулирующих в перифериче-

ской крови EPC присутствует CD34, после адгезии EPC и в процессе дифференцировки в зрелые эндотелиальные клетки экспрессия CD34 снижается и исчезает, параллельно с этим процессом появляется и повышается экспрессия рецепторов CD31 [11]. В исследовании CD31 являлся маркером эндотелиальных клеток на внутренней стенке имплантированных графтов, сочетание CD31 с CD34 выявляло степень зрелости EPC, докраска ядер клеток DAPI позволяла исключить из анализа тромбоциты. Проанализированы все участки имплантированных сосуди-

стых графтов, однако представлены результаты окраски средней части (средняя относительно анастомозов), поскольку именно этот участок характеризует привлечение EPC из кровотока и менее подвержен трансмиграции эндотелиальных клеток из зоны анастомозов (рис. 5).

В просвете средней части PCL графтов спустя 1 месяц имплантации зарегистрированы клетки с высокой экспрессией CD34 и слабой CD31, что характерно для начальной дифференцировки EPC в эндотелиальные клетки (рис. 5 А). В этот же срок имплантации внутренняя стенка

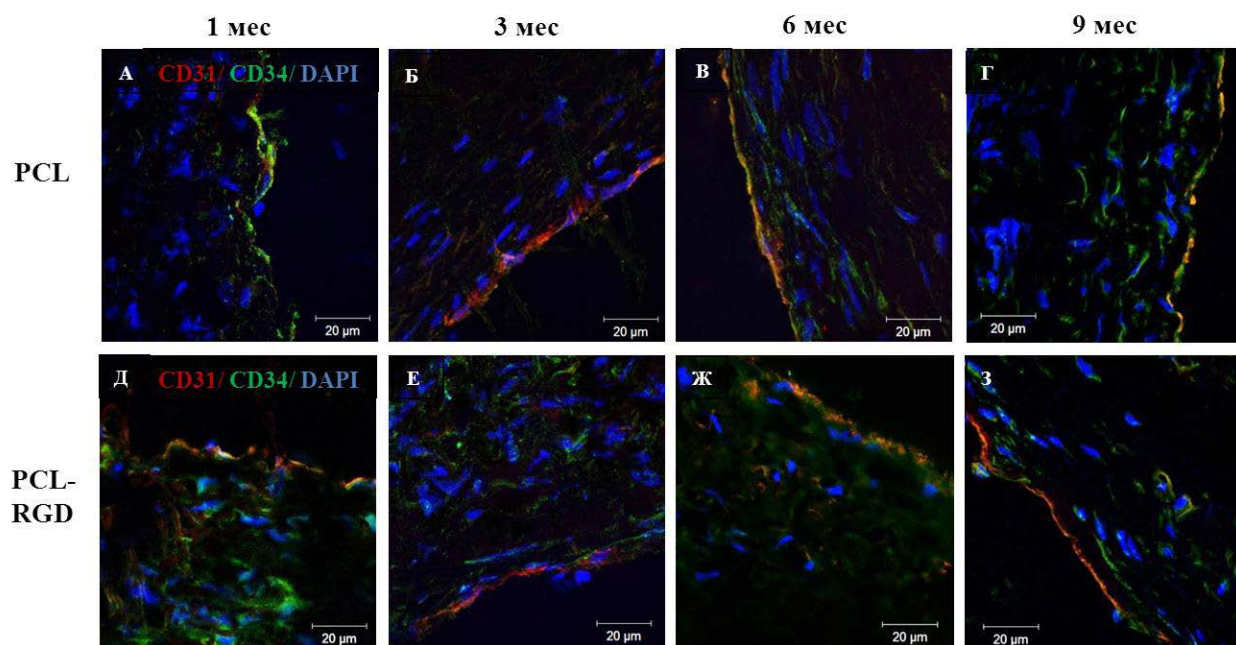


Рисунок 5. Фотографии срезов проходимых сосудистых графтов различных сроков имплантации. В данном рисунке и далее PCL-графты (А-Г); PCL-RGD-графты (Д-З). Окраска CD31 красная, CD34 зеленая, ядра синие (ув. ×630)

PCL-RGD графтов выстлана клетками с умеренной экспрессией CD31 и CD34, характерной для более зрелых эндотелиальных клеток (рис. 5 Д). Через 3, 6, 9 месяцев имплантации в просвете проходимых PCL и PCL-RGD графтов определяли клетки CD31+, соответствующие зрелым эндотелиальным (рис. 5 Б-Г, Е-З).

В случае наличия тромба в просвете графтов на любых сроках имплантации клетки CD34+ и CD31+ отсутствовали на поверхности графтов, но выявлены в реканализированных участках тромба. Эндотелиальные клетки участвуют в гемостазе и постоянно синтезируют фактор фон Виллебранда (vWF), поэтому присутствие vWF является не только маркером эндотелиальных клеток на поверхности графтов, но и их функци-

ональной активности. На всех сроках имплантации в просвете графтов визуализировался vWF (рис. 6), что свидетельствует об удовлетворительной функциональности выстилающего просвет эндотелиального слоя.

Коллаген IV типа является важным компонентом базальной мембраны сосудов и определяет адгезию эндотелиоцитов, их подвижность и стабилизацию. Во всех имплантированных на различные сроки PCL и PCL-RGD графтов на внутренней поверхности присутствовал коллаген IV типа, который располагался достаточно равномерно (рис. 7). Значимых визуальных отличий в группах на разных сроках не зарегистрировано.

Коллаген I типа составляет основу соединительной ткани. В аорте располагается преиму-

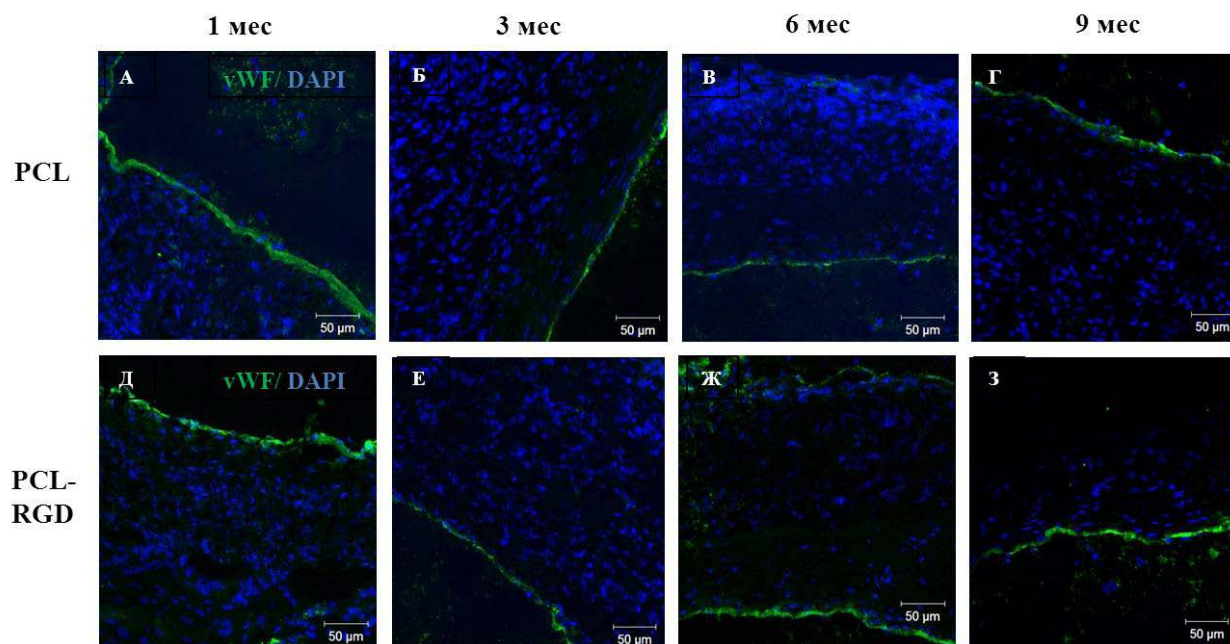


Рисунок 6. Фотографии срезов проходимых сосудистых графтов различных сроков имплантации. vWF зеленая окраска, ядра синие (ув. $\times 200$)

щественно в адвентиции, но некоторое количество присутствует в меди и интимае [12], (рис. 7 И). В эксплантированных графтах коллаген I типа слабо и непостоянно представлен в срединной части, при этом в данном спектре отмечена умеренная автофлуоресценция самого матрикса (рис. 7 Б, В, Е, Ж). Коллаген I типа присутствовал в адвентиции всех графтов.

Обсуждение

Для иммобилизации различных пептидов к поверхности полимеров используют агрессивные химические реагенты, которые могут существенно повлиять на структуру и физико-механические свойства полимерного волокна. Выбранный метод карбодиимидного связывания для модификации RGD-пептидами графтов на основе PCL, полученных методом электроспиннинга, позволил сохранить структуру, при этом вызвал положительные (снижение гиперэластичности) и отрицательные (повышение жесткости) изменения механических характеристик. Для сосудистых протезов комплаентность является крайне важным показателем, в котором находят отражение механические свойства, в частности жесткость конструкции. В нашем исследовании изменения механических свойств модифицированных графтов не оказали влияния на комплаентность, что

является критерием отсутствия значимых негативных последствий модификации.

Местная реакция организма на имплантацию определяется многими факторами: химическими, физическими и биосовместимыми свойствами материала, из которого изготовлено изделие; вектором действия модифицирующего агента; особенностями зоны локации изделия в организме. Поликапролактон, из которого изготовлены графты, представляет собой гидрофобный полимер с высокой молекулярной массой, провоцирующий данными своими качествами усиленную работу моноцитарно-макрофагальной системы, направленную на фагоцитоз и расщепление PCL [13]. Длительная и непродуктивная работа макрофагов в этом направлении приводит к появлению большого количества гигантских многоядерных клеток инородного тела, представляющих собой не что иное, как объединение нескольких функционально активных тканевых макрофагов. Длительное персистирующее воздействие чужеродного материала на фоне неэффективного фагоцитоза данного материала способно провоцировать развитие хронического гранулематозного воспаления [14].

Особенностью тканевой реакции на имплантацию и последующую биорезорбцию полимерных немодифицированных графтов из PCL явилось развитие хронического гранулематозного

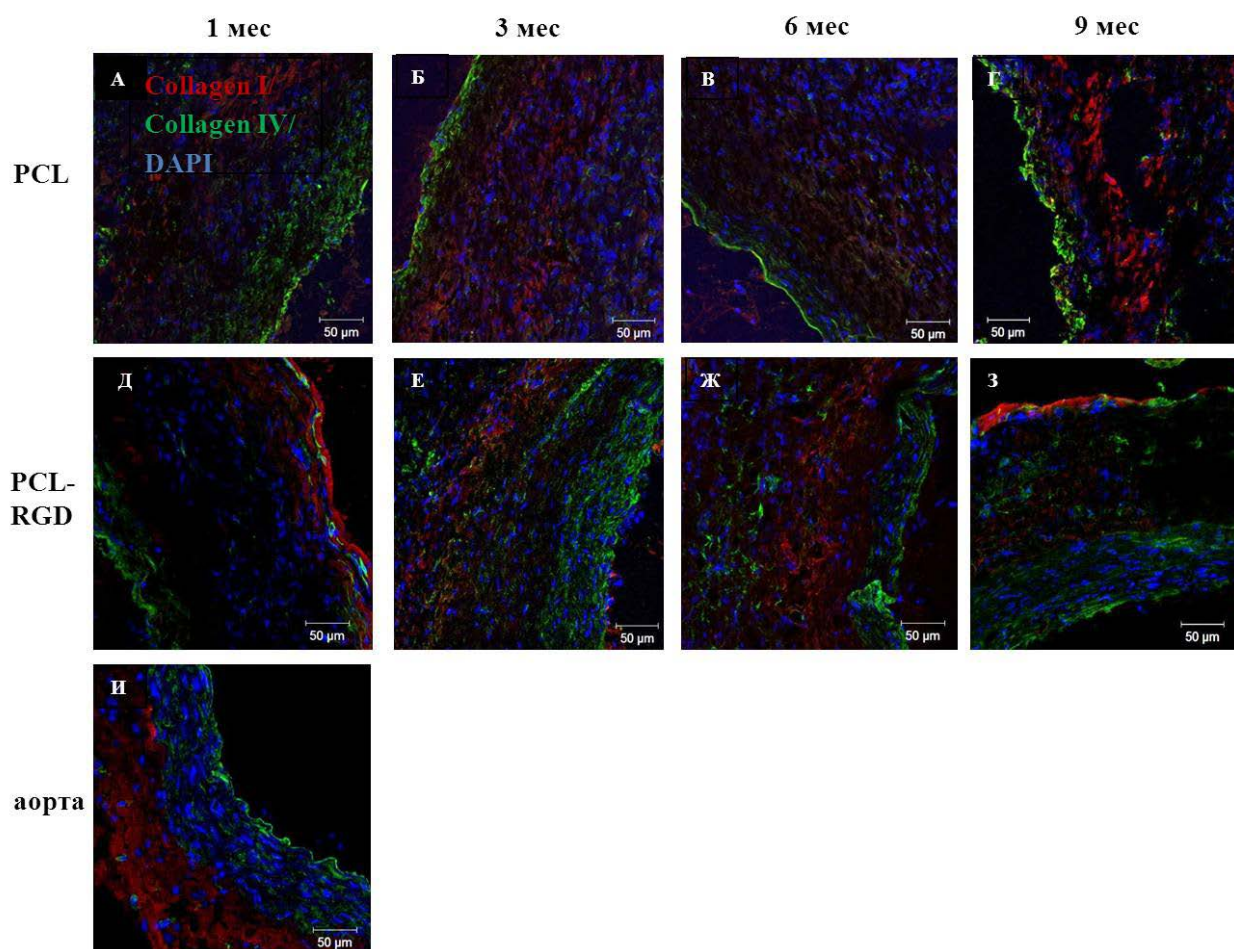


Рисунок 7. Фотографии срезов проходимых сосудистых графтов различных сроков имплантации. Окраска коллаген I – красный, коллаген IV – зеленый, ядра синие (ув. $\times 200$)

воспаления в стенке графтов в половине и более случаев (в зависимости от срока имплантации). На фоне воспаления стенка графтов утолщалась, а среди клеточных элементов преобладали макрофаги и большое количество гигантских клеток инородного тела. В некоторых случаях выраженность гранулематозного воспаления приводила к сужению просвета графтов до щелевидного, препятствовала формированию в стенке графтов полноценной новообразованной ткани, что в последующем неизбежно приведет к процессам склерозирования и не позволит сформировать нормальные сосудистые слои (интима, медиа, адвентиция) и их клеточное наполнение. Модификация поверхности PCL графтов RGD-пептидами в среднем в 2 раза снизила частоту развития гранулематозного воспаления в стенке графтов, что может быть связано с повышением биосовместимости поверхности модифицированных сосудистых графтов за счет наличия сайтов для связывания с интегриновыми

рецепторами клеток, участвующих в формировании здоровой новообразованной ткани [15].

Модификация RGD-пептидами способствовала увеличению проходимости графтов в среднем на 50%, что, в определенной мере, связано с повышением скорости заселения графтов ЕРС и их дифференцировки в зрелые, функционально активные эндотелиальные клетки. Гемопоэтическое происхождение клеток, покрывающих внутреннюю поверхность средней части всех видов графтов, имплантированных сроком на 1 месяц, подтверждает высокая и умеренная экспрессия на мембране CD34. Через 1 месяц имплантации на внутренней поверхности немодифицированных графтов присутствовали незрелые ЕРС клетки CD31–CD34+vWF+, в то же время на поверхности PCL-RGD графтов клетки отличались более зрелым фенотипом CD31+, CD34+, vWF+.

Эндотелиальные клетки синтезируют различные белки ECM, такие как ламинин, фибро-

нектин, коллаген IV типа [16]. По литературным данным, уровень продукции эндотелиальными клетками коллагена IV типа и vWF характеризует их ангиогенную активность [17, 18], поскольку последовательные стадии ангиогенного каскада зависят от возрастающей секреции коллагена типа IV, а vWF повышает выработку ангиогенных факторов. Поэтому синтез коллагена IV типа и vWF клетками вновь образованного эндотелиального слоя является показателем не только удовлетворительной функциональной активности, но и высокого ангиогенного потенциала.

Таким образом, модификация RGD-пептидами не оказывает значимых негативных последствий на физико-механические свойства сосудистых графтов из поликапролактона, способствует активному привлечению эндотелиальных и прогениторных клеток к внутренней поверхности полимерных графтов, раннему формированию функционально состоятельного эндотелиального монослоя, что отражается в повышении проходимости графтов, а так же способствует формированию полноценной ткани *de novo* на основе биodeградируемых трубчатых каркасов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Kurobe H., Maxfield M.W., Breuer C.K., Shinoka T. Concise review: tissue engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present and future. *Stem Cells Trans Med.* 2012; 1(7): 566-571
2. Hoenig M.R., Campbell G.R., Campbell J.H. Vascular grafts and the endothelium. *Endot.* 2006; 13: 385-401
3. Li S., Sengupta D., Chien S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2014; 6(1): 61-76
4. Матвеева В.Г., Антонова Л.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Пептидные последовательности, имитирующие внеклеточный матрикс, – перспективный способ биофункционализации сердечно-сосудистых имплантатов. *Молекулярная медицина*, 2016;14(6): 19-26.
Matveyeva V.G., Antonova L.V., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Peptidnyye posledovatel'nosti, imitiruyushchiye vnekletochnyy matriks – perspektivnyy sposob biofunktsionalizatsii serdechno-sosudistykhi implantatov. *Molekulyarnaya meditsina*, 2016;14(6): 19-26 (In Russ.)
5. Antonova L.V., Seifalian A.M., Kutikhin A.G., Sevostyanova V.V. et al. Bioabsorbable bypass grafts biofunctionalised with RGD have enhanced biophysical properties and endothelialisation tested in vivo. *Frontiers in Pharmacology.* 2016; 7(136): 1-10. Doi: 10.3389/fphar.2016.00136
6. Matveeva V.G., Seifalian A.M., Antonova L.V., Velikanova E.A. et al. Biofunctionalization of polycaprolactone scaffolds with RGD peptides for the better cells integration. *AIP Conference Proceedings.* 2016; 1760: 020048-1- 020048-5. doi: 10.1063/1.4960267
7. Zhang H., Hollister S. Comparison of bone marrow stromal cell behaviors on poly(caprolactone) with or without surface modification: studies on cell adhesion, survival and proliferation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2009; 20(14): 1975-1993
8. Sedaghati T., Jell G., Seifalian A. Investigation of Schwann cell behaviour on RGD-functionalised bioabsorbable nanocomposite for peripheral nerve regeneration. *N Biotechnol.* 2014; 31(3): 203-213
9. Антонова Л. В., Матвеева В. Г., Барбараш Л. С. Использование метода электроспиннинга в создании биodeградируемых сосудистых графтов малого диаметра: Проблемы и решения (обзор). *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2015; 3: 12-22.
Antonova L.V., Matveeva V.G., Barbarash L.S. Electrospinning and biodegradable small-diameter vascular grafts: problems and solutions (review). *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2015;(3):12-22. (In Russ.) DOI:10.17802/2306-1278-2015-3-12-22
10. Swartz D.D., Andreadis S.T. Animal models for vascular tissue-engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24(5): 916-925
11. Hager G., Holnthoner W., Wolbank S., Husa A.M., et al. Three specific antigens to isolate endothelial progenitor cells from human liposuction material. *Cytotherapy.* 2013; 15(11): 1426-1435. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.06.018
12. Panagiotis Berillis. The Role of Collagen in the Aorta's Structure. *The Open Circulation and Vascular J.* 2013; 6: 1-8
13. Антонова Л.В., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С. Возможности использования полиоксикапролактонатов и поликапролактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии. *Бюллетень сибирской медицины.* 2012; 1: 128-134.
Antonova L.V., Nasonova M.V.,

Kudryavtseva Y.A., Golovkin A.S. Potential for polyhydroxyalkanoates and polycaprolactone copolymer use as tissue-engineered scaffolds in cardiovascular surgery. Bulletin of Siberian Medicine. 2012;11(1):128-134. (In Russ.) DOI:10.20538/1682-0363-2012-1-128-134

14. Струков А.И., Кауфман О.Я. Гранулематозное воспаление и гранулематозные болезни. Москва. Медицина. 1989. 184 с.

Strukov A.I., Kaufman, O.YA. Granulematoznoye vospaleniye i granulematoznyye bolezni. Moskva. Meditsina. 1989. 184 s.

15. Stupack D. G. Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. Cell Death and Differentiation 2005; 12: 1021–1030. doi:10.1038/sj.cdd.4401658

16. Anderson D.E., Hinds M.T. Extracellular

matrix production and regulation in micropatterned endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 427(1): 159-164. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.034

17. Bahramsoltani M., Slosarek I., De Spiegelaere W., Plendl J. Angiogenesis and collagen type IV expression in different endothelial cell culture systems. Anat Histol Embryol. 2014; 43(2): 103-15. doi: 10.1111/ahe.12052

18. Zanetta L., Marcus S.G., Vasile J., Dobryansky M. et al. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. Int J Cancer. 2000; 85(2): 281-288

Статья поступила 29.06.2017

Для корреспонденции:

Антонова Лариса Валерьевна

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7 (3842) 64-38-02,

E-mail: antolv@kemcardio.ru

For correspondence:

Antonova Larisa

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, 650002,

Russian Federation

Тел. +7 (3842) 64-38-02,

E-mail: antolv@kemcardio.ru

СВОЙСТВА ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРИИ ТКАНЕЙ

И. А. КИРИЛОВА¹, В. Т. ПОДРОЖНАЯ¹, Ю. П. ШАРКЕЕВ^{2,3}, С. В. НИКОЛАЕВ^{4,5},
А. В. ПЕНЕНКО^{6,7}, П. В. УВАРКИН², П. В. РАТУШНЯК⁵, В. В. ЧЕБОДАЕВА³,
Е. А. АНАСТАСИЕВА¹, С. К. ГОЛУШКО^{5,6}, А. В. КОРЕЛЬ¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им.Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения Российской академии наук, Томск, Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

⁵Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁶Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁷Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт вычислительной математики и математической геофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Цель. Определение значимых для биоинженерии тканей физико-механических свойств деминерализованного костного матрикса губчатой и компактной кости человека

Материалы и методы. Перечислены методы исследования микроморфологических, пьезоэлектрических и транспортных свойств, адаптированные для измерения у материалов потенциальных матриц.

Результаты. Приведены результаты исследования физико-механических свойств деминерализованного костного матрикса губчатой и компактной кости человека. Показано, что деминерализованная губчатая кость обладает наилучшими характеристиками поровой системы для заселения матриксов клетками. Предел прочности и модуль упругости образцов из деминерализованных головок бедренных костей, извлеченных в ходе первичного эндопротезирования тазобедренного сустава, изменяются в широких пределах. Модуль упругости изменялся от 50 до 250 МПа, а предел прочности – от 1,1 до 5,5 МПа.

Заключение. Были отработаны и/или адаптированы методы измерений микроморфологических, пьезоэлектрических и транспортных свойств у материалов потенциальных матриц. Показано, что у образцов материалов из кости человека данные характеристики, как правило, значительно варьируют. Исходя из этого, становится очевидным, что отработка протоколов методов измерения вышеперечисленных свойств является важной работой для создания технологии биоинженерии тканевых имплантатов для восстановительной хирургии.

Ключевые слова: деминерализованный костный матрикс, костная ткань, механические характеристики, имплантат, матрица, биоинженерия тканей.

PROPERTIES OF THE DEMINERALIZED BONE MATRIX FOR BIOENGINEERING OF TISSUE

I. A. KIRILOVA¹, V. T. PODOROZHNYA¹, YU. P. SHARKEEV^{2,3}, S. V. NIKOLAEV^{4,5},
A. V. PENENKO^{6,7}, P. V. UVARKIN², A. S. RATUSHNYAK⁵, V. V. CHEBODAIEVA³,
E. A. ANASTASIEVA¹, S. K. GOLUSHKO^{5,6}, A. V. KOREL¹

¹Federal State Institution «Scientific and Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after YL Tsivyan» Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

²Institute of Strength Physics and Materials Science of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences Tomsk, Russia

³National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

⁴The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of

Sciences, Novosibirsk, Russia

⁵Institute of Computational Technologies of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁶Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁷Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

The purpose. Determination of tissues of physico-mechanical properties of demineralized bone matrix of spongy and compact human bone important for bioengineering.

Material and Methods. The methods for studying micromorphological, piezoelectric and transport properties, adapted for measuring the materials of potential scaffolds.

Results. The results of studying the physico-mechanical properties of the demineralized bone matrix of spongy and compact human bones are presented. It is shown that the demineralized spongy bone possesses the best characteristics of the pore system for the colonization of matrix cells. The tensile strength and modulus of elasticity of samples from the demineralized heads of the femurs extracted during the initial hip arthroplasty vary widely. The modulus of elasticity varied from 50 to 250 MPa, and the ultimate strength was from 1.1 to 5.5 MPa.

Conclusion. Methods for measuring micromorphological, piezoelectric and transport properties for materials of potential matrices were developed and / or adapted. It is shown that in the samples of materials from the human bone, these characteristics, as a rule, vary considerably. Proceeding from this, it becomes obvious that the development of protocols of measurement methods of the above listed properties is an important work for the creation of technology of bioengineering of tissue implants for reconstructive surgery.

Keywords: demineralized bone matrix, bone tissue, mechanical characteristics, implant, matrix, bioengineering of tissues.

Введение

Проблема восстановления анатомической целостности и функции костной ткани до сих пор остается актуальной задачей [1-3]. Характер регенераторных процессов в значительной мере определяется свойствами материалов, используемых для заполнения дефектов кости. Современный уровень медицины трудно представить без биологических имплантатов, с помощью которых выполняются реконструктивные хирургические вмешательства в травматологии и ортопедии [4-8, 16, 17], челюстно-лицевой хирургии [9-10], костной онкологии [7]. Поиск новых материалов и способов воздействия на остеогенез с целью формирования органотипического регенерата с помощью костно-пластических материалов (КПМ) является актуальным для современной медицины. В настоящее время в различных областях хирургии начинают использовать КПМ, приготовленные из костной ткани донора, которая, в свою очередь, может быть различной по строению: губчатой, кортикальной, губчато-кортикальной. Перспективными в качестве способа предварительной химической обработки аллогенной костной ткани оказались деминерализация и депротеинизация, которые позволяют получить деминерализованную костную ткань, лишенную минерального компонента, и депротеинизированную костную ткань,

лишенную органического компонента [11,12]. В то же время предварительная химическая обработка может привести к изменению структуры и свойств нативной аллогенной костной ткани, а следовательно, и ее биологического поведения при имплантации в живой организм.

Чтобы обеспечить запросы практической хирургии, необходимы биоинженерные конструкции, пригодные для замещения значительных по площади костных дефектов. Такие конструкции должны обладать следующими свойствами: сохранение физических и анатомических особенностей донорской кости, высокой прочностью, быстрой фиксацией в зоне имплантации и регенераторным потенциалом. Этим требованиям может удовлетворять только жесткая/упругая матрица, содержащая костные клетки реципиента, способные делиться, дифференцироваться и синтезировать межклеточный матрикс, поддерживающий жизнеспособность клеток [13-17].

Одной из современных тенденций биоинженерии тканей является заселение матриц полипотентными клетками с последующим управляемым инкубированием протоимплантата [18].

В процессе инкубирования полипотентные клетки должны дифференцироваться и формировать тканевый имплантат, годный для имплантации. Для этого можно использовать управляемое воздействие на клетки физико-химическими сигналами, которые, как показано к настоящему вре-

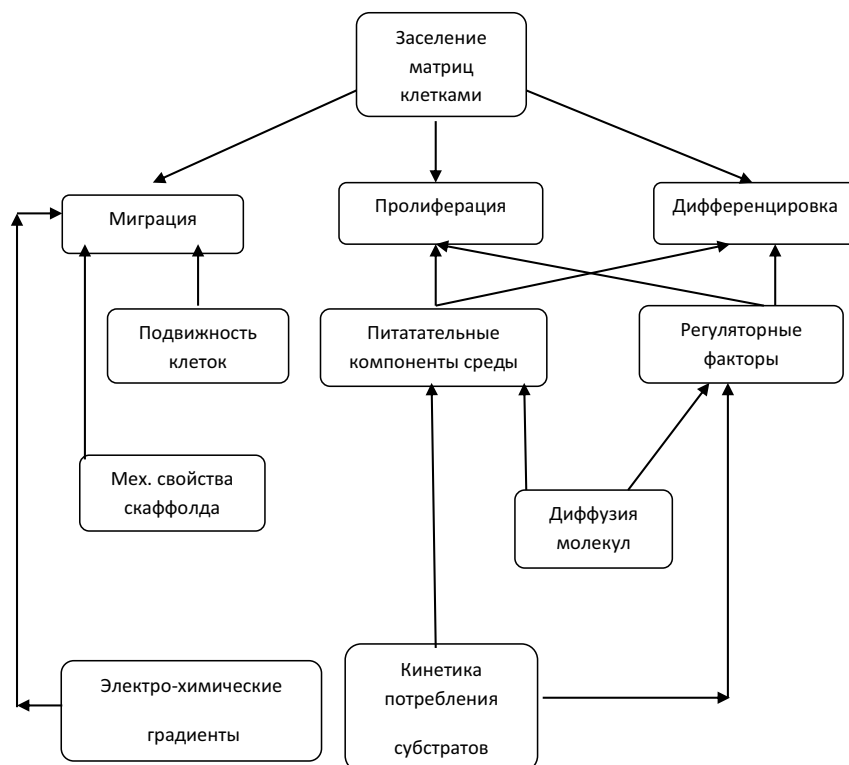


Рисунок 1. Схема процесса заселения матрицы клетками при биоинженерии имплантатов

мени, включают широкий спектр воздействий от специфических транскрипционных факторов до механических свойств матриц. Чтобы реализовывать такую технологию биоинженерии имплантатов, необходимо всякий раз на входе технологического процесса измерять физико-механические свойства используемой заготовки для матрицы.

В работе приводится аргументация для выбора характеристик заготовки, подлежащих измерению, и использованные для этих измерений методы.

Настоящее исследование необходимо для дальнейшего изучения влияния физико-химических свойств деминерализованного костного матрикса на клетки остеогенного и хондрогенного рядов с целью управления процессами их пролиферации, дифференцировки и таксиса при заселении матриксов в задачах регенеративной медицины.

Выбор характеристик материала для матрицы

Выбранные характеристики мотивированы нашим пониманием процесса заселения матриц клетками при биоинженерии имплантатов (рис. 1). Именно заселение и есть результат миграции,

пролиферации и дифференцировки клеток. Миграция зависит от подвижности клеток, свойств матрицы, её механики, геометрии, химического состава поверхностей и т.д. Пролиферация и дифференцировка зависят от концентрации питательных и регуляторных компонентов среды, а распределение уровня концентраций компонентов среды определяется диффузией молекул и потреблением их клетками.

Мы предполагаем, что такой процесс заселения матрицы можно реализовать, научившись управлять функционированием клеток, используя знания о регуляции экспрессии генов (рис. 2).

На настоящий момент нас интересовали следующие контуры регуляции экспрессии генов.

1. Регуляция морфогенами (регуляторными молекулами, находящимися в среде).
2. Регуляция электрическими потенциалами и микротоками.
3. Регуляция механическими напряжениями и деформациями.

На основе выше перечисленных положений в работе были поставлены следующие задачи.

1. Получить матрицы из деминерализованной кости человека, провести эксперименты по изучению диффузии веществ внутри таких ма-

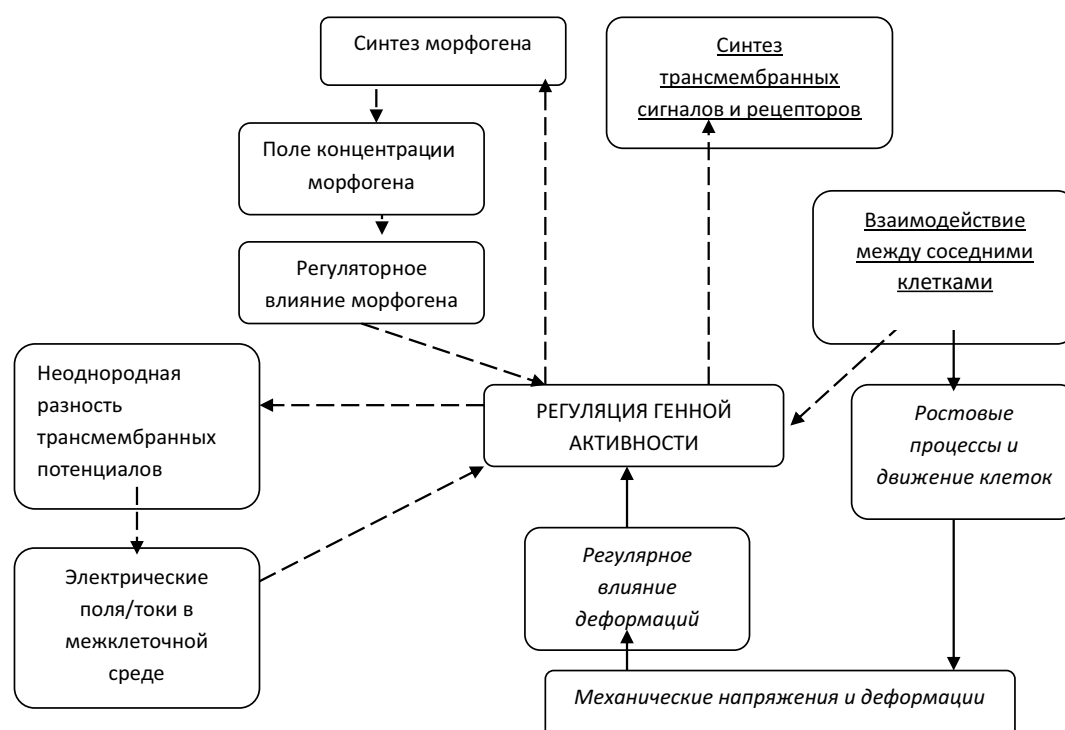


Рисунок 2. Контуры регуляции активности генов

триц, построить модели транспортных процессов.

2. Изучить механические свойства матриц. На основе литературного анализа выбрать подходящие модели механики материала.

3. Провести эксперименты по изучению пьезоэлектрических свойств матриц, чтобы использовать их для модуляции жесткости матрикса в экспериментах с клетками.

4. Разработать метод вычисления коэффициентов диффузии компонентов среды в материале матриц.

Материалы и методы

Материалом для исследования механических и пьезоэлектрических свойств для матриц служили образцы срединных распилов из головок бедренных костей (n=6), резецированных в ходе первичного эндопротезирования тазобедренного сустава у пациентов с коксартрозом. Возраст пациентов – доноров костной ткани составил от 46 до 67 лет, средний возраст – 55,8. А для изучения транспортных свойств дополнительно использовались слои гидрогелей толщиной 100 – 200 мкм.

В соответствии с утвержденным алгоритмом у доноров костного материала осуществлялся забор крови для обследования на инфекционные агенты (сифилис, ВИЧ, гепатиты В и С). При отрицательных результатах обследования

материал поступал в обработку. Осуществлялся радиальный распил ГБК с шагом 0,4-0,5 см, из срединного фрагмента выпиливался образец размерами 1,0x3,0см. Весь костный материал доноров подвергался промывке очищенной проточной водой, обезжириванию спирт-эфиром и деминерализации в 0,6 Н растворе HCl.

Морфология и механика

Микротвердость измерялась по ГОСТ 9450-76 на микротвердомере марки Duramin 5 (Дания). При измерениях применялась нагрузка 245 мН. Также производилось измерение нанотвердости на приборе “Nano Hardness Tester” NHT-S-AX-000X (Германия) в соответствии с международным стандартом ISO 14577-4:2007 при нагрузке на индентор 10 мН. Измерения микротвердости и нанотвердости производились по методу восстановления отпечатка путем вдавливания алмазной четырехгранной пирамидой Виккерса с углом 136° между противоположными гранями. Значения микротвердости и нанотвердости определяется делением нагрузки Р на площадь поверхности отпечатка F (1):

$$HV = \frac{P}{F} = \frac{2P \sin \alpha/2}{d^2} = 1,8544 \frac{P}{d^2}, (1)$$

где d – диагональ отпечатка.

При измерении нанотвердости на приборе “Nano Hardness Tester” NHT-S-AX-000X (Германия) проводилась также регистрация модуля Юнга.

Исследования на трёхточечный изгиб проводились на универсальной настольной электромеханической испытательной машине Instron 3369 (США, «Instron») по ГОСТ 14019-80 при скорости нагружения 0,1 мм/мин и максимальной нагрузке 2 кН. Образцы для испытаний на трёхточечный изгиб имели следующие размеры 10 x 30 x 4 мм³.

Морфологию костного материала исследовали на металлографическом инвертированном микроскопе «Альтаи МЕТ 1МТ» (Россия, Санкт-Петербург) методами светлого и тёмного полей, а также по методу поляризации. Пористость костной ткани оценивалась по макроскопическим изображениям, полученным посредством макрофото съёмки исследуемых объектов. Общая пористость (Π) рассчитывалась как отношение суммарной длины отрезков, попадающих на поры, к общей длине секущих линий и выражается следующей формулой:

$$\Pi = \frac{\sum l}{\sum L_1} 100\% \quad , (2)$$

где L_1 – общая длина секущих в условных единицах измерительного прибора, l – длина секущих, попадающих на поры.

В работе для определения элементного состава костного материала использовали последовательный волнодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр Lab Center XRF-1800 (Япония).

Пьезоэлектрические свойства

Для измерения пьезоэлектрических свойств нами был сделан макет экспериментальной установки (рис.3) и осуществлена запись пьезоэлектрических потенциалов с образца компактной деминерализованной аллокости. Форма и амплитуда пьезоэлектрических потенциалов зависят от плотности образца (определяемой влажностью) и величины нагрузки. Косвенная оценка влажности осуществлялась измерением электропроводности участка образца, расположенного под электродами.

Структурно функциональная схема аппаратно-программного измерительного комплекса состоит из измерительной ячейки (1) с образцом, предварительного усилителя-согласователя (2), манипулятора (3) и измерительно-управляющего комплекса (4).

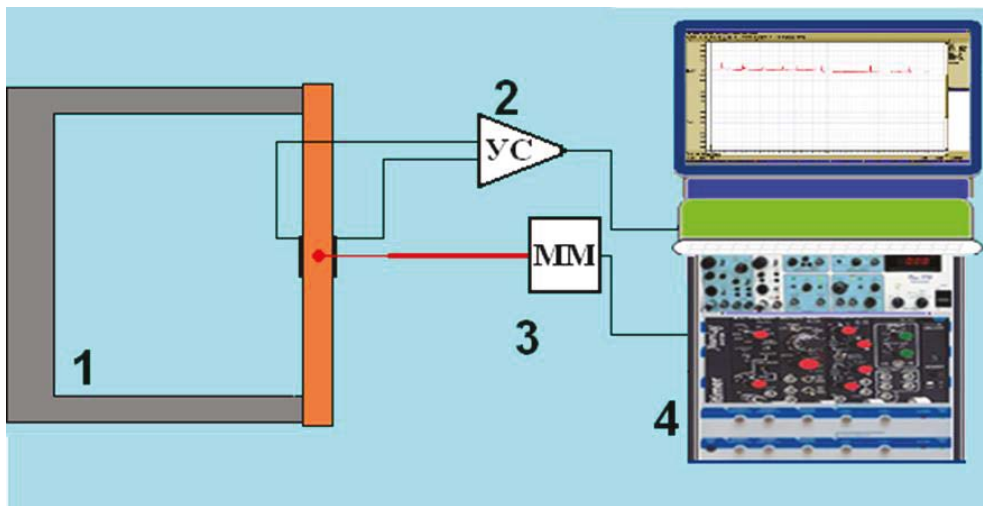


Рисунок 3. Макет экспериментальной установки для измерения пьезоэлектрических свойств кости

Транспортные свойства материала Метод FRAP

Для изучения транспортных свойств материала можно использовать метод, состоящий в том, что в изучаемый материал внедряют среду с флуоресцирующим веществом, и некоторую область обесцвечивают интенсивным излучением лазера. Затем наблюдают, как восстанавливается

флуоресценция в этой области за счет взаимной диффузии «отбеленных» и «активных» молекул. Такой метод называется «восстановление флуоресценции после фотоотбеливания» (Fluorescent Recovery after Photobleaching -FRAP) По скорости этого восстановления можно оценить коэффициент диффузии флуоресцирующего вещества в изучаемой среде в матриксе материала, решая соответствующую обратную задачу. Эксперимен-

тально процедура FRAP проводилась на образцах толщиной порядка 100 мкм. Поэтому для моделирования процесса восстановления была использована двумерная нестационарная диффузионная модель с постоянным коэффициентом диффузии. Этот коэффициент подбирался исходя из минимума отклонения между реальными и смоделированными снимками интенсивности флуоресценции в последовательные моменты времени. За начало отсчета времени принимался момент начала восстановления флуоресценции. Соответствующий снимок использовался в качестве начальных данных. Для поиска коэффициента использовался стандартный метод «золотого сечения». С учетом вышесказанного был построен алгоритм, позволяющий оценивать коэффициент диффузии среды по данным обесцвечивания. С помощью

построенного алгоритма обработаны результаты ряда экспериментов с различными средами и различными уровнями обесцвечивания.

Результаты измерения поступали в виде набора снимков в известные последовательные моменты времени. На рис. 4 показана зависимость средней интенсивности флуоресценции «области интереса» от времени. За начало отсчета модельного времени принята точка минимума кривой, соответствующей средней интенсивности по обесцвеченной области (голубая кривая на рис. 4), в предположении, что это момент окончания процесса обесцвечивания. Соответственно в качестве начальных данных использовали снимок в момент окончания обесцвечивания. Последующие снимки служили для решения обратной задачи о поиске коэффициента диффузии (рис.5).

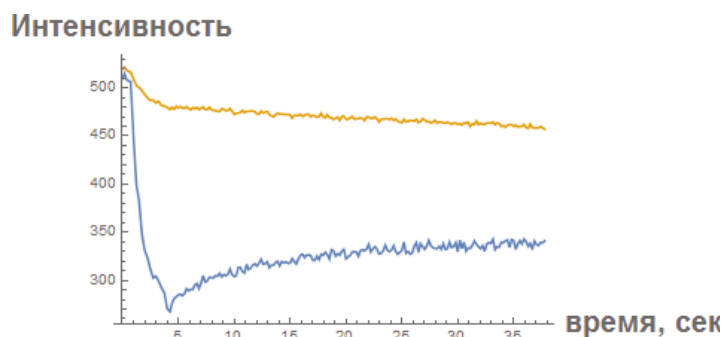


Рисунок 4. Зависимость средней интенсивности от времени эксперимента. Желтая кривая – средняя по всей области, голубая – по обесцвеченной

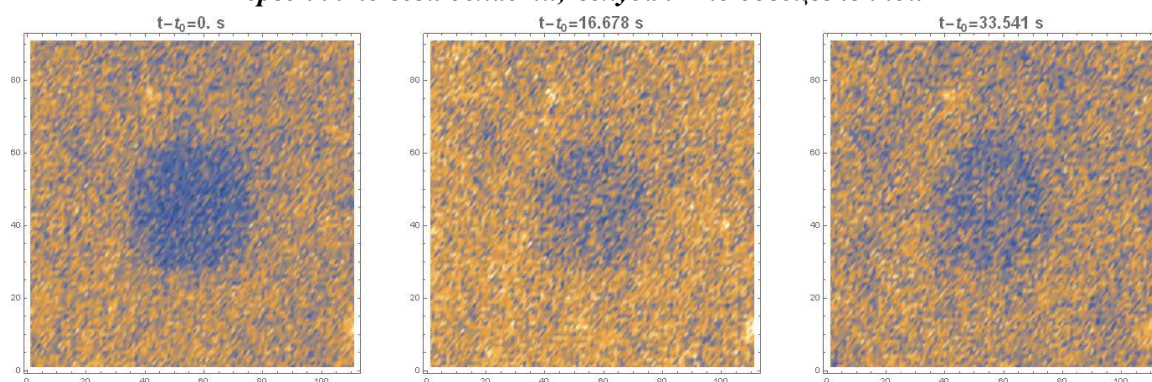


Рисунок 5. Интенсивность в последовательные моменты времени после окончания обесцвечивания

Численный алгоритм решения обратной задачи по вычислению коэффициента диффузии по экспериментальным данным, аналогичным вышеизложенным, приведен в работе [19].

Результаты и обсуждение

Морфология и механика. Макроскопические образцы губчатой и компактной деминерализо-

ванной кости одного размера, равного 1,0х3,0 см, отличались морфологией поверхности (рис. 6).

Морфология всех образцов костной ткани представлена пористой структурой. Поры расположены во всем объеме ткани. На рис.7 показаны оптические изображения фрагмента костной ткани, полученные с различными фокальными глубинами, позволяющими оценивать внутренние поры образца (рис.8).

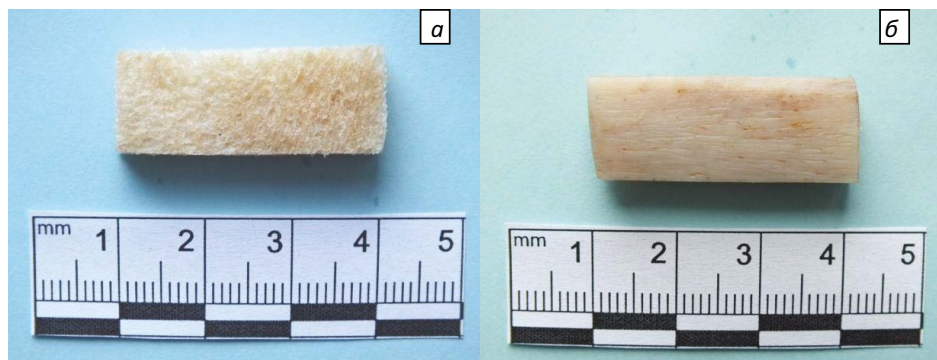


Рисунок 6. Изображения образцов костной ткани: а – деминерализованная костная ткань головки бедренной кости (ДКТ-ГБК), б – деминерализованная костная ткань кортикальная (ДКТ – кортикальная)

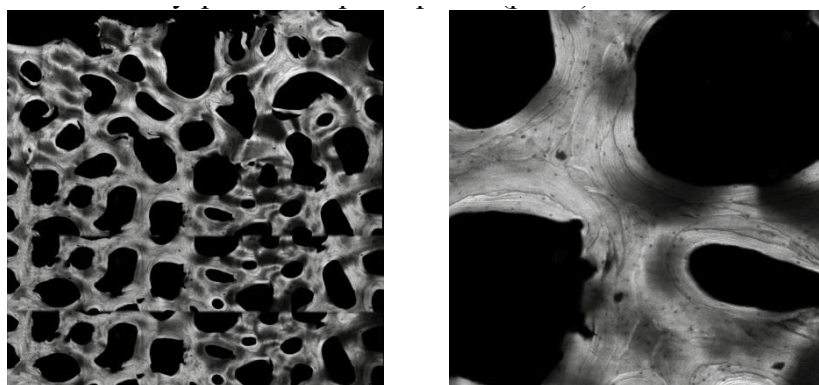


Рисунок 7. Оптические изображения образца губчатой деминерализованной костной ткани

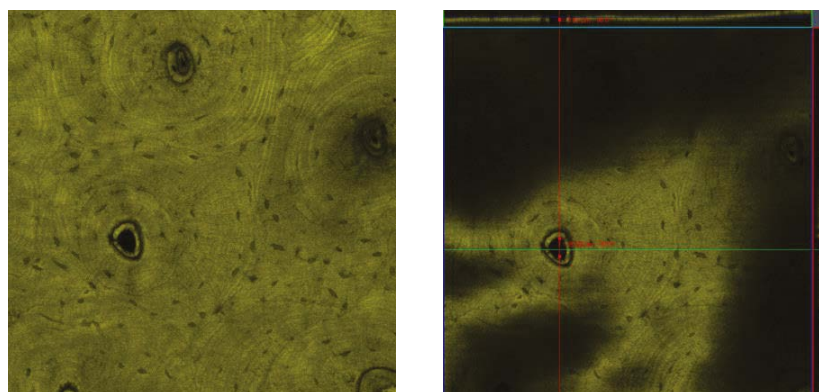


Рисунок 8. Оптические изображения образца кортикальной деминерализованной костной ткани

Морфология образцов компактной кости представлена редко расположенными Гаверсовыми каналами размером 20 мкм. Расстояние между Гаверсовыми каналами варьирует от 100 до 150 мкм, пористость компактной костной ткани практически отсутствует.

Структура губчатой деминерализованной кости имеет пористость 50% и выше со средним диаметром пор, наиболее приемлемым для заселения матриц клетками. На рис. 9 представлены гистограммы распределения пор по размерам

для губчатой деминерализованной кости для исследованных образцов. Все распределения имеют один максимум, положение которого несколько меняется от образца к образцу. Средняя пористость составила 52 % для 1 и 2 образцов, 55 % для 3, 4 и 5 образцов и 67 % для 6 образца.

Данные литературы [4,6] указывают на то, что для заселения матриц остеобластами, которые имеют значительный размер в дифференцированном виде, до 30 μm , предпочтительнее использовать образцы с размером пор от 250 μm

и более. Изучение микрофотографий показало, что в губчатой кости органический матрикс имеет поры размерами до 0,5 миллиметра, и бедно

представлены поры, размерами от десятка до ста микрометров (рис.9).

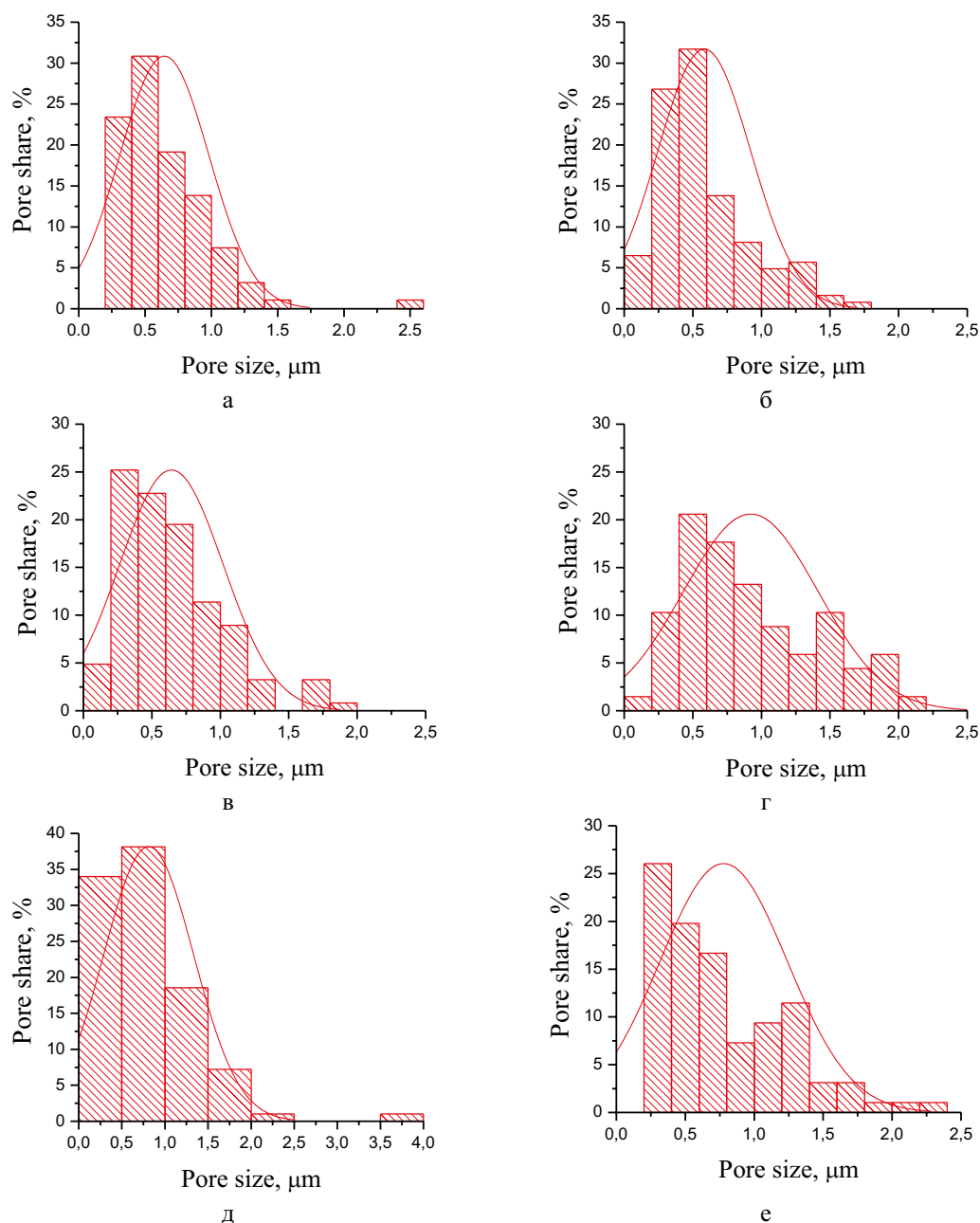


Рисунок 9. Распределение пор по размерам для деминерализованной трубчатой кости. Номер образца: а – 1, б – 2, в – 3, г – 4, д – 5, е – 6

В таблицах 1 и 2 приведены механические характеристики для деминерализованной губчатой и кортикальной костной ткани соответственно. Предел прочности для деминерализованной компактной кости изменялся в пределах от 1,1 до 5,5 МПа при предельной деформации до 16,0%. Модуль Юнга на изгиб изменялся от 49 до 248 МПа. В случае деминерализованной губчатой костной

ткани механические характеристики ниже. Так, предел прочности изменялся в пределах 1,1 – 5,5 МПа при максимальной предельной деформации 8,4 %. Модуль Юнга при изгибе изменялся от 3 до 50 МПа. Более низкие характеристики у губчатой костной ткани связаны с наличием каркасной пористой структуры при отсутствии таковой у компактной кости.

Таблица 1.

Механические характеристики деминерализованной кортикальной кости

Образец	Предел прочности (σB), МПа	Предельная деформация (ε), %	Модуль Юнга при изгибе (E), МПа
1	3,9	11,1	199
2	2,0	13,1	75
3	1,1	11,2	49
4	5,5	16	220
5	4,9	10,8	175
6	4,4	11,5	248

При сравнительной оценке механических характеристик деминерализованной кортикальной и губчатой кости с использованием U-критерий Манна-Уитни получили статистически значимые различия уровня всех признаков в сравниваемых группах ($p < 0,05$). По пределу прочности и предельной деформации U-критерий Манна-Уитни равен 5, а по модулю Юнга при изгибе U-критерий Манна-Уитни равен 1 при критическом значении при заданной численности сравниваемых групп 6.

Таблица 2.

Механические характеристики деминерализованной губчатой кости

Образец	Предел прочности (σB), МПа	Предельная деформация (ε), %	Модуль Юнга при изгибе (E), МПа
1	1,2	3,6	37
2	0,4	7,5	12
3	1,9	2,6	34
4	0,4	4,1	14
5	0,8	5,5	3
6	0,8	8,4	11
7	2,4	5,2	50

Пьезоэлектрические свойства. Проведены пилотные исследования потенциалов на электродах при создании нагрузки на образец. Форма и амплитуда сигналов зависела от степени жесткости образца, которая определялась его влажностью. Косвенная оценка влажности осуществлялась измерением электропроводности участка образца, расположенного под электродами.

Примеры регистрируемых сигналов представлены на рис. 10 и 11.

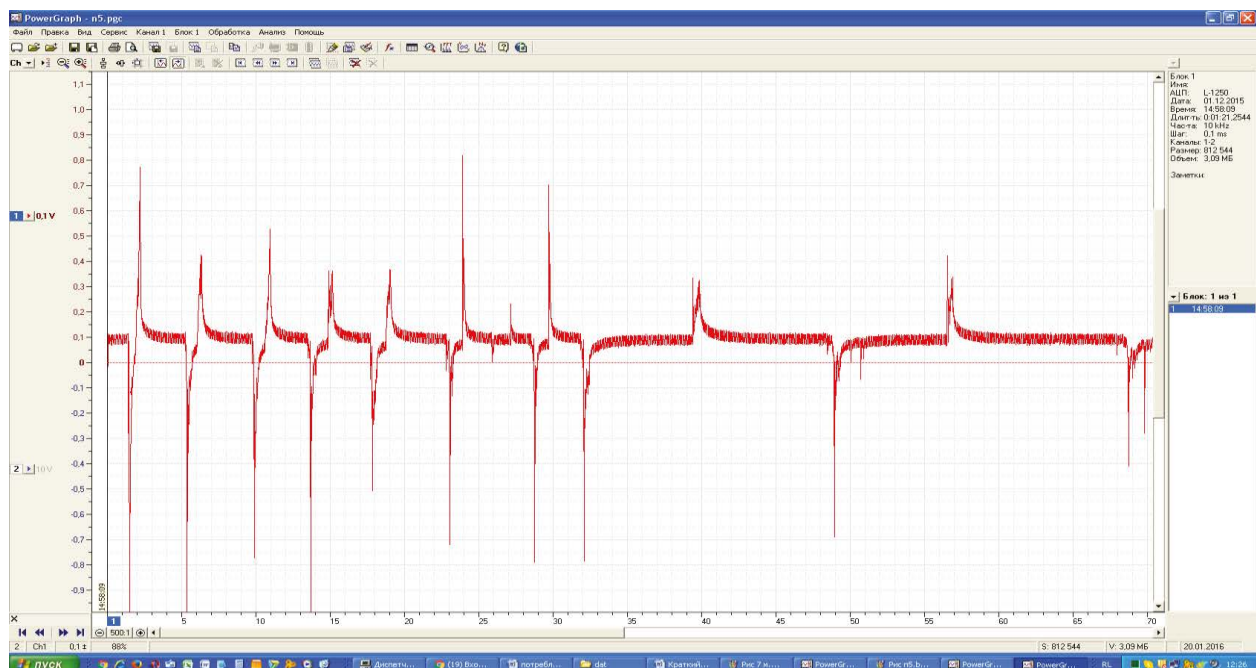


Рисунок 10. Пример потенциалов на «матрице» при различных значениях деформации (при $R=20\text{ МОм}$)

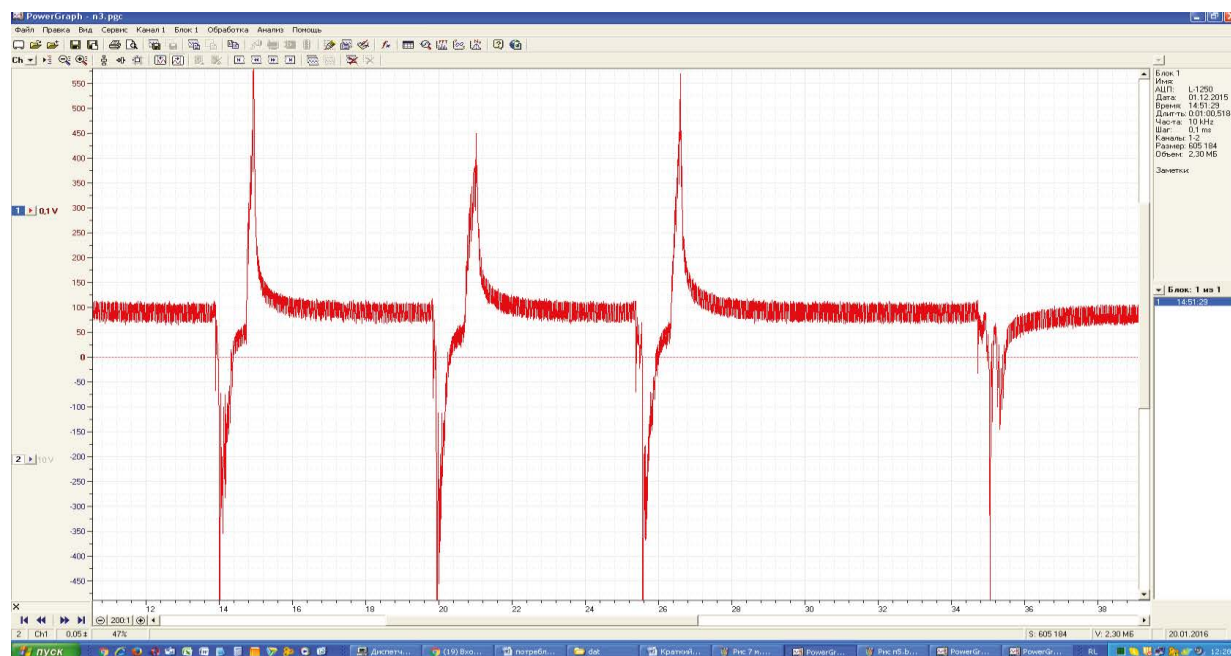


Рисунок 11. Пример потенциалов на «матрице» при различных значениях деформации (при $R=80\text{мОм}$)

По результатам измерений строилась зависимость амплитуды сигнала от жесткости образца (оцениваемой по электропроводности).

На рис. 12 представлена эта зависимость на основе данных, полученных в пилотных экспериментах.

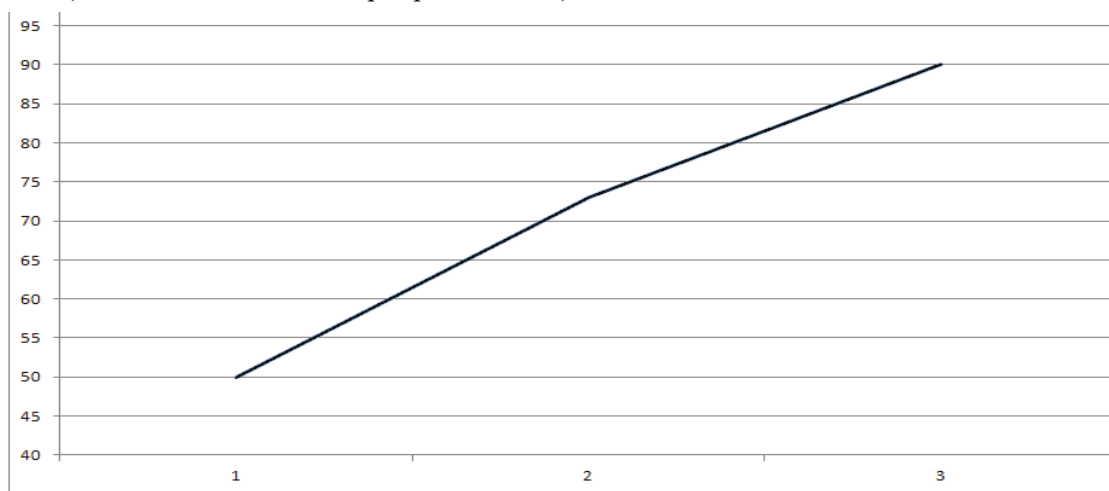


Рисунок 12. Диаграмма зависимости амплитуды сигнала от жесткости образца
По оси Y средняя амплитуда сигнала.
По оси X сопротивление образца, характеризующее его жесткость.
1 - $R=20\text{мОм}$, 2. $R=50\text{мОм}$, 3. $R=80\text{мОм}$

Оценка коэффициентов диффузии. На основе FRAP экспериментов проведены сравнительные оценки коэффициентов диффузии флуоресцентных антигенов в образцах из деминерализованного костного матрикса компактной кости человека и образцах искусственных матриц из желатина, крысиного коллагена и матригеля, а также гидрогеля на основе смеси хитозана с по-

лилактидом в разных пропорциях. Образцы для экспериментов готовились следующим способом: полимеризованный гель или костный образец инкубировались в растворе с флуоресцирующими антителами в течение суток.

Результаты расчета коэффициентов диффузии по проведенным экспериментам представлены в сводной таблице 3.

Таблица 3.

Расчет коэффициентов диффузии различных матриц

Материал	D (m ² /s)
Chitosan+25% Plc	4.96 × 10 ⁻¹² 7.15 × 10 ⁻¹²
Chitosan+50% Plc	2.27 × 10 ⁻¹² 1.17 × 10 ⁻¹¹
Chitosan+75% Plc	2.21 × 10 ⁻¹² 7.44 × 10 ⁻¹²
Chitosan	2.79 × 10 ⁻¹¹ 1.493 × 10 ⁻¹¹ 1.1 × 10 ⁻¹¹
Gelatin	3.54 × 10 ⁻¹² 3.68 × 10 ⁻¹²
Matrigel	1.73 × 10 ⁻¹² 1.84 × 10 ⁻¹² 2.07 × 10 ⁻¹²
Rat collagen	3.45 × 10 ⁻¹¹ 3.43 × 10 ⁻¹¹ 3.3 × 10 ⁻¹¹ 2.61 × 10 ⁻¹¹ 2.82 × 10 ⁻¹¹ 1.21 × 10 ⁻¹¹ 5.45 × 10 ⁻¹²
Деминерализованная кость	4.16 × 10 ⁻¹¹ 4.76 × 10 ⁻¹¹

Заключение

Были отработаны и/или адаптированы методы измерений микроморфологических, пьезоэлектрических и транспортных свойств у материалов потенциальных матриц. Показано, что у полученных образцов материалов из кости человека данные характеристики, как правило, значительно варьируют. Поэтому отработка протоколов методов измерения вышеперечисленных свойств является важной работой для создания технологии биоинженерии тканевых имплантов для восстановительной хирургии.

Исследование проводилось при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-29-04875)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Z. Liao, C.H. Wang, W.L. Cui. J Invest Surg. 2016 Apr 11:1-10. [Epub ahead of print] –
2. Кирилова И.А. Анатомо-функциональ-

ные свойства кости как основа создания костно-пластических материалов для травматологии и ортопедии. Автореф. дисс. ... доктора мед. наук. Новосибирск; 2011.

Kirilova I.A. Anatomical and functional properties of bone as a basis for creating bone-plastic materials for traumatology and orthopedics. [dissertation] Novosibirsk; 2011. [In Russ].

3. Нигматуллин Р.Т., Щербаков Д.А., Мысина Л.М., Ткачев А.А. Некоторые аспекты клинического применения костных и хрящевых аллотрансплантатов. Медицинский вестник Башкортостана. 2012; 7 (4): 78-83.

Nigmatullin R.T., Shcherbakov D.A., Musina L.M., Tkachev A.A. Some aspects of clinicfl use of bone and cartilage allografts. Medical bulletin of Bashkortostan. 2012; 7 (4): 78-83 2012 Volume: 7 issue: 4 Year: 2012 Pages: 78-83. [In Russ].

4. Hofer S., Leopold S.S., Jacobs J. Clinical perspectives on the use of bone graft based on allografts In: Laurencin CT, editor. Bone graft substitutes. West Conshohocken, PA: ASTM International. 2003. P. 68–95.

5. Cammisa F. P., Lowery G., Garfin S.R., Geisler F.H., Klara P.M., McGuire R.A. et al. Two-year fusion rate equivalency between Grafton DBM gel and autograft in posterolateral spine fusion: a prospective controlled trial employing side-by-side comparison in the same patient. Spine. 2004; 29: 660–6.

6. Швец А. И., Ивченко В. К. Костные трансплантаты и их заменители в хирургии позвоночника. Ортопедия, травматология и протезирование. 2008; 3: 66–69.

Shvets A.I., Ivchenko V.K. Bone grafts and their substitutes in surgery of the spine. Orthopedics, traumatology and prosthetics. 2008; 3: 66-69. [In Russ].

7. Дианов С.В., Тарасов А.Н. Аллопластика вертлужной впадины при первичном и ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава. Травматология и ортопедия России. 2009; 3: 130–132.

Dianov S.V., Tarasov A.N. Acetabulum alloplasty at the primary and revision hip replacement. Traumatology and orthopedics of Russia. 2009; 3: 130–132. [In Russ].

8. Major M.R., Wong V.W., Nelson E.R., Longaker M.T., Gurtner G.C. Plast Reconstr Surg. 2015 May;135(5):1489-98. doi: 10.1097/PRS.0000000000001193.

9. Parisay I., Ghoddusi J., Forghani M. Review A review on vital pulp therapy in primary teeth. Iran Endod J. 2015; 10(1): 6-15. Epub 2014 Dec 24.

10. Грудянов А.И., Николаев А.В. Сравнительный анализ отдаленных результатов использования различных ауто- и аллотрансплантатов для создания зоны кератинизированной десны при вестибулопластике на нижней челюсти // Стоматология. 2016. Т. 95. № 1. С. 40-43.

A.I. Grudyanov, A.V. Nikolaev Comparative study of long term result of auto- and allografts for keratinized gingiva restoration in vestibuloplasty area on the lower jaw Dentistry. 2016. T. 95. No. 1. S. 40-43.

11. Кирилова И.А., Николаев С.В., Подорожная В.Т., Шаркеев Ю.П., Уваркин П.В. Ратушняк А.С. и др. Внеклеточный матрикс из кости человека как основа тканеинженерной конструкции. Российский иммунологический журнал. 2016; 10 (2-1) 579-581.

Kirilova I.A., Nikolaev S.V., Podorozhnaya V.T., Sharkeev Yu.P., Uvarkin P.V., Ratushnyak A.S. et al. Extracellular matrix from human bone as the basis of tissue engineering design. Russian Immunological Journal. 2016; 10 (2-1) 579-581. [In Russ].

12. Kirilova I. A., Sharkeev Yu. P., Nikolaev S. V., Podorozhnaya V. T., Uvarkin P. V., Ratushnyak A. S. et al. Physicomechanical properties of the extracellular matrix of a demineralized bone. AIP Conference Proceedings. 2016; 1760 (1): 020027 doi: 10.1063/1.4960246.

13. Vitor E.S., Manuela E.G., Joao F.M., Rui L.R. Controlled release strategies for bone, cartilage and osteochondral engineering—Part I: Recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems. Tissue engineering: Part B. 2013; 19 (4): 308-326.

14. M.A. Velasco, Narváez-Tovar C.A., Garzón-Alvarado D.A. Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering. BioMed Research International. 2015; 2015: 729076. doi:10.1155/2015/729076.

15. Кирпичев И.В., Маслов Л.Б., Коровин Д.И. Актуальные междисциплинарные проблемы применения современных пористых имплантатов для замещения костных дефектов. Современные

проблемы науки и образования. 2016; 1: 2.

Kirpichev I.V., Maslov L.B., Korovin D.I. Aktual'nye mezhdisciplinarnye problemy primeneniya sovremennykh poristyykh implantatov dlja zameshheniya kostnykh defektov. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2016; 1: 2. [In Russ].

16. Подорожная В.Т., Кирилова И.А., Шаркеев Ю.П., Попова К.С., Уваркин П.В., Фомичев Н.Г. Изучение структурно-функциональных характеристик срединных распилов головок бедренных костей. Успехи современного естествознания. 2015; 9: 126-129.

Podorozhnaya V.T., Kirilova I.A., Sharkeev Yu.P., Popova K.S., Uvarkin P.V., Fomichev N.G. The study of structural and functional characteristics of femoral head midline section specimens. Advances in current natural sciences. 2015; 9: 126-129. [In Russ].

17. Кирилова И.А., Шаркеев Ю.П., Подорожная В.Т., Попова К.С., Уваркин П.В., Фомичев Н.Г. Изучение морфологии срединных распилов головки бедренной кости. Успехи современного естествознания. 2015; 8: 58-61.

Kirilova I.A., Sharkeev Yu.P., Podorozhnaya V.T., Popova K.S., Uvarkin P.V., Fomichev N.G. The study of the morphology of femoral head midline section specimens. Advances in current natural sciences. 2015; 8: 58-61. [In Russ].

18. Murphy S.V., Atala A. Organ engineering – combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. Bioessays. 2012; 35: 163–172.

19. Пененко А.В., Николаев С.В., Голушко С.К., Ромащенко А.В., Кирилова И.А. Численные алгоритмы идентификации коэффициента диффузии в задачах тканевой инженерии. Матем. биология и биоинформ. 2016; 11 (2): 426-444.

Penenko A.V., Nikolaev S.V., Golushko S.K., Romashhenko A.V., Kirilova I.A. Chislennyye algoritmy identifikatsii koefitsienta diffuzii v zadachah tkanevoj inzhenerii. Matematicheskaja biologiya i bioinformatika. 2016; 11 (2): 426-444. [In Russ].

Статья поступила 07.06.2017

Для корреспонденции:

Кирилова Ирина Анатольевна

Адрес: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

Тел. +7(913) -958-09-61,

E-mail: irinakirilova71@mail.ru

For correspondence:

Kirilova Irina

Address: 17, Frunze st., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

Тел. +7(913) -958-09-61,

E-mail: irinakirilova71@mail.ru

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *CRP* В ВОЗНИКНОВЕНИИ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ У ПАЦИЕНТОВ ИБС

Ю. В. БАЙРАКОВА, А. В. ПОНАСЕНКО, М. В. ХУТОРНАЯ, А. А. КУЗЬМИНА,
Я. В. КАЗАЧЕК, О. Л. БАРБАРАШ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

Цель. Оценить вклад полиморфизмов гена *CRP* rs3093077, rs1130864, rs1205 в развитие фибрилляции предсердий (ФП) у пациентов ИБС в зависимости от пола и возраста.

Материалы и методы. В исследование включено 302 пациента со стабильной ИБС. Концентрацию hs-CRP определяли с помощью высокочувствительного иммунотурбидиметрического метода. Генотипирование осуществляли в 96-луночном формате методом TaqMan.

Результаты. Клинико-анамнестическими предикторами возникновения ФП являются пожилой возраст > 65 лет и наличие у пациента СД 2-го типа ($p = 0,003; 0,01$). Носительство гетерозиготного генотипа G/A rs1130864 *CRP* увеличивает риск развития ФП у пациентов с ИБС более чем в четыре раза ($p=0.0025$) по сверхдоминантной модели наследования. У мужчин, носителей генотипа C/T rs1205 *CRP*, риск развития ФП при ИБС увеличивается в среднем в пять раз (сверхдоминантная модель наследования ($p=0,022$)). У мужчин, носителей генотипа G/A rs1130864 *CRP*, определяется увеличение риска развития ФП в 5 раз ($p=0,015$), а у мужчин в возрасте < 65 лет, носителей того же генотипа rs1130864 *CRP*, риск развития ФП увеличивается в 9 раз ($p=0,025$), в отличие от пациентов, носителей других генотипов. У пациентов обоих полов < 65 лет, носителей генотипа C/T rs1205 *CRP*, риск развития ФП в 10 раз выше, чем у носителей других генотипов (ОШ=10,03 (1.26-79.59); 95% ДИ).

Заключение. Для оценки риска возникновения ФП необходимо учитывать генетические маркеры.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, С-реактивный белок, полиморфные сайты гена *CRP* rs3093077, rs1130864, rs1205.

THE ROLE OF POLYMORPHISMS OF *CRP* GENE IN OCCURRENCE OF ATRIAL FIBRILLATION IN CAD PATIENTS

YU. V. BAYRAKOVA, A. V. PONASENKO, M. V. KHUTORNAYA, A. A. KUZMINA,
YA. V. KAZACHEK, O. L. BARBARASH

Federal State Budgetary Institution

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia

The purpose. Assessment of the contribution of *CRP* gene polymorphisms rs3093077, rs1130864 and rs1205 to the development of atrial fibrillation (AF) in CAD patients depending on gender and age.

Material and methods. The study included 302 patients with stable coronary artery disease. C-reactive protein (*CRP*) concentration was measured by high-sensitive immunoturbidimetric assay. The genotyping was performed in 96-well plates using TaqMan assay.

Results. The elderly age > 65 years and the presence of type 2 diabetes mellitus are the clinical and anamnestic predictors of AF development ($p=0.003; 0.01$). G/A rs1130864 *CRP* heterozygous carriers have a 4-fold increased risk of AF development among the patients with coronary artery disease ($p=0.0025$) according to the overdominant inheritance model. Men who are the carriers of C/T rs1205 *CRP* genotype have on average a 5-fold increased risk of AF development in case of CAD presence (according to the overdominant model, $p=0.022$). A 5-fold increased risk of AF development is associated with men carrying G/A rs1130864 *CRP* genotype ($p=0.015$), meanwhile the men < 65 years, who carry the same genotype (rs1130864 *CRP*), have a 9-fold increased risk of AF development ($p=0.025$), as compared to the patients who are the carriers of other genotypes. The patients of both genders < 65 years, carrying the C/T rs1205 *CRP* genotype, have a 10-fold increased risk of AF development as compared to the carriers of other genotypes (OR =10.03 (1.26-79.59); 95% CI).

Conclusion. The genetic markers should be considered to assess the risk of AF development.

Key words: atrial fibrillation, C-reactive protein, *CRP* gene polymorphic sites.

Введение

Фибрилляция предсердий (ФП) является одной из распространенных и значимых в клиническом аспекте аритмий. Персистирующая форма ФП рассматривается как наиболее частая причина различных тромбоэмболий, а необходимость приема антикоагулянтов значительно повышает риск кровотечений. Кроме того, продолжительность лечения в стационаре, в том числе в отделениях интенсивной терапии, увеличивается даже при неосложнённом течении пароксизма ФП [1]. Известно [1], что наиболее важными факторами риска возникновения ФП является пожилой возраст пациента. Вероятно, данный факт обусловлен тем, что у больных преклонного возраста предсердия расширены, гипертрофированы и имеют элементы фиброза, что отражается на структуре и функции синусового узла [2]. Одним из доказанных и очень весомых факторов возникновения ФП является значимое облитерирующее поражение проксимального сегмента правой коронарной артерии (ПКА) [2]. Это обусловлено особенностями кровоснабжения синусового узла, который получает кровь из ПКА [3].

Исследования последних лет доказали важность оценки маркеров воспаления в определении прогноза как здоровых людей, так и пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В ряде работ представлена диагностическая и прогностическая роль высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ). Показано, что его определение может быть полезно для выделения группы высокого риска развития артериальной гипертензии, сахарного диабета, нарушений ритма сердца, атеросклероза [4]. Известен ряд перспективных исследований, направленных на использование СРБ в качестве критерия неблагоприятного прогноза у пациентов с острыми коронарными событиями [5], фибрилляцией предсердий (ФП) [6], инсультом [7] и другими заболеваниями. Существует ряд исследований, направленных на изучение данного маркера в качестве предиктора осложнений при выполнении кардиологических [8] и некардиологических оперативных вмешательств [9]. Ряд зарубежных исследований утверждает, что повышенный уровень СРБ является возможным предрасполагающим фактором, способствующим «запуску» или поддержанию ФП. Тем не менее, является ли повышенный уровень СРБ в плазме просто

маркером ФП или он способствует началу этого заболевания, в настоящее время неизвестно [10,11]. Таким образом, помимо клинико-иммунологических предикторов возникновения ФП, поиск других маркеров, таких как генетические, в настоящее время является наиболее актуальным для выявления других возможных причин развития данного заболевания.

Цель исследования

Оценить вклад полиморфизмов гена *CRP* rs3093077, rs1130864, rs1205 в развитие ФП у пациентов ИБС в зависимости от пола и возраста.

Материалы и методы

В исследование включено 302 пациента со стабильной ИБС, средний возраст 58 (54; 63) лет, из них в возрасте 65 лет и старше - 46 человек (15,23 %). В исследуемой когорте пациентов преобладали мужчины: 212 человек (70,20%). Пациентов, имеющих различные формы ФП, зарегистрировано 24 человека (7,95%). Индекс массы тела (ИМТ) исследуемых пациентов составил 28,40 (25,10; 31,77) кг/м², у 58 пациентов (19,21%) выявлен сахарный диабет (СД) 2-го типа, 267 человек (88,41%) имели артериальную гипертензию (АГ), длительность которой составила 10 (3; 16) лет. Гиперхолестеринемия была выявлена у 157 пациентов (51,99%), из них статины принимали 133 пациента (44,04%). У 52 человек (17,22 %) диагностирован мультифакторный атеросклероз (МФА) - атеросклеротическое поражение в нескольких сосудистых бассейнах. 188 пациентов (62,25%) в прошлом перенесли инфаркт миокарда (ИМ) с формированием постинфарктного кардиосклероза (ПИКС). Исследуемая когорта пациентов имела 3-й (2;3) функциональный класс (ФК) стенокардии и 2-й (2;3) ФК хронической сердечной недостаточности. Перенесенные острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) либо транзиторная ишемическая атака (ТИА) в анамнезе были у 33 пациентов (10,92%). 10 пациентов (3,31%) ранее перенесли каротидную эндартерэктомию (КЭЭ). Курильщики, а также с анамнезом курения в прошлом было 168 (55,62%) больных. Сывороточные концентрации СРБ у исследованных пациентов составили – 2,9 (1,20; 5,90) мг/л.

Включение больного в исследование осу-

ществлялось после получения информированного согласия, в том числе на проведение генетического тестирования. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ.

Критериями включения являлись: наличие стабильной ИБС, хроническая сердечная недостаточность (ХСН) не более IIА стадии по Василенко-Стражеско, функциональный класс ХСН – от I до III. Критериями исключения служили: тяжелые сопутствующие заболевания, аутоиммунные болезни, клапанные пороки сердца, диагностированные опухоли, психические заболевания, отказ от генетического тестирования.

С целью выявления МФА всем больным проводили цветное дуплексное сканирование экстракраниальных артерий (ЭКА), артерий нижних конечностей (АНК) на аппарате ультразвуковой диагностики (Vivid 7 Dimension, GeneralElectric США) при помощи линейных датчиков с частотой 5-7 МГц (для ЭКА), конвексного датчика с частотой 2,5-3 МГц и линейного – 5 МГц (для АНК). Оценка толщины комплекса интима-медиа (КИМ) проводилась в дистальной, средней и проксимальной точках общей сонной артерии с вычислением среднего значения. При этом нормальным считалось значение толщины КИМ до 1 мм.

Выделение геномной ДНК производилось методом фенол-хлороформной экстракции с протеиназой К из цельной венозной крови. Генотипирование осуществляли в 96-луночном формате методом TaqMan с учетом прохождения полимеразно-цепной реакции в реальном времени (РТ-ПЦР) по протоколу производителя (Applied Biosystems, США) на амплификаторе RT-PCR ViiA7 (Applied Biosystems, США). Для контроля качества 10% случайно выбранных образцов были подвергнуты повторному генотипированию.

В исследование включены полиморфные сайты гена *CRP* (C-reactive protein - *CRP*: rs3093077, rs1130864, rs1205) с заменой одного нуклеотида, зарегистрированные в международной базе (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), с частотой редкого аллеля более 5% для европеоидных популяций, имеющей последствия на молекулярном уровне.

Концентрацию hsCRP определяли с помощью высокочувствительного иммунотурбидиметрического метода с использованием стандартных тест-систем фирмы Thermo Fisher Scientific (Финляндия) на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 30i (Финляндия).

Статистическая обработка осуществлялась с помощью Statistica 6,0. (StatSoft Inc., США). Выявили, что не во всех случаях данные имели признаки Гаусова распределения (критерий Шапиро-Уилка). Использовали методы непараметрической статистики: U-критерий Манна-Уитни и метода χ^2 (таблица 2x2) с поправкой Йетса на непрерывность. Центральную тенденцию представляли в виде медианы и межквартильного размаха (Me (25Q; 75Q)).

Анализ результатов генотипирования проводился посредством SNPStats [<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats>]. Равновесие Харди-Вайнберга определяли при помощи критерия χ^2 Пирсона с одной степенью свободы. Для оценки риска вычислялись отношение шансов (ОШ) и 95%-ные доверительные интервалы (95% ДИ). Для оценки влияния генотипа отдельного полиморфизма исследуемого гена на величину сывороточной концентрации кодируемого белкового продукта использовали однофакторный дисперсионный анализ (Statistica 6,0., StatSoft Inc., США) с определением F-критерия значимости для четырех степеней свободы. Различия признавались статистически значимыми при вероятности отклонить верную нулевую гипотезу менее 0,05 ($p < 0,05$).

Ограничения исследования

Несмотря на статистическую значимость полученных результатов, данное исследование является одноцентровым и выполнено на ограниченно малой выборке индивидуумов с наличием ФП. Для подтверждения полученных результатов рекомендуется расширение исследуемой популяции с привлечением нескольких медицинских центров по изучению патогенеза ФП.

Результаты

Пациенты были разделены на группы в зависимости от наличия ФП. В группу пациентов, имеющих различные формы ФП, вошло 24 человека (7,95%). Не имеющие ФП составили другую группу – 278 пациентов (92,05%). В обеих группах преобладали мужчины: 13 человек (54,16 %) в группе ФП и 199 (71,60%) – в группе пациентов, не имеющих ФП, однако достоверных различий в половом составе не регистрировалось ($p=0,08$). Пациенты, имеющие ФП, были достоверно старше ($p=0,003$)

и, соответственно, среди данной группы чаще встречались пациенты >65 лет ($p=0,04$). Среди пациентов с аритмией чаще регистрировался СД 2-го типа ($p=0,01$). Перенесенный в прошлом ИМ с формированием ПИКС достоверно чаще встречался в

группе больных, не имеющих ФП ($p=0,01$). По другим клиничко-anamnestическим параметрам статистически значимых отклонений выявлено не было. Сывороточные концентрации СРБ в исследуемых группах значимых различий не имели (табл.1).

Таблица 1.

Клиничко-anamnestическая характеристика пациентов в зависимости от наличия ФП

Характеристика	С ФП (n=24) 7,95%	Без ФП (n=278) 92,05%	p
Мужчины, n (%)	13 (54,16 %)	199 (71,60%)	0,06
Средний возраст, лет	62 (58; 67)	58 (54; 62)	0,003
> 65 лет, n (%)	7 (29,16 %)	39 (14,02%)	0,04
ИМТ кг/м ²	30,03 (26,21; 32,47)	28,33 (24,78; 31,64)	0,419
АГ в анамнезе, n (%)	23 (95,83 %)	243 (87,41%)	0,22
Длительность АГ (лет)	10 (5;20)	10 (3;16)	0,337
Гиперхолестеринемия, n (%)	10 (41,66%)	146 (52,52%)	0,3
СД 2-го типа в анамнезе, n(%)	9 (37,5%)	49 (17,63%)	0,01
ПИКС, n(%)	9 (37,5%)	179 (64,34%)	0,01
МФА	7 (29,17%)	45 (16,19%)	0,09
ФК стенокардии	3 (2; 3)	3 (2;3)	0,122
ФК ХСН	2 (2;3)	2 (2;3)	0,163
ОНМК/ТИА в анамнезе, n(%)	4 (16,67%)	29 (10,43%)	0,25
Курение, n(%)	9 (37,5 %)	158 (56,83%)	0,05
КЭЭ в анамнезе, n, (%)	2 (8,33 %)	8 (2,88%)	0,15
Прием статинов n, (%)	7 (29,16%)	126 (45,32%)	0,09
Уровень СРБ мг/л	2,70 (0,90; 8,25)	2,90 (1,23; 5,90)	0,707

Все анализируемые полиморфизмы в исследуемой популяции находились в равновесном состоянии в соответствии с законом Харди-Вайнберга.

Из всех включенных в исследование пациентов у восьми человек провести генотипирование по изучаемым сайтам используемыми специфическими ДНК-зондами оказалось невозможно, несмотря на повторное выделение ДНК из соответствующих образцов и дублированное проведение аллель-специфической ПЦР.

Наибольшее количество неудачных случаев генотипирования определено для сайта rs1130864 *CRP* – у пяти человек.

Значимых различий между частотами аллелей в двух анализируемых группах в сайте rs1205 *CRP* ($p=0,40$) обнаружено не было. Среди всех пациентов частота минорного аллеля А гена *CRP* в сайте rs3093077 составила 5%. Однако

ни у одного из пациентов, имеющих в анамнезе ФП, данный аллель не был определен. Из-за малого размера выборки пациентов с ФП достоверных выводов о влиянии изменчивости гена *CRP* в сайте rs3093077 делать неправомерно. Частота встречаемости аллелей в сайте rs1130864 *CRP* в двух анализируемых группах одинакова ($\chi^2=1,0$, $p=0,32$), однако у пациентов из группы с ФП чаще встречается гетерозиготный генотип G/A ($\chi^2=5,85$, $p=0,036$). Генотипы rs1205 *CRP* ($p=0,12$) равновстречаемы у пациентов двух анализируемых групп.

Статистически значимых различий в сывороточных уровнях СРБ у лиц – носителей разных генотипов по отдельным варибельным сайтам не было ($\chi^2=0,25$ (df=1), $p=0,62$ для rs1130864; $\chi^2=0,92$ (df=2), $p=0,63$ для rs3093077 и $\chi^2=0,80$ (df=2), $p=0,67$ для rs1205). Не выявлено и различия в количестве СРБ в связи с каждым из изу-

чаемых сайтов по отдельности ($F=0,097$, $p=0,33$ для rs1130864; $F=2,29$, $p=0,11$ для rs3093077 и $F=0,21$, $p=0,81$ для rs1205) Также не было выявлено статистически значимой разницы между концентрациями СРБ при носительстве различных аллельных сочетаний по вариабельным сайтам rs1130864 - rs3093077-rs1205 ($\chi^2=8,58$ ($df=7$), $p=0,28$).

Анализ ассоциаций показал, что носитель-

ство гетерозиготного генотипа G/A rs1130864 *CRP* связан с увеличением риска развития ФП у пациентов с ИБС более чем в четыре раза (ОШ=4.31 (1.58-11.78); 95%ДИ, $p=0.0025$) по сверхдоминантной модели наследования (с учетом поправок на прием статинов, возраст (>65 лет), пол, ИМТ (25 кг/м²), артериальную гипертензию, ПИКС, гиперлипидемию, курение и СД 2-го типа. (табл.2).

Таблица 2.
Анализ ассоциаций между генотипами rs1130864 *CRP* и ФП (n=297 с поправками на прием статинов, возраст (>65 лет), пол, ИМТ (25 кг/м²) артериальную гипертензию, ПИКС, гиперлипидемию, курение и СД 2-го типа)

Модель	Генотип	ФП исходно НЕТ	ФП исходно ДА	ОШ (95% ДИ)	p
Кодоминантная	G/G	133 (48.5%)	6 (26.1%)	1.00	0.0082
	G / A	113 (41.2%)	16 (69.6%)	3.81 (1.34-10.82)	
	A/A	28 (10.2%)	1 (4.3%)	0.47 (0.05-4.59)	
Доминантная	G/G	133 (48.5%)	6 (26.1%)	1.00	0.033
	G/A -A/A	141 (51.5%)	17 (73.9%)	2.85 (1.03-7.85)	
Рецессивная	G/G - G/A	246 (89.8%)	22 (95.7%)	1.00	0.11
	A/A	28 (10.2%)	1 (4.3%)	0.22 (0.03-2,01)	
Сверхдоми- нантная	G/G-A/A	161 (58.8%)	7 (30.4%)	1.00	0.0025
	G/A	113 (41.2%)	16 (69.6%)	4.31 (1.58-11.78)	
Лог-аддитивная	---	---	---	1.34 (0.70-2.58)	0.39

Далее в настоящей работе была выявлена связь с полом изменения риска развития ФП с наследованием генотипа G/A *CRP* rs1130864. Установлено, что у мужчин, носителей данного

генотипа, дополнительно увеличивается риск развития ФП (ОШ=5.05 (1.21-21.09); 95%ДИ, $p=0,015$) (табл. 3).

Таблица 3.
Частота встречаемости генотипов rs1130864 *CRP* в группах пациентов с ФП в зависимости от половой принадлежности (n=297 с поправками поправки на прием статинов, возраст (> 65 лет), (ИМТ 25 кг/м²) артериальную гипертензию, ПИКС, гиперлипидемию, курение и СД 2-го типа)

Половая принадлежность	Генотипы	ФП НЕТ	ФП ДА	ОШ (95% ДИ)
Мужчины	G/G	96	3	1.00
	G/A	82	9	5.05 (1.21-21.09)
	A/A	18	0	0.00
Женщины	Генотипы	ФП НЕТ	ФП ДА	ОШ (95% ДИ)
	G/G	37	3	1.00
	G /A	31	7	2.62 (0.57-12.00)
	A/A	10	1	0.59 (0.04-8.27)
p=0.015				

Дальнейший анализ показал, что у мужчин, носителей G/A генотипа rs1130864 CRP, риски

развития ФП в более молодом возрасте (до 65 лет) значительно выше (ОШ=9.17(1.68-50.02); 95%ДИ, p=0,025) (табл.4). Для женщин значимых ассоциаций в ходе исследования выявлено не было.

Таблица 4.

Частота встречаемости генотипов rs1130864 CRP в группе мужчин с ФП в зависимости от возраста (> 65 лет) (n=212, с поправками на прием статинов, ПИКС, ИМТ (25 кг/м²) артериальную гипертензию, гиперлипидемию, курение и СД 2 -го типа)

Возраст	Генотипы	ФП НЕТ	ФП ДА	ОШ (95% ДИ)
<65 лет	G/G	92	2	1.00
	A/G	76	9	9.17 (1.68-50.02)
	A/A	17	0	0.00
> 65 лет	Генотипы	ФП НЕТ	ФП ДА	ОШ (95% ДИ)
	G/G	4	1	1.00
	A/G	6	0	0.00
	A/A	1	0	0.00
p=0.025				

Далее было выявлено, что у мужчин, носителей генотипа C/T rs1205 CRP, риск развития ФП при ИБС в среднем увеличивается в пять раз (сверхдоминантная модель наследования,

(ОШ=5.23(1.04-26.33); 95%ДИ, p=0,022) (табл. 5). Для женщин подобных ассоциаций найдено не было.

Таблица 5.

Анализ ассоциаций между генотипами rs1205 CRP и ФП у мужчин (n=209, с поправками на прием статинов, ПИКС, возраст (>65 лет), пол, ИМТ (25 кг/м²) артериальную гипертензию, уровень холестерина, курение и СД 2-го типа)

Модели	Генотип	ФП нет	ФП есть	ОШ (95% ДИ)	p
Кодоминантная	C/C	64 (32.6%)	1 (7.7%)	1.00	0.057
	C/T	105 (53.6%)	11 (84.6%)	7.78 (0.90-67.41)	
	T/T	27 (13.8%)	1 (7.7%)	2.85 (0.15-55.86)	
Доминантная	C/C	64 (32.6%)	1 (7.7%)	1.00	0.029
	C/T-T/T	132 (67.3%)	12 (92.3%)	6.96 (0.81-59.79)	
Рецессивная	C/C-C/T	169 (86.2%)	12 (92.3%)	1.00	0.56
	T/T	27 (13.8%)	1 (7.7%)	0.54 (0.06-5.01)	
Сверхдоми- нантная	C/C-T/T	91 (46.4%)	2 (15.4%)	1.00	0.022
	C/T	105 (53.6%)	11 (84.6%)	5.23 (1.04-26.33)	
Лог-аддитивная	---	---	---	1.83 (0.67-5.03)	0.23

Дополнительно в ходе исследования было выявлено, что у пациентов обоих полов, носителей генотипа C/T rs1205 CRP, риск развития ФП в

молодом возрасте выше в 10 раз, чем у носителей других генотипов (табл. 6).

Таблица 6.

Частота встречаемости генотипов rs1205 *CRP* у пациентов с ФП в зависимости от возрастного распределения (n=299) с поправками на прием статинов, ПИКС, пол, ИМТ (25 кг/м²), АГ, гиперлипидемией, курение и СД 2-го типа)

Возраст	Генотипы	ФП нет	ФП есть	ОШ (95% ДИ)
<65 лет	C/C	88	1	1.00
	C/T	116	14	10.03 (1.26-79.59)
	T/T	32	2	6.54 (0.54-79.88)
> 65 лет	Генотипы	ФП нет	ФП есть	ОШ (95% ДИ)
	C/C	13	4	1.00
	C/T	20	2	0.40 (0.05-2.97)
	T/T	6	1	0.80 (0.07-9.66)
p=0,017				

Обсуждение

В ходе настоящей работы доказано, что пожилой возраст пациента и сахарный диабет (СД) 2-го типа являются клинико-анамнестическими предикторами возникновения ФП. Однако в одном из предыдущих наших исследований [12] пожилой возраст был исключен из возможных факторов риска развития ФП после проведения коронарного шунтирования (КШ), что, вероятно, было обусловлено более высоким классом стенокардии у молодых больных. Наличие у пациента СД 2-го типа явилось значимым для развития аритмии в настоящем исследовании, однако в предыдущей работе [12] СД 2-го типа своей значимости для развития послеоперационной ФП не показал. Неясным остается тот факт, что перенесенный в прошлом ИМ не повлиял на развитие нарушений ритма сердца в настоящем исследовании. При оценке концентрации СРБ пациентов было выявлено, что уровень данного белка не сыграл значимой роли в риске возникновения ФП у больных ИБС. Однако в ранее проведенных работах [13, 14] доказано, что пациенты с осложненным послеоперационным периодом после проведения КШ в виде пароксизмов ФП отличались достоверно более высокими исходными предоперационными значениями маркера воспаления – ИЛ-12, а предоперационный уровень СРБ также имел тенденцию к повышению в группе пациентов, послеоперационный период которых осложнился данной аритмией. Так, еще в одном из наших исследований доказано, что пациенты, подвергшиеся КШ с развитием послеоперационных осложнений, особенно ФП,

имели достоверно более высокие исходные значения СРБ по сравнению с неосложненными пациентами [15]. По данным литературы имеется еще ряд доказательств того, что увеличение плазменного уровня СРБ ассоциируется с повышенным риском ФП. Подобные данные подтверждены в проспективном исследовании (n=5806, 897 включенных случаев) [16] и в 3 случай-контроль исследованиях (n=121, n=202 и n=2796 соответственно) [10,17,18]. А в одной из последних наших работ [19] было выявлено, что у пациентов со стабильными формами ИБС вне зависимости от наличия МФА и перенесенного ИМ в прошлом регистрируется сывороточная концентрация СРБ более 3 мг/л, что указывает на высокий риск сердечно-сосудистых событий, однако взаимосвязь между концентрацией белка и полиморфизмами генов, их кодирующих, отсутствовала.

В работе других ученых также было доказано, что высокие уровни СРБ ассоциированы с развитием ФП, а полиморфные сайты *CRP* ассоциированы с различными концентрациями СРБ в сыворотке (rs1205 с низким уровнем СРБ, а rs 1130864, rs 3091244 и rs 3093077 – с высоким). Однако прямых ассоциаций каждого из отдельных полиморфных сайтов, увеличивающих сывороточные уровни СРБ, с риском возникновения ФП не было найдено [20]. Таким образом, по данным множественных работ доказано, что повышение уровня плазменного СРБ устойчиво связано с возрастанием риска ФП. Однако, с другой стороны, повышение уровня СРБ плазмы, обусловленное строением гена, не способствует возрастанию риска возникновения ФП. Это доказывает, что увеличение плазменного уровня

СРБ не повышает риск развития ФП [20]. Следовательно, при отсутствии генетической предрасположенности к высоким концентрациям СРБ при ФП концентрация СРБ плазмы может повышаться, что, вероятно, является маркером либо индикатором данного заболевания, однако не его предиктором.

В настоящем исследовании не было обнаружено ассоциаций концентрации СРБ с генотипами и гаплотипами исследуемых полиморфных вариантов гена *CRP*. Однако в ходе работы было выявлено, что у носителей генотипа G/A rs1130864 риск развития ФП возрастает, а у молодых мужчин, носителей данного генотипа, этот риск выше в 9 раз. Носительство генотипа C/T rs1205 *CRP* ассоциировано с повышением риска развития ФП в 10 раз. А в одной из предыдущих наших работ [19] у женщин, имеющих генотипы G/A rs1130864 и C/T rs1205 *CRP*, был снижен риск развития не менее значимого сердечно-сосудистого события – инфаркта миокарда. Полученные результаты подтверждают генетическую предрасположенность к развитию данных сердечно-сосудистых событий.

Таким образом, СРБ может быть маркером такого нарушения ритма, как ФП, но пока недостаточно данных для того, чтобы сделать однозначные выводы о том, что высокий уровень СРБ, обусловленный строением гена, является предиктором данного заболевания. Однако однозначно можно утверждать, что существует генетическая предрасположенность, связанная с носительством определенного генотипа того или иного полиморфизма *CRP*, к развитию данной аритмии, включая и другие сердечно-сосудистые катастрофы у пациентов ИБС, она проявляется в более молодом возрасте, особенно у мужчин, что и было доказано в настоящей работе.

Выводы

1. Клинико-анамнестическими предикторами возникновения ФП являются пожилой возраст > 65 лет и наличие у пациента СД 2-го типа ($p=0,003$; $0,01$).

2. Носительство гетерозиготного генотипа G/A rs1130864 *CRP* увеличивает риск развития ФП у пациентов с ИБС более чем в четыре раза ($p=0,0025$) по сверхдоминантной модели наследования. У мужчин, носителей генотипа C/T rs1205 *CRP*, риск развития ФП при ИБС увели-

чивается в среднем в пять раз (сверхдоминантная модель наследования ($p=0,022$)).

3. У мужчин, носителей генотипа G/A rs1130864 *CRP*, определяется увеличение риска развития ФП в 5 раз ($p=0,015$), а у мужчин в возрасте < 65 лет, носителей того же генотипа rs1130864 *CRP*, риск развития ФП увеличивается в 9 раз ($p=0,025$) в отличие от пациентов, носителей других генотипов. У пациентов обоих полов <65 лет, носителей генотипа C/T rs1205 *CRP*, риск развития ФП в 10 раз выше, чем у носителей других генотипов (ОШ=10,03(1.26-79.59); 95%ДИ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Симоненко В.Б., Борисов И.А., Голиков А.П., Диева Т.В., Савичев Д.Д. Фибрилляция предсердий после аортокоронарного шунтирования. Клиническая медицина. 2009; 8; 4-6.

Simonenko V.B., Borisov I.A., Golikov A.P., Dieva T.V., Savichev D.D. Atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. Klinicheskaya meditsina. 2009; 8; 4-6. [In Russ]

2. De Jong M.J., Morton P.G. Predictors of atrial dysrhythmias for patients undergoing coronary artery bypass grafting. Am. J. Crit. Care. 2000; 9(6): 388-396.

3. Abusaada K., Sharma S.B., Jaladi R., Ezekowitz M.D. Epidemiology and management of new-onset atrial fibrillation. Am. J. Manag. Care. 2004; 10(3 Suppl.): 50-57.

4. Libby P., Ridker M.P., Hansson K.G. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. J. Am. Coll. Cardiol. 2009; 54(23): 2129-2138. doi: 10.1016/j.jacc.2009.09.009.

5. Жукова В.А., Шальнова С.А., Метельская В.А. С-реактивный белок: современное состояние проблемы. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2011; 10 (1): 90-95.

Zhukova V.A., Shalnova S.A., Metelskaya V.A. C-reactive protein: modern state of the problem. Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika. 2011; 10 (1): 90-95. [In Russ]

6. Arribas-Leal J.M., Pascual-Figal D.A., Tornel-Orsorio P.L., Gutiérrez-García F., García-Puente del Corral J.J., Ray-López V.G. et al. Epidemiology and new predictors of atrial fibrillation after coronary surgery. Rev. Esp. Cardiol. 2007; 60(8): 841-847. doi: 10.1016/S1885-5857(08)60028-6.

7. Митьковская Н.П., Герасименко Д.С., Ходосовская Е.В., Картун Л.В. Активность воспалительного ответа у пациентов с сочетанием острого коронарного синдрома и острого ишемического повреждения мозга. Медицинский журнал. 2008; 3: 100-102.

Mit'kovskaya N.P., Gerasimenok D.S., Khodosovskaya E.V., Kartun L.V. Aktivnost' vospalitel'nogo otveta u patsientov s sochetaniem ostrogo koronarnogo sindroma i ostrogo ishemicheskogo povrezhdeniya mozga. Meditsinskiy zhurnal. 2008; 3: 100-102. [In Russ]

8. Almagor M., Keren A., Banai S. Increased C-reactive protein level after coronary stent implantation in patients with stable coronary artery disease. Am. Heart J. 2003; 145(2): 248-253. doi: 10.1067/mhj.2003.16.

9. Игитова М.Б., Воробьева Е.В., Осипова И.В., Гольцова Н.П. Роль системного воспаления в развитии кардиоваскулярной и акушерской патологии. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009; 1: 81-87.

Igitova M.B., Vorobieva E.V., Osipova I.V., Gol'tsova N.P. System inflammation role in cardiovascular and obstetric pathology. Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika. 2009; 1: 81-87. [In Russ]

10. Ellinor P.T., Low A., Patton K.K., Shea M.A., MacRae C.A. C-reactive protein in lone atrial fibrillation. Am. J. Cardiol. 2006; 97(9): 1346-1350. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.11.052.

11. Pirat B., Atar I., Ertan C., Bozbas H., Gulmez O., Müderrisoglu H. et al. Comparison of C-reactive protein levels in patients who do and do not develop atrial fibrillation during electrophysiologic study. Am. J. Cardiol. 2007; 100(10): 1552-1555. doi: 10.1016/j.amjcard.2007.06.056.

12. Байракова Ю.В., Иванов С.В., Казачек Я.В., Баздырев Е.Д., Малышенко Е.С., Кургузова Е.М. и др. Факторы риска развития суправентрикулярных нарушений ритма в госпитальном периоде после коронарного шунтирования. Сибирский медицинский журнал. 2011; 104(5): 44-47.

Bayrakova Y.V., Ivanov S.V., Kazachek Y.V., Bazdyrev E.D., Malysenko E.S., Kurguzova E.M. et al. Risk factors for inhospital supraventricular rhythm disturbances after coronary bypass surgery. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. 2011; 104(5): 44-47. [In Russ]

13. Байракова Ю.В., Григорьев А.М., Баздырев Е.Д., Казачек Я.В., Барбараш О.Л., Барбараш

Л.С. Роль субклинического воспаления в развитии сердечно-сосудистых осложнений у пациентов после коронарного шунтирования. Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2013; 6(3): 18-22.

Baïrakova Iu.V., Grigor'ev A.M., Bazdyrev E.D., Kazachek Ia.V., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Role of subclinical inflammation in development of cardiovascular complications in patients after coronary bypass grafting. Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya. 2013; 6(3): 18-22. [In Russ]

14. Байракова Ю.В., Баздырев Е.Д., Казачек Я.В., Головкин А.С., Матвеева В.Г., Кузьмина А.А. и др. Периоперационная динамика маркеров воспаления у пациентов с ишемической болезнью сердца, подвергшихся коронарному шунтированию. Цитокины и воспаление. 2012; 11(1): 55-59.

Bayrakova Yu.V., Bazdyrev E.D., Kazachek Ya.V., Golovkin A.S., Matveeva V.G., Kuzmina A.A. Perioperative dynamics of inflammatory markers in patients with coronary heart disease underwent coronary artery bypass grafting. Tsitokiny i vospalenie. 2012; 11(1): 55-59. [In Russ]

15. Байракова Ю.В., Казачек Я.В., Груздева О.В., Сергеева Т.Ю., Григорьев А.М., Иванов С.В. Периоперационная динамика С-реактивного белка у пациентов, подвергшихся коронарному шунтированию. Клиническая и лабораторная диагностика. 2013; 3: 3-6.

Bayrakova Yu.V., Kazachek Ya.V., Gruzdeva O.V., Sergeyeva T. Yu., Grigoriyev A.M., Ivanov S.V. The dynamics of C-reactive protein in the process of coronary artery bypass grafting in patients with ischemic heart disease. Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika. 2013; 3: 3-6. [In Russ]

16. Aviles R.J., Martin D.O., Apperson-Hansen C., Houghtaling P.L., Rautaharju P., Kronmal R.A. et al. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. Circulation. 2003; 108(24): 3006-3010. doi: 10.1161/01.CIR.0000103131.70301.4F.

17. Chung M.K., Martin D.O., Sprecher D., Wazni O., Kanderian A., Carnes C.A. et al. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. Circulation. 2001; 104(24): 2886-2891. doi: <http://dx.doi.org/10.1161/hc4901.101760>.

18. Anderson J.L., Allen Maycock C.A., Lappe D.L., Crandall B.G., Horne BD, Bair T.L. et al. Frequency of elevation of C-reactive protein in atrial fibrillation. Am. J. Cardiol. 2004; 94(10): 1255-

1259. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.07.108.

19. Барбараш О.Л., Байракова Ю.В., Понасенко А.В., Хуторная М.В., Кузьмина А.А., Казачек Я.В. и др. Связь полиморфизмов гена С-реактивного белка с развитием инфаркта миокарда и формированием мультифокального атеросклероза у пациентов с ИБС. Атеросклероз. 2015; 11(4): 11-19.

Barbarash O.L., Bayrakova Yu.V., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kuz'mina A.A., Kazachek Ya.V. The relationship of gene polymorphisms of C-reactive protein with the development of

myocardial infarction and formation of multifocal atherosclerosis in CHD patients. Ateroskleroz. 2015; 11(4): 11-19. [In Russ]

20. Marott S.C., Nordestgaard B.G., Zacho J., Friberg J., Jensen G.B., Tybjaerg-Hansen A. et al. Does elevated C-reactive protein increase atrial fibrillation risk? A Mendelian randomization of 47,000 individuals from the general population. J. Am. Coll. Cardiol. 2010; 56(10): 789-795. doi: 10.1016/j.jacc.2010.02.066.

Статья поступила 02.11.2016

Для корреспонденции:

Байракова Юлия Вячеславовна

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7(931) 286-92-30,

E-mail: bayakovayv@gmail.com

For correspondence:

Bairakova Yulia

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

Тел. +7(931) 286-92-30,

E-mail: bayakovayv@gmail.com

БИО- И ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА, ЗАСЕЛЕННЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ И ГЛАДКОМЫШЕЧНЫМИ КЛЕТКАМИ, ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ В БРЮШНУЮ АОРТУ МЫШАМ SCID

Ш. Б. СААЯ¹, И. С. ЗАХАРОВА^{1,2,3}, М. К. ЖИВЕНЬ^{1,2,3}, А. И. ШЕВЧЕНКО^{1,2,3},
А. М. СМЕРНОВА^{1,4}, П. П. ЛАКТИОНОВ^{1,3}, А. О. СТЕПАНОВА^{1,3}, А. В. РОМАЩЕНКО²,
А. М. ВОЛКОВ¹, Е. Л. ЗАВЬЯЛОВ², Е. А. ПОКУШАЛОВ¹, Л. Н. ИВАНОВА^{2,4},
С. М. ЗАКИАН^{1,2,3,4}, А. А. КАРПЕНКО¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия

²Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия

⁴Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Введение. Современное развитие химии и химических технологий позволяет изготавливать синтетические материалы, которые демонстрируют физические характеристики, близкие к характеристикам тканей организма, обладают удовлетворительной биосовместимостью и тромборезистентностью. Такие материалы востребованы в сосудистой хирургии, однако для их практического использования требуется повысить их биологические свойства, а именно способность формировать нормальный эндотелий на внутренней поверхности и клеточные слои внутри стенки. Биodeградируемые синтетические полимерные 3D-матрицы, заселенные функциональными эндотелиальными (ЭК) и гладкомышечными (ГМК) клетками реципиента, могут быть подходящим вариантом при реконструктивных оперативных вмешательствах на сосудах.

Цель исследования. Оценить био- и гемосовместимость тканеинженерных конструкций из поликапролактона, заселенных донорскими ЭК и ГМК в эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы. 3D-матрицы, изготовленные из поликапролактона с желатином методом электроспиннинга, заселяли *in vitro* человеческими ЭК и ГМК, которые были получены из сердечной ткани. Клетки культивировали на матрицах в течение 7 дней, затем имплантировали матрицы с клетками в брюшную аорту 23 мышей SCID. Для контроля 12 мышам были имплантированы 3D-матрицы без клеточного состава. Спустя 2, 4, 12 и 24 недели после имплантации выполняли УЗИ и МРТ брюшной аорты, иммуногистологические исследования эксплантационных заплат.

Результаты. Заплаты из поликапролактона, заселенные функциональными ЭК и ГМК, усиливают локальную неоваскуляризацию в области их имплантации с развитием васкуляризированной фиброзной капсулы, способствуют адгезии и пролиферации ЭК и ГМК, обеспечивают хорошую проходимость брюшной аорты мышей в течение 24 недель наблюдения.

Заключение. Клеточно-заселенные конструкции из поликапролактона могут быть использованы для создания пациент-специфических сосудистых трансплантатов.

Ключевые слова: тканевая инженерия сосудов, 3D-матрицы из поликапролактона с желатином, человеческие эндотелиальные и гладкомышечные клетки, поликапролактон.

BIO- AND HEMOCOMPATIBLE TISSUE-ENGINEERED POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS SEEDED BY HUMAN ENDOTHELIAL AND SMOOTH MUSCLE CELLS AFTER IMPLANTATION IN THE ABDOMINAL AORTA OF SCID MICE

SH. B. SAAYA¹, I. S. ZAKHAROVA^{1,2,3}, M. K. ZHIVEN^{1,2,3}, A. I. SHEVCHENKO^{1,2,3},
A. M. SMIRNOVA^{1,4}, P. P. LAKTIONOV^{1,3}, A. O. STEPANOVA^{1,3}, A. V. ROMASHENKO²,
A. M. VOLKOV¹, Y. L. ZAVYALOV², Y. A. POKUSHALOV¹, L. N. IVANOVA^{2,4},
S. M. ZAKIAN^{1,2,3,4}, A. A. KARPENKO¹

¹*Federal State Institution Academician E.N.Meshalkin Novosibirsk State Research Institute Of Circulation Pathology Rusmedtechnology, Novosibirsk, Russia*

²*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

³*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

⁴*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

Introduction. The modern development of chemistry and chemical technologies allow us to produce synthetic materials that exhibit physical characteristics similar to the characteristics of the tissues of the body, a satisfactory biocompatible and thromboresistant. Such materials are demanded in vascular surgery, but their practical use is required to improve their biological properties, namely the ability to form normal endothelium on the inner surface and the cell layers inside the wall. Biodegradable synthetic polymeric 3D matrices, populated by functional endothelial (EC) and smooth muscle (SMC) cells of the recipient can be a suitable option for reconstructive surgical interventions on the vessels.

The purpose. To evaluate bio - and hemocompatible of the tissue-engineered polycaprolactone scaffolds, seeded by donors EC and SMC in experiment in vivo.

Materials and methods. 3D-matrices (polycaprolactone+ gelatin) made by electrospinning method, seeded in vitro human EC and SMC, which were obtained from heart tissue. Cells were cultured on these matrices for 7 days, then were implanted in the abdominal aorta of 23 SCID mice. 3D matrices without cells were implanted 12 mice for control. After 2, 4, 12 and 24 weeks after implantation, performed ultrasound scan and MRI of the abdominal aorta, immune histological studies explanted patches.

Results. Polycaprolactone patches seeded by functional EC and SMC enhanced local neovascularization in the area of their implantation, with the development of a vascularized fibrous capsule, promote adhesion and proliferation of EC and SMC, provide good patency of the mice abdominal aorta during 24 weeks of observation.

Conclusion. Cell-populated polycaprolactone matrices can be used to create patient-specific vascular grafts.

Key words: tissue engineering of blood vessels, 3D matrices of polycaprolactone with gelatin, human endothelial and smooth muscle cells, polycaprolactone.

Введение

В настоящее время для восстановления проходимости артерий малого диаметра предпочтительными являются аутологичные сосуды, так как длительность их функционирования больше, чем искусственных протезов. В виду отсутствия у многих больных подходящих аутологичных сосудов часто используются искусственные протезы из полиэтиленерэфталата (ПЭТ) и политетрафторэтилена (ПТФЭ) [39].

Одним из вариантов изготовления протезов сосудов и 3D-матриц, пригодных для реконструирования стенки сосудов, является использование метода электроспиннинга. Изготовленные при помощи этой технологии материалы обладают хорошей механической прочностью, эластичностью, близкой к эластичности стенки сосудов. Нано/микроволокна, полученные при помощи этой технологии, укладываются в трехмерную структуру, которая представляет собой хорошую подложку для культивирования клеток [8]. В зависимости от используемого основного полимера и дополнительно введенных компонентов матрицы могут демонстрировать более или менее высокую биосовместимость, интегра-

цию с окружающими тканями, гемосовместимость [9, 11]

Наряду с использованием различных 3D-матриц для повышения гемо- и биосовместимости протезов сосудов были попытки эндотелизации внутреннего просвета клетками. Известно, что ЭК и ГМК, вырабатывая биологически активные вещества (БАВ) и межклеточный матрикс (МКМ), способствуют сохранению сосудистого просвета на долгое время [16,17]. В качестве источника сосудистых клеток для заселения тканеинженерных сосудистых скаффолдов были использованы мононуклеарные клетки костного мозга, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, однако испытания заселенных клетками скаффолдов не продемонстрировали существенного улучшения их биологических свойств [17, 40]. Следует отметить, что прочность связывания клеток с матриксом, и, следовательно, стабильность эндотелиального слоя в кровотоке зависит как от прочности взаимодействия клеток с материалом, так и от структуры материала [9,47]. Характер взаимодействия клеток с материалом меняется в зависимости от времени – с увеличением времени пролиферации

клеток на поверхности материала увеличивается прочность их прикрепления благодаря формированию структурированных актиновых филаментов и наработке межклеточного матрикса, кроме того, показан вклад плотности клеток при заселении [7].

В представленной работе мы исследовали способность ЭК и ГМК клеток, культивируемых на матриксе из ПКЛ с 10% желатина и малопроницаемым внутренним слоем, сохранять свою жизнеспособность, функциональный статус и способность поддерживать формирование эндотелия в условиях непрерывного кровотока.

Материалы и методы исследования

Для выполнения эксперимента нами был раз-

работан дизайн исследования, представленный на рисунке 1. Оценка био- и гемосовместимости проводилась на 35 мышах. Чтобы исключить индукцию иммунного ответа на человеческие клетки для эксперимента использовали иммунодефицитных мышей SCID линии Crl:SHO-PrkdcscidHrhr, которые содержались в ЦКП «SPF»-виварий ИЦиГ СО РАН.

1.1. Изготовление 3D матрикса из ПКЛ с 10% желатина и малопроницаемым внутренним слоем, её наполнение с ЭК и ГМК, полученными из кардиоэкспланта человека.

Синтетические биodeградируемые скаффолды из поликапролактона с 10% желатином кожи свиньи (Sigma, США, кат №G2500-100G) и малопроницаемым внутренним слоем (МПВС) изготовлены согласно статье [9].



Рисунок 1. Дизайн исследования

1.2 Получение клеток.

Человеческие ЭК и ГМК из миокарда получали по разработанному нами протоколу [10]. После механического измельчения фрагментов миокарда человека проводили ферментативный гидролиз в растворе 0,1% коллагеназы NB (Life Technologies) при 37 °С. Полученные клетки высаживали на пластик, обработанный человеческим коллагеном 4-го типа (Sigma), в культуральных средах, обогащенных факторами роста для эндотелиальных или гладкомышечных клеток EGM-2 и SmGM-2 (Lonza). Клетки культи-

вировались в условиях 5% CO₂, 37 °С. В полученных клетках наличие маркеров ЭК и ГМК и их функциональная способность была доказана методом проточной цитофлуориметрии, иммунофлуоресцентного окрашивания, электронной микроскопии.

1.3 Заселение 3D матрикса.

Схема заселения 3D матрикса из ПКЛ с 10% желатина представлена на рисунке 2. В процессе эксперимента для выявления пригодности клеточному заселению нами были протестированы различные сосудистые матриксы (ксеноперикард (NeoCor), децеллюляризированная гомоартерия,

ПТФЭ (Gore-Tex), ПЭТ (Intergard) матриксы полученные методом электроспиннинга – ПЛГА и ПКЛ с МПВС). Площадь заселяемой поверхности подложек составляла 2 см². Заселение двумя типами клеток проводили постадийно: сначала одну из поверхностей заселяли гладкомышечными клетками в среде SmGM (Lonza). Через 24 часа подложку переворачивали и заселяли другую сторону эндотелиальными клетками в комбинированной

среде EGM+SmGM (Lonza). Время культивирования и оценка проводились в период от 2 до 7 дней. Клетки культивировали в условиях 5% CO₂, 37 °C. Учитывая сохранение жизнеспособности заселенных клеток и удовлетворительную наработку межклеточного матрикса по результатам иммунофлуоресцентного окрашивания в составе ПКЛ с МПВС, этот материал выбран для дальнейшего исследования *in vivo* [11].

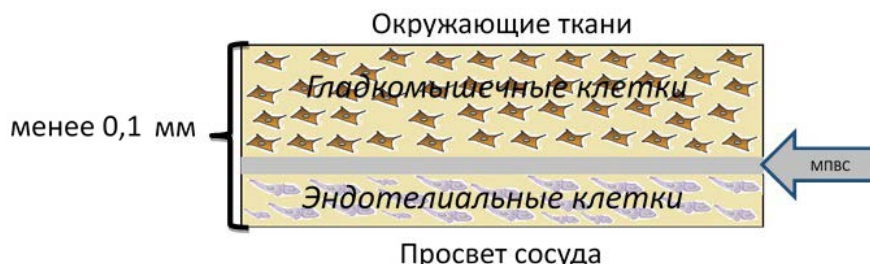


Рисунок 2. Заселение 3D матрикса из ПКЛ+МПВС с ЭК и ГМК

1.4 Протокол операции.

3D матриксы, заселенные клетками, и контрольные 3D матриксы без клеток были имплантированы в брюшную аорту 35 самок мышей SCID, в возрасте 6-7 недель, средняя масса тела 24±4гр. Мыши разделены на 2 группы: в экспериментальную группу вошли 23 мыши, которым имплантированы заплатки с предварительным клеточным заселением, контрольную группу составили 12 мышей с имплантированными заплатками без клеток. Исследование на животных проводили, соблюдая «Правила работы с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 и приложения к приказу Министерства здравоохранения СССР № 565 от 04.10.1977).

После обработки операционного поля под ингаляционным наркозом 1-3% изофлюрана в 100% кислороде при скорости потока 1L/min под 10×-40× увеличением срединным лапаротомным доступом выделяли брюшную аорту ниже почечных артерий до бифуркации аорты. Аорту ниже почечных артерий и выше бифуркации брали на держалки (нити prolene 8/0). Далее проводили клампинг аорты держалками. Затем выполняли продольную аортотомию брюшной аорты длиной до 0,5мм. Далее в аортотомический дефект вшивалась заплатка с размерами 0,5х0,5мм 4 узловыми швами нитью «Premilene» 10/0. Запуск кровотока. Гемостаз. Послойное зашивание передней брюшной стенки и кожи нитями 6/0. Об-

работка антисептиком. Асептическая повязка. После операции мыши не получали антикоагулянт или антиагреганты.

1.5 Оценка проходимости брюшной аорты по MPT и УЗИ.

Прогнозируемость брюшной аорты оценивали через 4, 12 и 24 недели после операции. Исследование проводили с помощью магнитно-резонансной томографии (MPT) на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тесла. Для этого использовали T1-взвешенные изображения, полученные методом FLASH (Fast Low Angle SHot) с параметрами импульсной последовательности (TE = 2,5 мс, TR = 200 мс), и изображением (размер 3 × 3 см; на матрице 128 × 128 точек; толщиной срезов 0.31 мм и расстоянием между срезами 0,33 мм).

В эти же сроки проводили ультразвуковое исследование. Под наркозом тилетамил (золетил 50, 5 мг/кг) и ксилазин (ксилаВет, 3 мг/кг) оценивали проходимость аорты, скорости кровотока в области имплантированной заплатки через 2, 4, 12 и 24 недели при помощи аппарата Vivid 4 с линейным сосудистым датчиком.

1.6 Эксплантация заплат, гистологическое и иммуногистохимическое исследования *ex vivo*.

Биологические материалы забирали на 2, 4, 12 и 24 неделе после имплантации. После однократного подкожного введения тилетамил (золетил 50, 5 мг/кг) и ксилазин (ксилаВет, 3 мг/кг) под 10×-40× увеличением лапаротомным доступом выделяли брюшную аорту. После пережа-

тия аорты выполняли ее поперечное иссечение проксимальнее и дистальнее заплаты. Мышей забивали смещением шейных позвонков. После продольного рассечения задней стенки аорты из забранного материала изготавливали два вида препаратов: 1) фиксировали материал для иммунофлуоресцентной окраски и 2) заключали в реактив О.С.Т. – compound (Tissue Tek) для приготовления криосрезов, охлаждали до -22°C . С помощью прибора Криостат НМ 550 изготавливали криосрезы толщиной 8-10 мкм. Препараты криосрезов фиксировали в течение 30 минут в 4% растворе формальдегида с последующими отмывками PBS (2 раза по 30 мин). Для иммуногистохимической окраски пермеабелизовали препараты обработкой 1% Triton X-100 в течение часа на шейкере при комнатной температуре с последующими отмывками PBS (2 раза по 30 мин.). Центры неспецифической сорбции ингибировали, инкубируя препараты в PBS с 1% BSA (bovine serum albumin) в течение 30 минут. Затем препараты инкубировали с первичными антителами в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$ и отмывали от избытка антител PBS (2 раза по 15 минут) при комнатной температуре. Затем препараты инкубировали со вторичными антителами, меченными флуорохромом, в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте, отмывали от избытка антител PBS как описано выше. Ядра клеток окрашивали 0,001% DAPI. Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 780 (Zeiss) в ЦКП Микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН. Список использованных антител и их каталожные номера представлены в нашей ранее опубликованной научной статье [11].

1.7 Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

Предобработка криосрезов перед FISH

Препараты криосрезов инкубировали в ксиле в течение 10 мин. с последующей дегидратацией в 100% этаноле 2 раза по 5 мин., далее по 5 мин в 90%, 80%, 70-75%, 50% этаноле. После этого препараты отмывались в PBS 15 мин. и инкубировались в 1% растворе Triton X-100 в течение ночи. На следующий день препараты отмывались в PBS 15 мин., переносились в предварительно разогретый до 80°C на водяной бане 10 mM раствор цитрата натрия и инкубировались в течение 1 часа. Далее препараты споласкивали в PBS и инкубировали 10 мин. в предвари-

но разогретом до 37°C 0.01% растворе пепсина. После этого препараты переносили в стакан с 1% BSA, далее – инкубировали 2 раза по 5 минут в 2XSSC (раствор хлорида и цитрата натрия, (1XSSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0) с последующей инкубацией в растворе Triton X-100 (0.7%)/HCl (0.1N). Препараты отмывались в 2XSSC 2 раза по 5 минут.

Подготовка зондов

В качестве зондов для детекции клеток человека и мыши использовались фракции ДНК быстроренатурирующих повторов Human Cot-1 DNA (15279011, Thermo Fisher Scientific) и mouse Cot-1 DNA (18440016, Thermo Fisher Scientific). Зонды были помечены флуоресцентными красителями biotin 16-dUTP (11093070910, Roche) или digoxigenin-11-dUTP (11558706910, Roche) в 30 циклах DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR) с праймером MW6 [48]. Меченые зонды Cot-1 ДНК человека и мыши (по 100 нг каждого зонда) смешивали с ДНК спермы лосося (1 мг/мл), добавляли 2 объема 100% этанола и лиофилизировали в вакуумной центрифуге. Лиофилизированные зонды растворяли в 10 мкл гибридизационной смеси, содержащей 50% формамида, 10% декстран-сульфата, 2XSSC, 1% Tween20 в течение 1 часа на водяной бане при 37°C . Зонды в гибридизационной смеси денатурировали 5 мин. при 75°C и быстро переносили в лед во избежание обратной ренатурации.

Гибридизация зондов с препаратами криосрезов

Препараты криосрезов были денатурированы в предварительно разогретой смеси 70% formamide/2XSSC 20 мин. при 70°C с последующей инкубацией в 2XSSC 2 мин. Препараты высушивали при комнатной температуре. 10 мкл зонда наносили на предварительно подогретое покровное стекло, совмещали его с препаратом и инкубировали во влажной камере на водяной бане при 37°C в течение ночи. На следующий день препараты отмывали в растворе 2XSSC/50% formamide 4 раза по 3 мин. при 37°C на водяной бане, затем в 2XSSC 4 раза по 3 мин. при 37°C и переносили в раствор 4XSSC/0.1% Tween 20 комнатной температуры.

Детекция

Биотинилированные зонды детектировали в системе fluorescein-avidin (A-2011, Vector Laboratories)/biotinylated anti-avidin system (BA-0300, Vector Laboratories). Меченную ди-

гоксигенином ДНК детектировали в системе anti-digoxigenin rhodamine Fab fragments (11207750910, Roche). Ядра окрашивали DAPI. Результаты гибридизации визуализировали при помощи микроскопа Nikon Ni-E.

1.8 Окрашивание заплат с гематоксилином и эозином.

По вышеописанной методике выполняли криосрезы заплат. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопирование препаратов выполняли посредством световой микроскопии с помощью микроскопа AXIO Lab.A1 ZEISS при увеличениях 100× и 400×. На полученных микрофотографиях оценивали строение эндотелиального слоя, структуру синтетической заплаты и наличие в них клеток, а также состав наружной фиброзной капсулы.

Результаты

Этапы имплантации заплаты показаны на рисунке 3. При прошивании нитями прорезывания и деформации заплат не отмечались. Места проколов не зияли, кровотечения из них после запу-

ска кровотока не было. Это связано с наличием в этих 3D-матрицах МПВС. Он выступает в роли эластомерного слоя, плотно обволакивающего нити и не позволяющего крови течь через прокол. Заплата к аорте прилегала плотно за счет волокнистой структуры, которая обеспечивает многочисленные контакты со стенкой аорты. Хирургически значимого кровотечения после запуска кровотока не было, гемодинамически значимой деформации области имплантации заплат не наблюдалось, пульсация аорты проксимальнее и дистальнее места операции была удовлетворительной.

На первые сутки после операции у двух мышей наблюдалась тотальная мышечная контрактура задних конечностей. Вероятно, аорта была критически сужена при наложении сосудистых швов, что привело к тромбозу аорты. Одна мышшь из контрольной группы на 20-й неделе умерла по причине, не связанной с оперативным вмешательством. Остальные мыши были живы в течение 24 недель.

In vivo оценка имплантированной в брюшную аорту заплаты.

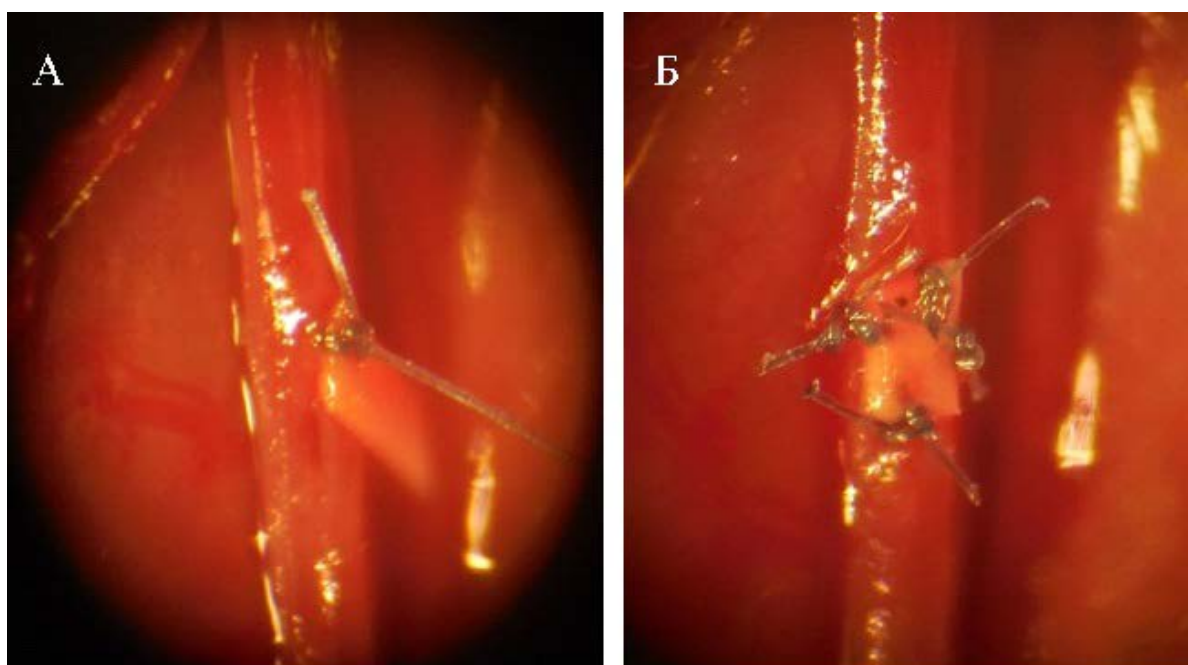


Рисунок 3. Имплантация заплаты. А – наложение 1 узлового шва; Б – конечный вид

Результаты УЗИ и МРТ брюшной аорты исследуемых мышей представлены на рис. 4 и 5. По данным ультразвукового триплексного исследования, у всех мышей контрольной и экспериментальной групп на всех контрольных точках брюшная аорта была проходима, скорость кровотока в

пределах нормы с магистральным типом кровотока (рис. 4). Учитывая сохранение нормального кровотока без повышения линейной скорости кровотока в области имплантации заплаты, можно исключить гемодинамически значимое сужение и/или окклюзию брюшной аорты. Таким образом,

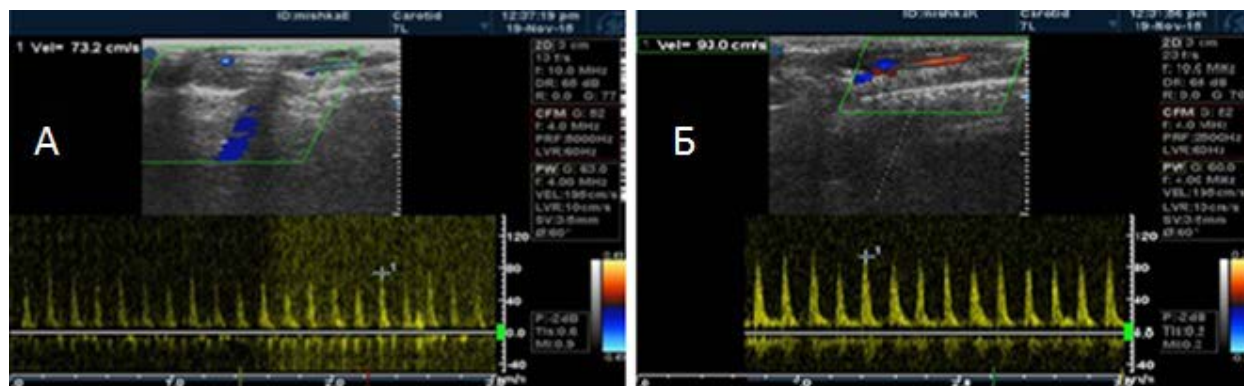


Рисунок 4. Ультразвуковая оценка кровотока по брюшной аорте через 2 недели после имплантации заплат. Отмечается кровоток магистрального типа. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа

это указывает на то, что имплантированные заплаты в обеих группах обеспечивают хорошую тромборезистентность в течение 24 недель.

Проприодимость брюшной аорты также была подтверждена по результатам МРТ брюшной полости. Как в экспериментальной, так и в кон-

трольной группах визуализированы брюшная аорта и подвздошные артерии без дефектов наполнения, что исключает гемодинамически значимые стенозы или окклюзии брюшной аорты. Отсутствие аневризм и разрывов заплат характеризует их механическую прочность (рис. 5).

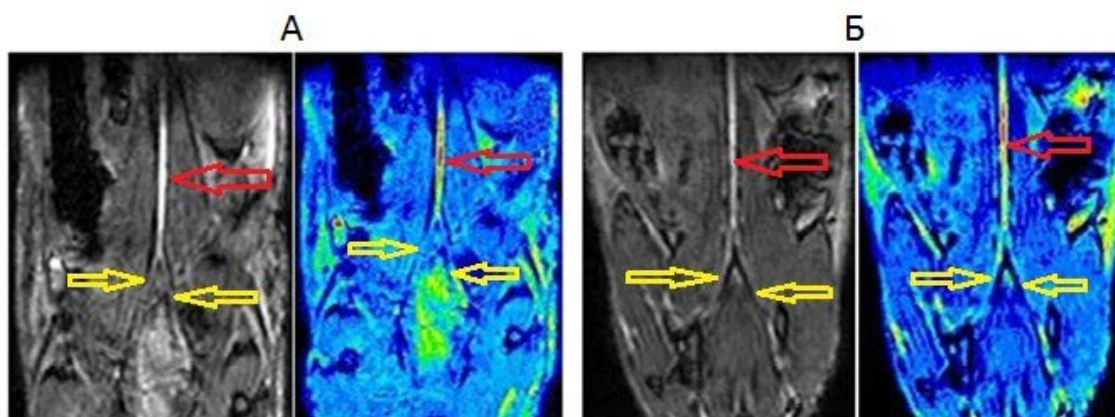


Рисунок 5. МРТ брюшной аорты в ангиорежиме через 4 недели после операции. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа. Красными стрелками указана проходимость брюшной аорты, желтыми стрелками указаны проходимые подвздошные артерии

Иммунофлуоресцентное окрашивание заплат имплантированных в брюшную аорту мышам (SCID).

После МРТ и УЗИ диагностики брюшную аорту резецировали вместе с имплантированной синтетической заплатой для дальнейшего иммуногистологического исследования. При выделении аорты в экспериментальной группе, где имплантированы заплаты с ЭК и ГМК, визуально наблюдалась более выраженная локальная неоваскуляризация в области наружной поверхности имплантированной заплаты (рис. 6А), в отличие от контрольной группы (рис.

6Б), где новообразованные сосуды были менее развиты.

После продольного рассечения задней стенки брюшной аорты на внутренней поверхности отмечается область имплантированной заплаты, которая контактировала с кровью после имплантации (рис.7). Визуально в этой области отмечается незначительное углубление. Дном этого углубления является заплата, покрытая полупрозрачной пленкообразной субстанцией, переходящей на внутреннюю поверхность аорты.

При исследовании предварительно заселенных заплат уже спустя 2 недели после имплан-

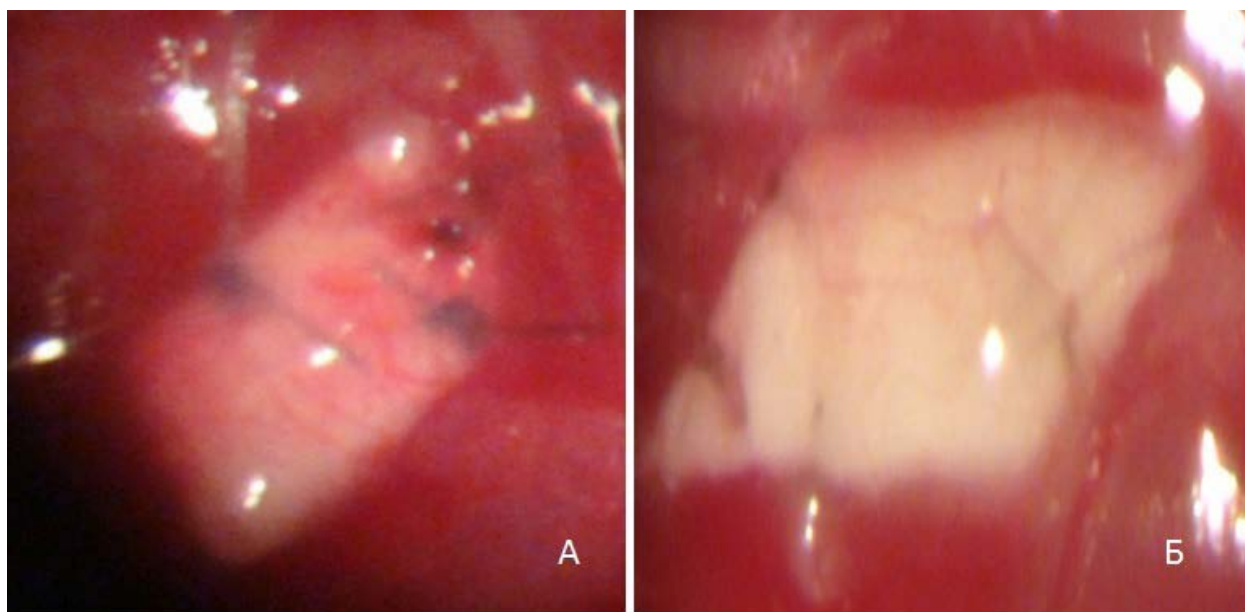


Рисунок 6. Макроскопический вид заплаты снаружи. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа

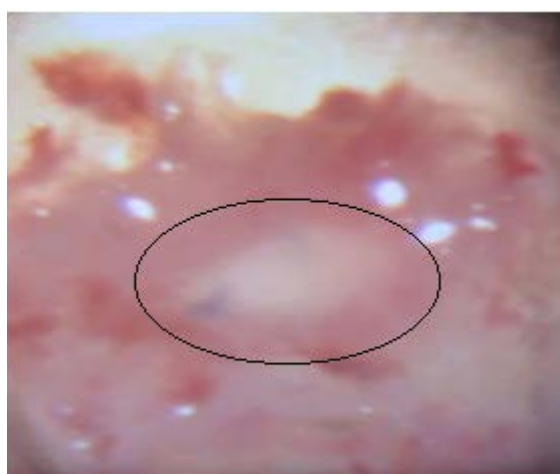


Рисунок 7. Макроскопический вид заплаты со стороны внутренней стенки аорты

тации на внутренней поверхности заплат были обнаружены не только человеческие эндотелиальные клетки (hCD31), но и эндотелиальные клетки мыши (mCD31) (рис. 8А). На 4 и 12 неделях по результатам исследований на внешней стороне заплат можно уверенно идентифицировать заселенные *in vitro* гладкомышечные клетки (αSMA, SM Myosin), которые ограничиваются областью проекции заплаты. При этом мышинный маркер ЭК (mCD31) с 4-й недели в области проекции заплат прослеживается в минимальном количестве. Несмотря на хорошую плотность клеточных ядер в области проекции заплат, флуоресценция маркера человеческих ЭК на 24-й неделе незначительно уменьшается в отличие от 12 недель. Флуоресцен-

ция маркеров гладкомышечных клеток на 12-й неделе ограничивается пределами заплат, а на 24-й неделе выходит за пределы проекции заплат. Кроме того, в экспериментальных заплатках динамика синтеза межклеточного матрикса на протяжении всего периода наблюдения остается удовлетворительной (рис. 8 Б-Г).

Было обнаружено, что спустя 2 недели после имплантации предварительно не обработанная клетками заплата заселяется собственными мышинными эндотелиальными и гладкомышечными клетками. При этом заселяющие заплату мышинные клетки не склонны к наработке межклеточного матрикса. После 12 и 24 недель специфические маркеры ЭК и ГМК обнаружи-

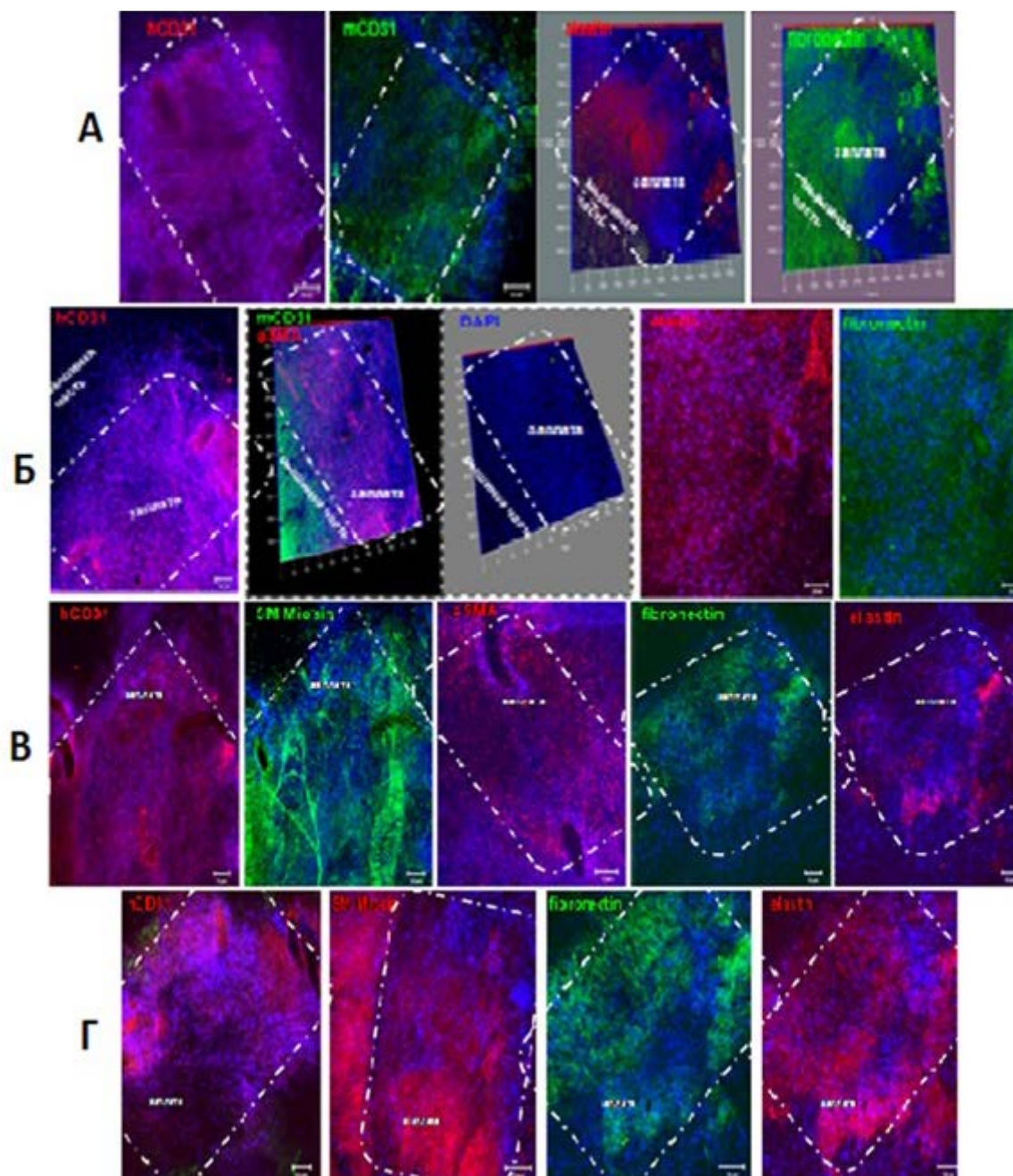


Рисунок 8. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеточно-заселенных заплат на контрольных точках исследования А – 2 недели, Б – 4 недели, В – 12 недель, Г – 24 недели (пунктирными линиями отмечены граница заплат)

ваются в незначительном количестве. Нарботка фибронектина эндотелиальными клетками в динамике уменьшается, однако эластин, вырабатываемый гладкомышечными клетками, сохраняется, хотя и в незначительном количестве (рис.9).

Для того чтобы оценить наличие человеческих клеток, которыми были заселены заплаты, дополнительно была выполнена флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) криосрезов трансплантатов

с флуоресцентно-меченой ДНК человека и мыши. Было обнаружено, что в предварительно клеточно-заселенных заплатах отмечаются ДНК мыши (mCot) и человека (hCot) (рис.10). Этот метод исследования также подтверждает, что заселенные человеческие клетки не теряются и поддерживают жизнеспособность в течение 4-5 недель в условиях непрерывного кровотока.

Гистологическое исследование в экспериментальной группе показало, что ядра клеточных

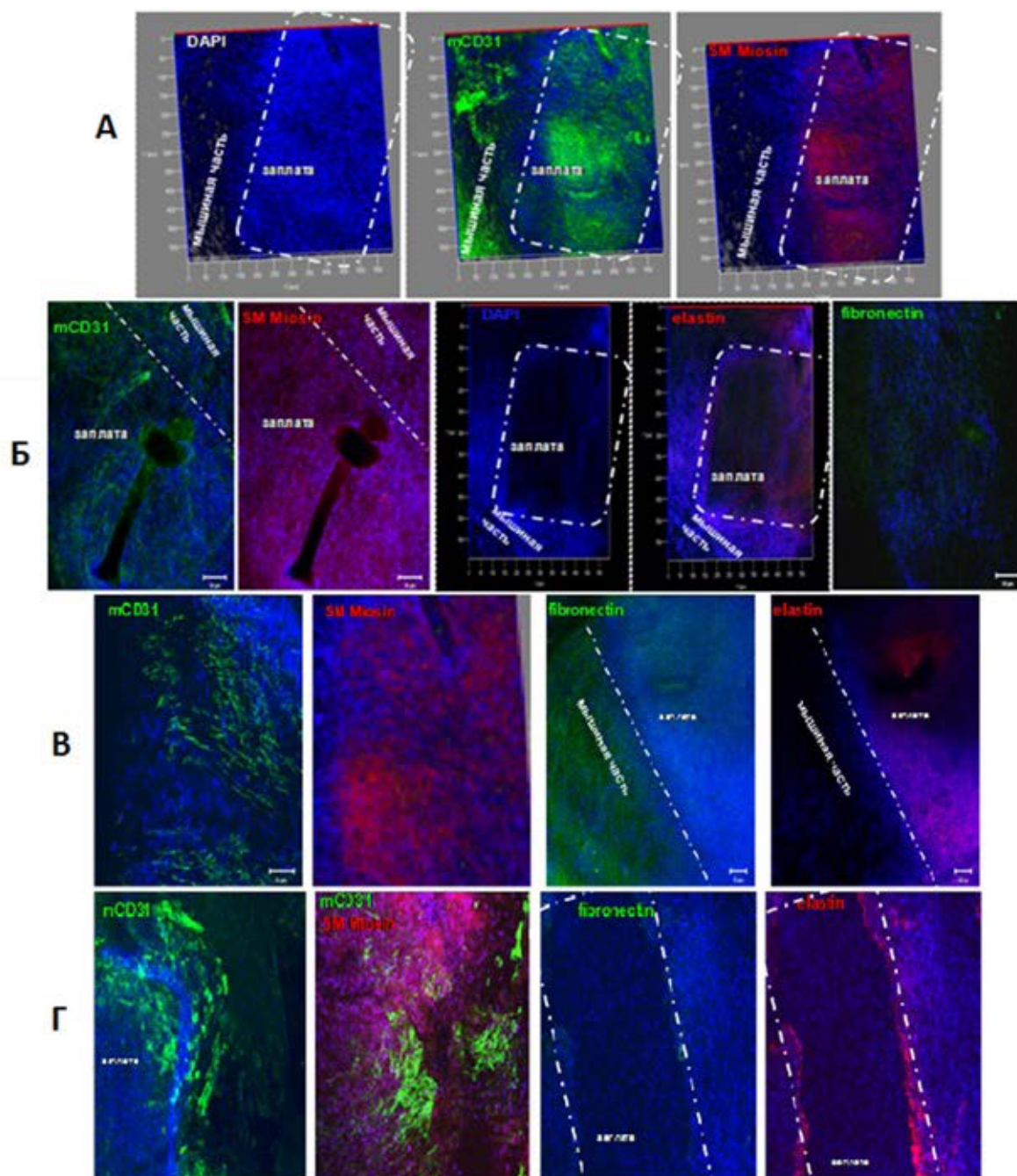


Рисунок 9. Иммунофлуоресцентное окрашивание контрольных заплат на контрольных точках исследования А - 2 недели, Б - 4 недели, В - 12 недель, Г - 24 недель (пунктирными линиями отмечены граница заплат)

элементов в толще заплат прослеживаются на протяжении всего периода наблюдения по всех контрольных точках (рис. 11, А-Г). На внутренней стороне заплат, контактировавших с кровотоком, в течение всего эксперимента визуализирован монослой эндотелиоцито-подобных клеток. Уже со второй недели на наружной поверхности клеточно-заселенных заплат отмечается формирование фиброзной капсулы с постепенным ее

утолщением. На всех сроках исследования новообразованная капсула состоит из плотной фиброзной ткани с большим содержанием клеток гладкомышечного и фибробластического типа с участками формирования микрососудов.

Клеточные ядра в толще контрольных заплат при окрашивании гематоксилином и эозином визуализируются на 2-й и 4-й неделях. Это указывает на то, что структура с 3D-матриц не пре-

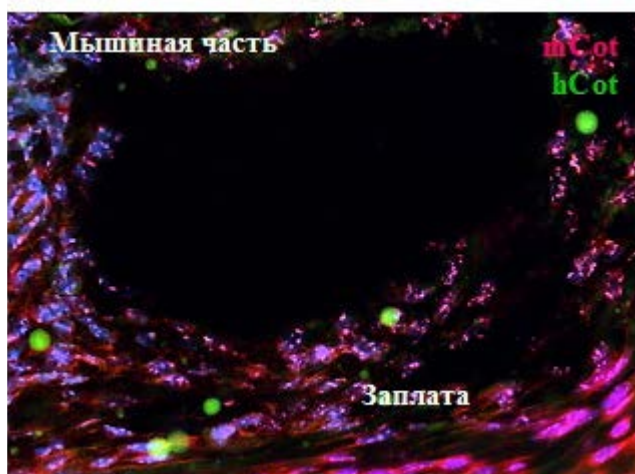


Рисунок 10. Поперечный срез заплата с зондами ДНК мыши (mCot) и человека (hCot). FISH (Флуоресцентная in situ гибридизация) через 4 недели

пятствуют миграции клеток внутрь (рис. 11 Д,Е). Несмотря на это, через 12 и 24 недели гистологические исследования показывают уменьшение количества клеточных ядер в составе заплата (рис. 11, Ж,З). Вероятно, заплата контрольной группы *in vivo* заселяется в первую очередь не пролиферирующими клетками крови (например, лимфоцитами), которые впоследствии погибают путем апоптоза [1]. Первичное заселение не пролиферирующими клетками может создавать препятствие для миграции других клеток и формирования эндотелиального монослоя. В некоторых заплатах контрольной группы отмечались участки разрыхления и даже отсутствия волокон синтетической матрицы. В этих местах детектировались как отдельные коллагеновые волокна, так и очаги фиброза. Можно предположить, что при отсутствии функциональных клеток в составе 3D-матрикса происходит более быстрая его деградация, которая может привести к частичной потере структурной целостности заплата. По внутренней поверхности заплата контрольной группы на всех этапах исследования целостного монослоя эндотелиоцито-подобных клеток не было отмечено, в отличие от экспериментальной группы. Наружная фиброзная капсула в этой группе характеризуется менее тонким слоем из плотной фиброзной ткани с незначительным содержанием фибробластоподобных клеток.

Обсуждение

В доступной научной литературе описано множество попыток изготовления 3D-матрик-

сов для тканевой инженерии сосудов. Были отестированы как синтетические, так и природные полимеры, стабильные и биodeградирующие матриксы, и в том числе с различным клеточным наполнением [17,40]. Были предприняты попытки изготовления клеточно-наполненных матриксов. Тем не менее, до настоящего времени широкого применения в клинической практике такие протезы сосудов и материалы, из которых они изготовлены, не получили. Первые попытки их клинического применения имели место в педиатрии и в качестве гемодиализных шунтов [12,13]. Проблемы протезирования сосудов маленького диаметра упираются в необходимость формирования однослойного эндотелия, нормальное функционирование которого требуется для предотвращения гиперплазии интимы и стенозирования протеза или места восстановления дефекта в длительной перспективе. Несмотря на ряд неудачных попыток заселения протезов сосудов клетками перед их имплантацией, тем не менее, такой способ подготовки протеза к заселению, рассматривается как перспективный [24,25]. Действительно, не только клетки как таковые, но и «подготовленная» такими клетками среда (внеклеточный матрикс, а именно его состав, ориентация и т.д.) может обеспечить наиболее привлекательные условия для адгезии клеток – предшественников эндотелиоцитов и пролиферации эндотелиальных клеток в замещаемом участке [40].

В соответствии с имеющимися данными, после имплантации протезов сосудов с заранее сформированным эндотелиальным слоем большинство клеток открепляется от внутренней

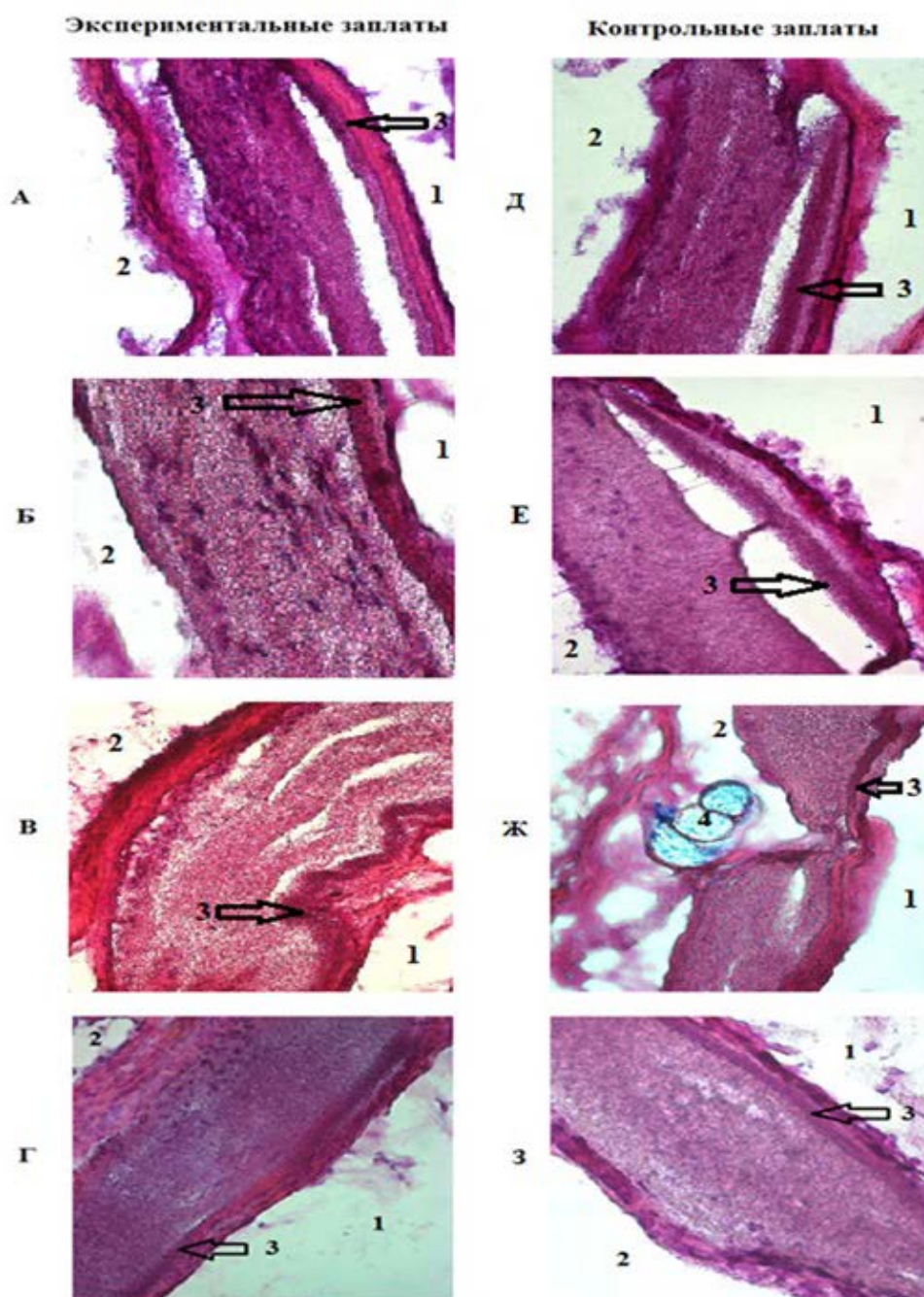


Рисунок 11. Поперечные криосрезы заплат (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 100$ и 400): А – через 2 недели, Б – через 4 недели, В – через 12 недель, Г – через 24 недели. 1 – внутренняя сторона заплат, контактировавшая с кровотоком; 2 – внешняя сторона заплат, контактировавшая с окружающими тканями; 3 – малопроницаемый внутренний слой (МПВС); 4 – шовный материал (Premilene 10/0)

стенки в процессе операции или под действием тока крови [43,44]. Оставшиеся клетки, тем не менее, своим паракринным эффектом могут предотвратить острый тромбоз трансплантатов в раннем послеоперационном периоде [45,46].

Как уже упоминалось во введении, прочность

связывания клеток с матриксом зависит как от прочности взаимодействия клеток с материалом, так и от структуры материала [47]. В нашем исследовании *in vitro* мы установили, что структура 3D-матрицы из ПКЛ с МПВС способствует миграции клеток в толщу заплат с обеспечением

хороших условий для жизнедеятельности иммигрированных клеток. Narutoshi и др. предполагают, что заселенные клетки погибают путем апоптоза [1], хотя еще одним фактором, уменьшающим количество прикрепленных к поверхности полимерных матриц клеток, является также и их механическое смывание [7, 43, 44].

В качестве каркаса для ТИС используют различные материалы – как биологические [2,4], так и синтетические [3,5,6]. В нашей предыдущей статье [11] мы сравнили разные виды материалов и показали, что синтетические каркасы, полученные методом электроспиннинга, обеспечивают более удовлетворительное заселение клетками, их адгезию и пролиферацию в отличие от ксеноперикарда [18,19], децеллюляризированной гомоартерии [20,21,22], ПТФЭ и ПЭТ [23,24,25,7].

Для оценки биомеханических свойств тканеинженерных конструкций важным этапом является *in vivo* эксперимент с созданием условий непрерывного кровотока. По литературным данным, встречаются работы с применением биореакторов, которые имитируют пульсирующий кровоток [7,26]. Большинство ученых исследуют созданные ТИС после имплантации в сосудистое русло разным видам животным, например, свиньям, овцам, собакам и т.д. При имплантации ТИС в венозное русло, где давление ниже, чем в артериях, эти протезы могут ремоделироваться в неотканы, похожие на нативные вены. Такие результаты получены после имплантации в нижнюю полую вену собаке и мышши [27,28]. Также возможно использование ТИС для каво-пульмонального шунтирования [12]. В артериальной позиции клеточно-заселенные конструкции имели достаточную механическую прочность и проходимость до 26 недель [29,30]. Причем эти материалы не уступают по срокам проходимости ПТФЭ [31,32].

В литературе встречаются работы, в которых для подавления иммунитета у животных при ксенотрансплантации используются фармакологические препараты [33-35]. Однако существуют специальные линии иммунодефицитных мышей и крыс, у которых имеются генетические мутации, приводящие к неспособности вырабатывать функциональные Т- и В-лимфоциты, что приводит к стойкому ослаблению иммунитета. В связи с этим таких животных стали применять и для изучения тканеинженерных сосудов [36].

В 2009 году Tamar и др. для исследования использовали иммунодефицитных мышей. Они сконструировали сосудистый каркас из биodeградируемых полимеров с внутренним диаметром 700 мкм. Получили ЭК и ГМК из аорты человека, которые культивировали в специальных коммерческих средах EGM и SmGM фирмы LONZA. Затем после заселения синтетической матрицы сосудистыми клетками выполнили имплантацию созданной тканеинженерной конструкции в брюшную аорту 30 мышам. За период наблюдения от 4 дней до 1 года случаев разрыва, тромбоза и стеноза трансплантатов по УЗИ и микро-КТ ангиограмм не наблюдалось. По гистологическому анализу все трансплантаты показали хорошее ремоделирование с формированием монослоя эндотелия, а гладкомышечный слой содержал ГМК и межклеточный матрикс (коллаген, эластин) [36].

В 2014 г. S.Tara и др. предположили, что бесклеточные трансплантаты могут не уступать в биосовместимости и тромборезистентности. Они провели эксперимент, в котором прооперировали 28 мышей. Они разработали тканеинженерный сосуд из биоразлагаемых полимеров с внутренним диаметром 500-600 мкм, толщиной стенки 250 мкм. В послеоперационном периоде проводили неинвазивную диагностику УЗИ и КТ ангиографию. Период наблюдения составляли от 4 до 12 месяцев. По результатам КТ ангиографии исследователи установили аневризматические изменения почти половины имплантированных трансплантатов. По гистологическим срезам было выявлено образование монослоя интимы и гладкомышечного слоя с высоким содержанием эластина и коллагена. Через 12 месяцев на некоторых трансплантатах наблюдались кальцифицированные отложения, активность макрофагов в области остаточного синтетического материала была выше, чем в нормальной аорте. Это указывает на длительную воспалительную реакцию на синтетический полимерный сосудистый каркас [37].

В нашем исследовании источником ЭК и ГМК является миокард человека, из которого, по литературным данным, сосудистые клетки ранее не выделяли. Метод их выделения, разработанный нашей группой, описан в статье [10]. Стоит отметить, что доля ГМК среди клеток, выделенных из миокарда, изначально составляла 88%. При культивировании этих клеток в среде SmGM доля ГМК клеток увеличилась до 94%.ЭК клет-

ки после магнитного сортирования культивировали в среде EGM [10]. Важно отметить, что при хирургическом лечении сосудов используют не только трубчатые протезы, но и часто выполняют пластические операции при помощи синтетических или биологических заплат. Именно такой подход был использован в представленном исследовании: для имплантации в брюшную аорту мышам в качестве заплат мы использовали 3D-матрицы из ПКЛ с МПВС с толщиной 50-70 мкм, размером 500x500 мкм.

Имплантация заплаты осуществлялась 4 узловыми швами нитью Premilene 10/0. Важно отметить, что механические свойства заплат при наложении швов были сопоставимы с механическими свойствами стенки аорты. Время достижения гемостаза после запуска кровотока составляло до 1 минуты, что предотвращало значимую кровопотерю. Стоит отметить особенности структуры 3D-матриц, а именно наличие в них МПВС, который предотвращал пропитывание протеза кровью и попадание клеток крови во всю толщину стенки. Чрезмерное пропитывание стенки заплат тромбоцитами могло привести к развитию тромбоза. Отсутствие разрывов и аневризм заплат указывает на достаточную их прочность и применимость в клинической практике. Учитывая то, что ЭК и ГМК выделяют БАВ, вызывающие ангиогенез, можно предположить их паракринный эффект, который наблюдается в нашей экспериментальной группе, где неоваскуляризация была более выражена, чем в контрольной группе без клеточного заселения.

По нашим данным, контрольные бесклеточные 3D-матрицы через 24 недели после имплантации содержали минимальное количество коллагена и эластина в отличие от экспериментальной клеточно-заселенной группы, где наработка межклеточного матрикса оставалась удовлетворительной в течение этого периода.

Одним из важных требований для тканеинженерных 3D-матриц является инфильтрация клеток стенки трансплантата для обеспечения поддержания жизнеспособности и способности наработки межклеточного вещества. Т. Siguira и др. показали, что тканеинженерные сосудистые матрицы в *in vivo* после имплантации в брюшную аорту мышам могут заселяться клетками хозяина, что также обеспечивает наработку межклеточного матрикса заселенными клетками. При этом они выявили,

что размеры пор не играют ключевую роль для миграции клеток [41]. Мы показали, что 3D-матрицы из ПКЛ с МПВС обеспечивают миграцию клеток в свою стенку *in vitro* и *in vivo*. Мы отметили, что часть ЭК в экспериментальных заплатах в начальном периоде покидают заплату, а оставшиеся клетки прочно связываются волокнами заплат и остаются в течение 24 недель.

Возможность миграции клеток с наружной во внутреннюю поверхность стенки протеза показали V. Catto и др., имплантировав трубчатые протезы в подкожную клетчатку экспериментальному животному на 15 дней. С наружной стороны этих протезов сформировалась тонкая фиброзная капсула, состоящая, в основном, из фибробластов [42]. Фиброзная капсула по наружной поверхности исследованных нами заплат отличалась в обеих группах. В контрольной группе она была представлена более тонким слоем плотной фиброзной ткани с незначительным содержанием фибробластов. А в экспериментальной группе толщина фиброзной капсулы была большей, содержала микрососуды и клетки гладкомышечного и фибробластического типа. Это свидетельствует о том, что посредством паракринного эффекта предварительно заселенных клеток происходит хорошая интеграция трансплантатов с окружающими тканями. Это позволяет поддерживать взаимосвязь между ними, в том числе обмен и транспорт питательных веществ, клеточный и гуморальный иммунитет и др.

Выводы

1. Синтетическая 3D-матрица из ПКЛ с МПВС, заселенная с внутренней стороны ЭК и наружной стороны ГМК, обеспечивает образование функционального эндотелиального монослоя на внутренней поверхности и наружной фиброзной капсулы, содержащей участки микрососудов и клетки гладкомышечного и фибробластического типа *in vivo*, в отличие от аналогичных 3D-матриц без клеточного заселения.

2. Синтетические 3D-матрицы из ПКЛ с МПВС, апплицированные ЭК и ГМК, за счет новообразованного эндотелиального монослоя обеспечивают хорошую проходимость после имплантации в аорту мышей в течение 24 недель, с наружной стороны характеризуются более активной интеграцией с окружающими тканями, в отличие от матриц без клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Hibino N., Duncan D.R., Nalbandian A., Yi T., Qyang Y., Shinoka T., Breuer C.K. Evaluation of the Use of an iPS Cell Sheet for the Construction of Tissue Engineered Vascular Grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 March; 143(3): 696–703. doi:10.1016/j.jtcvs.2011.06.046.
- Vivek A. Kumar, Jeffrey M. Caves, Carolyn A. Haller, Erbin Dai, Liying Li, Stephanie Grainger, Elliot L. Chaikof. Acellular vascular grafts generated from collagen and elastin analogs. *Acta Biomater.* 2013 Sep; 9(9): 8067–8074. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.024>
- Isayama N., Matsumura G., Sato H., Matsuda S., Yamazaki K. Histological maturation of vascular smooth muscle cells in in situ tissue-engineered vasculature. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.006>
- Sion G. Jones, MD, MRCS, Yanhua Hu, MD, Qingbo Xu, MD, PhD, and Marjan Jahangiri, MD, FRCS (CTh). Stem Cells Accumulate on a Decellularized Arterial Xenograft In Vivo. <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.02.023>
- Mirensky T.L., Nelson G.N., Brennan M.P., Roh J.D., Hibino N., Yi T., Shinoka T., Breuer C.K. Tissue-engineered arterial grafts: long-term results after implantation in a small animal model. *J Pediatr Surg.* 2009 Jun; 44(6):1127–32. doi:10.1016/j.jpedsurg.2009.02.035
- Tara S., Kurobe H., Maxfield M.W., Rocco K.A., Yi T., Naito Y. et al. Evaluation of remodeling process in small-diameter cell-free tissue-engineered arterial graft. *J Vasc Surg.* 2015 Sep; 62(3):734–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2014.03.011>
- Miyata T., Conte M.S., Trudell L.A., Mason D., Whittmore A.D., Birinyi L.K. Delayed exposure to pulsatile shear stress improves retention of human saphenous vein endothelial cells on seeded ePTFE grafts. *J Surg Res* 1991;50(5):485–93.
- Wu H., Fan J., Chu C.C., Wu J. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21: 3207 – 3215.
- Попова И.В., Степанова А.О., Сергеевичев Д.С., Акулов А.Е., Захарова И.С., Покушалов А.А. и др. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электроспиннинга в эксперименте in vitro и in vivo. *Патология кровообращения и кардиохирургия* 2015; 19 (4): 63–71.
- Popova I.V., Stepanova A.O., Sergeevichev D.S., Akulov A.E., Zakharova I.S., Pokushalov A.A. et al. Comparative study of three vascular grafts produced by electrospinning in vitro and in vivo. *Patologiya krovoobrasheniya i kardihirurgiya.* 2015; 19(4): 63–71.
- Захарова И.С., Живень М.К., Саая Ш.Б., Карпенко А.А., Шевченко А.И., Струнов А.А. и др. Разработка клеточных технологий для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов. *Патология кровообращения и кардиохирургия.* 2015; 19(4–2): 43–54.
- Zakharova I.S., Zhiven' M.K., Saaya Sh.B., Karpenko A.A., Shevchenko A.I., Strunov A.A. et al. Development of cell technologies for design of cell contained vascular grafts. *Patologiya krovoobrasheniya i kardihirurgiya.* 2015; 19(4–2): 43–54.
- Саая Ш.Б., Захарова И.С., Живень М.К., Шевченко А.И., Карпенко А.А., Покушалов Е.А. и др. Оценка функциональных свойств человеческих эндотелиальных и гладкомышечных клеток после заселения на поверхности из естественных и синтетических материалов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2016; 3: 94–101. DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-94-101.
- Sh.B. Saaya, I.S. Zakharova, M.K. Zhiven, A.I. Shevchenko, A.A. Karpenko Ye.A. Pokushalov ,et al. Evaluation of the functional properties of human endothelial and smooth muscle cells after seeding on the surface of natural and synthetic materials. *Vestnik transplaantologii i isskustvennyh organov.* 2016; 3: 94–101. DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-94-101.
- Hibino N., McGillicuddy E., Matsumura G., Ichihara Y., Naito Y., Breuer C., Shinoka T. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 139:431–6. doi: 10.1016/j.jtcvs.2009.09.057.
- Wystrychowski W., McAllister T.N., Zagalski K., Dusserre N., Cierpka L., L'Heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J Vasc Surg.* 2014 Nov; 60(5):1353–7. doi: 10.1016/j.jvs.2013.08.018. Epub 2013 Oct 5.
- Latimer C.A., Nelson M., Moore C.M., Martin K.E. Effect of collagen and elastin content on the burst pressure of human blood vessel seals formed with a bipolar tissue sealing system. *Journal of Surgical Research.* 2014; 186 (1): 73–80.
- Samouillan V., Dandurand J., Lacabanne

- C., Stella A., Gargiulo M., Degani A. et al. Analysis of the molecular mobility of collagen and elastin in safe, atheromatous and aneurysmal aortas. *Pathologie Biologie*. 2012; 60 (1): 58–65.
16. Pate M., Damarla V., Chi D.S., Negi S., Krishnaswamy G. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Adv. Clin. Chem*. 2010; 52: 109–30.
17. S. Tara, K. A. Rocco, N. Hibino, T. Sugiura, H. Kurobe, C. K. Breuer, and T. Shinoka Vessel bioengineering. *Circ. J* 2014; 78 (1): 12–9.
18. Wong C.S., Sgarlato M., Owida A.A., Yang E., Rosenfeldt, C.S., Morsi Y.S. Polyethyleneterephthalate Provides Superior Retention of Endothelial Cells During Shear Stress Compared to Polytetrafluoroethylene and Pericardium. *Heart, Lung and Circulation*. 2006;15:371–377
19. Eybl E., Grimm M., Grabenwoger M., Bock P., Muller M.M., Wolner E. Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992; 104(3): 763–9.
20. Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J., Shapira O.M., Perry T., Sutherland F.W. et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*. 2001; 7: 1035 – 1040.
21. Simon P., Kasimir M.T., Seebacher G., Weigel G., Ullrich R., Salzer-Muhar U. et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003; 23: 1002 – 1006.
22. Quint C., Kondo Y., Manson R.J., Lawson J.H., Dardik A., Niklason L.E. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 9214 – 9219.
23. Kannan R.Y., Salacinski H.J., Sales K., Butler P., Seifalian A.M. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: A review. *Biomaterials*. 2005; 26(14): 1857–75.
24. Rotmans J.I., Heyligers J.M., Verhagen H.J., Velema E., Nagtegaal M.M., de Kleijn D.P. et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*. 2005; 112(1): 12–8.
25. Mirengi L., Ramires P.A., Pentassuglia R.E., Rotolo P., Romito A. Growth of human endothelial cells on plasma-treated polyethyleneterephthalate surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2000; 11(5): 327–31.
26. Niklason L.E., Gao J., Abbott W.M., Hirschi K.K., Houser S., Marini R. et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284: 489 – 493.
27. Isayama N., Matsumura G., Sato H., Matsuda S., Yamazaki K. Histological maturation of vascular smooth muscle cells in in situ tissue-engineered vasculature. *Biomaterials*. 2014; 35 (11): 3589-3595 doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.006>
28. Roh J.D., Sawh-Martinez R., Brennan M.P., Jay S.M., Devine L., Rao D.A. et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 9;107(10):4669-74. doi: 10.1073/pnas.0911465107.
29. Pektok E., Nottelet B., Tille J.C., Gurny R., Kalangos A., Moeller M. et al. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly (epsilon-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. *Circulation*. 2008; 118: 2563 – 2570.
30. Wang S., Mo XM, Jiang B.J., Gao C.J., Wang H.S., Zhuang Y.G. et al. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency. *Int J Nanomed*. 2013; 8: 2131 – 2139.
31. Cikirikcioglu M., Sedelnikov N., Osorio-Da Cruz S., Khabiri E., Donmez Antal A., Tatar T. et al. Improved neo-endothelialization of small diameter ePTFE grafts with titanium coating. *Int J Artif Organs*. 2006; 29: 990-9.
32. Heise M., Schmidmaier G., Husmann I., Heidenhain C., Schmidt J., Neuhaus P. et al. PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006; 32: 418-24.
33. McDaid J., Scott C.J., Kissenpfennig A., Chen H., Martins P.N. The utility of animal models in developing immunosuppressive agents. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 759: 295–302. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.025
34. Lasso J.M., Pe´rez Cano R., Castro Y., Arenas L., Garcí’a J., Ferná´ndez-Santos M.E. Xenotransplantation of human adiposederived stem cells in the regeneration of a rabbit peripheral nerve. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015 Dec;68(12):e189-97. doi: 10.1016/j.bjps.2015.07.005.

35. Sousa W.B., Garcia J.B., Nogueira Neto J., Furtado P.G., Anjos J.A. Xenotransplantation of uterine leiomyoma in Wistar rats: a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015 Jul;190:71-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.04.012.
36. Mirensky T.L., Nelson G.N., Brennan M.P., Roh J.D., Hibino N., Yi T., Shinoka T., Breuer C.K. Tissue-engineered arterial grafts: long-term results after implantation in a small animal model. *J Pediatr Surg.* 2009 Jun;44(6):1127-32; discussion 1132-3. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2009.02.035.
37. Tara S., Kurobe H., Maxfield M.W., Rocco K.A., Yi T., Naito Y., Breuer C.K., Shinoka T. Evaluation of remodeling process in small-diameter cell-free tissue-engineered arterial graft. *J Vasc Surg.* 2015 Sep; 62(3):734-43. doi: 10.1016/j.jvs.2014.03.011.
38. Jones S.G., Hu Y., Xu Q., Jahangiri M. Stem Cells Accumulate on a Decellularized Arterial Xenograft In Vivo. *Ann Thorac Surg.* 2014 Jun; 97(6): 2104-10. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.02.023.
39. Klinkert P., Post P.N., Breslau P.J., van Bockel J.H. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2004; 27 (4): 357–62.
40. Nemen-Guanzon J.G., Lee S., Berg J.R., Jo Y.H., Yeo J.E., Nam B.M. et al. Trends in tissue engineering for blood vessels. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:956345. doi: 10.1155/2012/956345.
41. Sugiura T., Tara S., Nakayama H., Kurobe H., Yi T., Lee Y.U. et al. Novel Bioresorbable Vascular Graft With Sponge-Type Scaffold as a Small-Diameter Arterial Graft. *Ann Thorac Surg.* 2016 Sep;102(3):720-7. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.01.110.
42. Catto V., Farè S., Cattaneo I., Figliuzzi M., Alessandrino A., Freddi G. et al. Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, in vitro biodegradability, and in vivo biocompatibility *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Sep;54:101-11. doi: 10.1016/j.msec.2015.05.003.
43. Pawlowski K.J., Rittgers S.E., Schmidt S.P., Bowlin G.L. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci.* 2004; 9: 1412–21.
44. Roh J.D., Nelson G.N., Udelsman B.V., Brennan M.P., Lockhart B., Fong P.M. et al. Centrifugal seeding increases seeding efficiency and cellular distribution of bone marrow stromal cells in porous biodegradable scaffolds. *Tissue Eng.* 2007; 13(11): 2743–9.
45. Gong Z., Niklason L.E. Blood vessels engineered from human cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2006; 16: 153 – 6.
46. Edelman E.R. Vascular tissue engineering : designer arteries . *Circ Res.* 1999; 85: 1115 – 17 .
47. Lee S. J. , Atala A., Wake Forest University School of Medicine, USA. Engineering of tissues and organs. In Boccaccini A.R, Ma P.X., editors. *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers.* Cambridge: Elsevier; 2014. p. 347-353. DOI:10.1533/9780857097163.3.347

Статья поступила 02.03.2017

Для корреспонденции:

Саая Шораан Биче-оолович

Адрес: 630055, г. Новосибирск,
ул. Речкуновская, 15

Тел. +7 (913)905-40-20,

E-mail: shoraans@gmail.com

For correspondence:

Saaya Shoraan Biche-oolovich

Address: 15, Rechkunovskaya st., Novosibirsk,
630055, Russian Federation

Tel. +7 (913)905-40-20,

E-mail: shoraans@gmail.com

АНАЛИЗ ПЕРФУЗИОННЫХ СВОЙСТВ СКАФФОЛДА

**П. М. ЛАРИОНОВ¹, Н. А. МАСЛОВ², Е. О. ПАПАЕВА², А. С. ЮНОШЕВ⁴,
А. Г. САМОХИН¹, В. П. ТЕРЕЩЕНКО¹, В. В. ПАВЛОВ¹, А. Т. ТИТОВ³**

¹*ФГБУ Новосибирский Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
им. Я.Л.Цивьяна МЗ РФ, Новосибирск, Россия*

²*ФГБУН СОРАН РФ Институт теоретической и прикладной механики им. Христиановича,
Новосибирск, Россия*

³*ФГБУН СОРАН РФ, Объединенный институт геологии и минералогии, Новосибирск,
Россия*

⁴*ФГБУН СОРАН РФ, Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева,
Новосибирск, Россия*

Реферат. Основная стратегия тканевой инженерии предполагает использование заселяемых клетками скаффолдов с последующим ведением в условиях биореактора. Однако для эффективного использования биореактора необходима адаптация скаффолда уже на этапе его конструирования – в нашем понимании это оценка перфузионных свойств скаффолда.

Цель. Оценить перфузионные свойства полотна скаффолда, полученного из композитного материала поликапролактона 11% w/v с желатинизацией 0,5%, 2% и 4% w/v при различных параметрах электроспиннинга и гидростатическом давлении жидкости 5, 10 и 15 mm Hg.

Материалы и методы. Для получения композитного материала использовали поликапролактон 11% w/v и желатин, растворители 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол, 2,2,2-трифтороэтанол, хлороформ. Было подготовлено три варианта композита поликапролактона 11% w/v с желатинизацией 0,5%, 2% и 4% w/v. Полотно изготавливалось с использованием установки NF 103 (MECC). Микроскопический анализ был проведен с использованием лазерного конфокального микроскопа «Zeiss LSM 710». Изучение перфузионных свойств полотна электроспиннинга выполняли на оригинальной экспериментальной установке.

Результаты. Показана принципиальная возможность поперечной и продольной перфузии через полотно при гидростатическом давлении 5, 10 и 15 mm Hg. Найдено, что время продольной и поперечной перфузии 1 мл физиологического раствора зависит от степени желатинизации полотна и параметров электроспиннинга (полотно, изготовленное при скорости вращения коллектора в 450 об/мин, демонстрировало значение времени поперечной перфузии практически на один порядок меньше, нежели полотно, изготовленное при скоростях от 90 до 360 об/мин), при одинаковой толщине образцов и одинаковом перфузионном давлении.

Заключение. Полученные в ходе данного исследования результаты позволяют оптимизировать процесс изготовления скаффолда, полученного методом электроспиннинга, для эффективной перфузии и адекватного силового воздействия на адгезированную клеточную культуру в условиях биореактора.

Ключевые слова: скаффолд, электроспиннинг, перфузия.

ANALYSIS OF THE PERFUSION PROPERTIES OF THE SCAFFOLD

**P. M. LARIONOV¹, N. A. MASLOV², E. O. PAPAIEVA², A. S. YUNOSHEV⁴,
A. G. SAMOKHIN¹, V. P. TERESHCHENKO¹, V. V. PAVLOV¹, A. T. TITOV³**

¹*Federal State Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Y.L. Tsivyan, ,
Novosibirsk, Russia*

²*Institute of Theoretical and Applied Mechanics n.a. Khristianovich, Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

³*Institute of Geology and Mineralogy, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk,
Russia*

⁴*Lavrentyev Institute of Hydrodynamics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk,
Russia*

Abstract. A scaffold usage for the cell culturing is a widespread tissue engineering approach, including culturing in a bioreactor, however the effective use of a bioreactor requires adaptation of the scaffold at the stage of its design. In our opinion, this means assessment of the perfusion properties of the scaffold.

Aim of the study: Aim of the study was the assessment of the perfusion properties of a scaffold sheet made of 11% w/v polycaprolactone (PCL) composite material with gelatinization of 0.5%, 2%, and 4% w/v and fabricated with different electrospinning parameters and hydrostatic pressure (5, 10, and 15 mm Hg).

Materials and methods: To produce composite material, polycaprolactone, gelatin (type B), and solvents: 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol, 2,2,2-trifluoroethanol and chloroform were used. Three composite variants of 11% w/v PCL with gelatinization of 0.5%, 2%, and 4% w/v were prepared. Perfusion properties of the scaffold sheet were assessed with an original experimental equipment. Structural analysis was carried out using the laser confocal microscopy.

Results: Polymer scaffold sheet fabricated with electrospinning demonstrated the possibility of the transverse and longitudinal perfusion through the sheet under hydrostatic pressure of 5, 10, and 15 mm Hg. Also was found what time of 1 mL saline transverse and longitudinal perfusion through a PCL electrospun sheets depends from gelatinization and electrospinning parameters (transverse perfusion time of the sheet fabricated with the electrospinning collector speed of 450 rpm was 10 times lower than sheets fabricated with speed 90-180 rpm), with equal samples thickness and perfusion pressure.

Conclusion: An obtained results allows to optimize the polymer scaffold fabrication process with electrospinning to achieve the optimal characteristics of the perfusion through the scaffold.

Keywords: scaffold, electrospinning, perfusion

Введение

В настоящее время основной стратегией тканевой инженерии, ориентированной на скаффолд-опосредованные клеточные технологии для формирования кости *ex vivo*, является использование собственных клеток пациента, чаще костномозгового или адипоцитарного происхождения. Скаффолд в целом должен обладать следующими свойствами: адекватной механической прочностью, быть биомиметичным – клеточное микроокружение должно приближаться к физиологическому оптимуму, биodeградируемым – сроки биodeградации материала должны соответствовать срокам репаративной регенерации, обладать оптимальной пористостью, способствующей васкуляризации и биохимическим процессам клеточного питания, биосовместимым и неиммуногенным. Методы производства скаффолда должны быть универсальным, так же скаффолд должен обладать функциональным потенциалом за счет модификации материалов биоактивными молекулами, трехмерная макро-архитектура скаффолда должна быть контролируемой, оптимальной для стерилизации и производства [1-5].

В соответствии с принципами клеточной и тканевой инженерии скаффолды для регенерации кости должны иметь следующие свойства: биосовместимость, остеоиндуктивность, функционализация – включение в состав матрикса биологически активных молекул ростовых факторов, микроэлементов, аптамеров, определяющих образование кости и кровеносных сосудов

при соответствующих прочностных характеристиках. Также широко используются подходы с механостимуляцией, предимплантационной васкуляризацией, включение элементов нано- и микро топографии, улучшающих адгезию клеток, их пролиферацию, дифференцирование в направлениях остео- и ангиогенеза [6-10].

Другой составляющей этой стратегии тканевой инженерии является использование биореактора, что улучшает обменные процессы в культуре клеток, снижает уровень апоптоза клеток и определяет позитивные эффекты механостимуляции на клетки за счет остеогенной дифференцировки [11].

Полотно, полученное методом электроспиннинга, рассматривается в качестве основного кандидата для создания скаффолда кости. К преимуществам этой технологии относят возможность использования композитных материалов, реализующих свои биологические свойства за счет включения в состав биологически активных молекул органического и неорганического происхождения, получения волокна в наноразмерном диапазоне, что определяет усиление адгезии клеток, стимулирует остеоиндукцию, пористость около 80% [12]. В то же время работ по оценке перфузионных свойств скаффолдов на основе полотна электроспиннинга нет.

Цель исследования

Оценить перфузионные свойства полотна скаффолда полученного из композитного мате-

риала поликапролактона 11% с желатинизацией - 0,5%, 2%, 4% при различных параметрах электроспиннинга и гидростатическом давлении жидкости - 5, 10 и 15 mm Hg (миллиметров ртутного столба).

Материалы и методы

Для получения композитного материала использовался поликапролактон (PCL) (80кДа, Sigma-Aldrich), желатин (type B, Sigma-Aldrich), растворители 1,1,1,3,3,3-Гексафторо-2-пропанол (HFP) (Sigma-Aldrich), 2,2,2-трифлюороэтанол (Sigma-Aldrich), хлороформ (Реахим, ХЧ). Было подготовлено три варианта композита на основе 11 w/v % PCL желатинизацией (Gel) 0,5%, 2% и 4% w/v. Определены углы смачивания – 61,4°, 39,2° и 38,9° для 0,5%, 2% и 4% w/v композитов соответственно.

Формирование полотна дренажа выполняли на установке электроспиннинга NF-103 (МЕСС, Япония), на базе «Инновационный медико-технологический центр» (ЗАО «ИМТЦ»). Для получения полотна постоянными параметрами электроспиннинга были следующие: высота 22 см,

ускоряющее напряжение – 21 кВт, диаметр коллектора 8 мм, скорость подачи раствора полимера - 1 мл в час, затрачиваемый для получения объем полимера был равен 1,4 мл. Изменяемыми параметрами были: скорость вращения коллектора: 90, 180, 360, 450, 540 оборотов в минуту, перпендикулярная скорость подающей иглы – 0, 90, 270 мм в секунду. В конечном итоге для каждого композита методом электроспиннинга было получено по 15 вариантов дренажирующего полотна, всего 45 образцов. Линейные размеры образцов составили 9-2,4 см, толщина всех образцов была $75 \pm 6,5$ мкм.

Микроскопию полотна электроспиннинга осуществляли с помощью лазерного конфокального микроскопа «Zeiss LSM 710» («Карл Цейсс МикроИмэйджинг ГмбХ», Германия) с принадлежностями: объективы Arochromat x20 сухой и x40 с масляной иммерсией. Одновременно снималось два канала: первый канал – аутофлуоресценция волокон полотна электроспиннинга, второй канал – детектор проходящего света, который необходим для определения точной локализации эмиссионного сигнала каждого волокна внутри конфокального объема полотна полученного методом электроспиннинга.

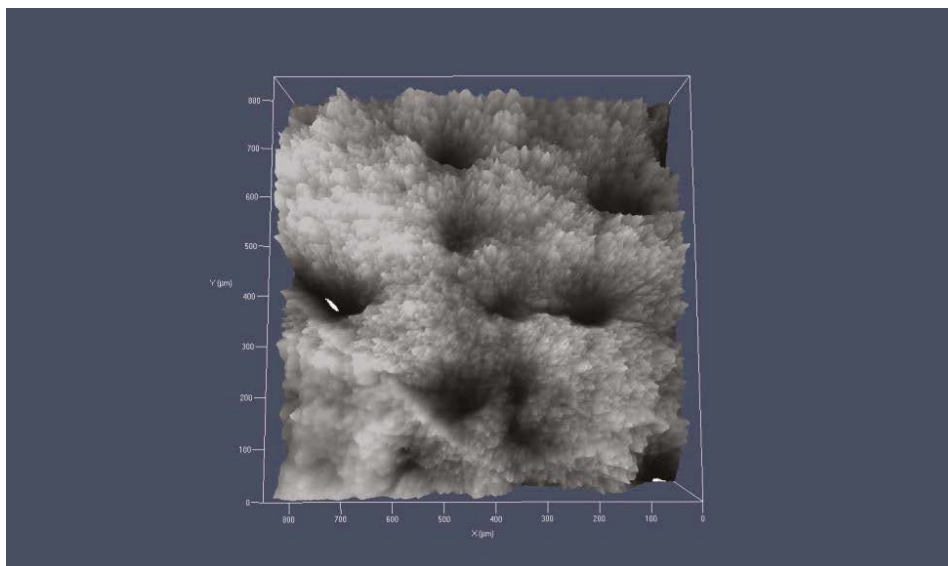


Рисунок 1. Полотно, полученное методом электроспиннинга из композита с желатинизацией, – 2% w/v. (Объектив x40, масляная иммерсия. Трехмерная модель)

Для анализа изображения объема полотна выполняют трехмерное моделирование. Анализ количества и размеров волокон в конфокальном объеме осуществляли с использованием полупроводникового лазера микроскопа «Zeiss LSM 710» с длиной волны 405 нм для возбуждения флуоресценции соответствующего программ-

ного модуля обеспечения Zeiss ZEN 2011 Image analysis («Карл Цейсс МикроИмэйджинг ГмбХ», Германия) (рис. 1).

В каждом анализируемом образце выполнялась оценка «пористости» трехмерных изображений и диаметра волокон с использованием метода проекции максимальной интенсивности.

Проведен анализ 10 трехмерных изображений на образец, что эквивалентно 1000 ручных измерений волокон в одном образце.

Изучение перфузионных свойств полотна скаффолда выполняли с использованием экспериментальной установки, представленной на рис.2. Образец полотна помещали между двумя кольцами из поликарбоната. Диаметр отверстия в кольцах 10 мм. В кольцах со стороны образца сделаны кольцевые пазы глубиной 2 мм и диаметром 12/14 мм. В нижнем кольце сделаны радиальные канавки от паза наружу. Поликарбонатные кольца вклеивали в дюралевые детали, к верхней из которых прикреплялась стеклянная трубка, а к нижней – фиксирующий клапан. При определении продольной перфузии клапан закрывали, образец

сжимали между кольцами с усилием 5N, в этом положении сборка фиксировалась гайками. После этого в стеклянную трубку заливали физиологический раствор в количестве, необходимом для создания нужного давления жидкости на образец. С помощью секундомера засекали время, за которое вытекал один миллилитр физиологического раствора. Движение физиологического раствора при этом следующее: из стеклянной трубки через внутренний объем дюралевого детали раствор перфузировал полотно скаффолда и двигался в зазоре между поликарбонатными кольцами наружу до кольцевых пазов, где выступал из образца и далее двигался по радиальным пазам наружу. За время измерения давление уменьшалось не более, чем на 10%.

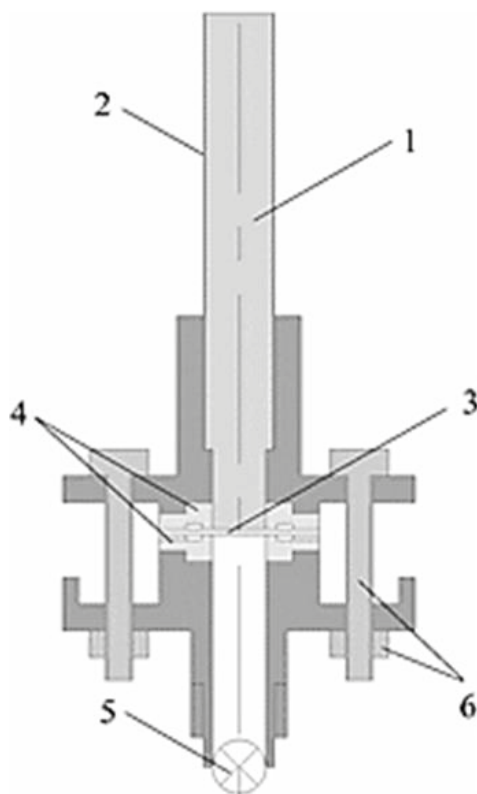


Рисунок 2. Схема устройства для оценки перфузионных свойств полотна электроспиннинга:
1 – физиологический раствор, 2 – стеклянная трубка, 3 – испытываемый образец, 4 – поликарбонатные кольца, 5 – открывающийся клапан, 6 – фиксирующие конструкцию болт и гайка

Поперечная перфузия определялась в той же постановке, только гайки затягивались для предотвращения утечки раствора вдоль ткани. Движение раствора при этом следующее: из стеклянной трубки раствор перфузировал полотно скаффолда и двигался через открытый клапан наружу. За время измерения давление уменьшалось не более, чем на 10%.

Обработку полученных результатов исследо-

вания проводили с использованием вычисления описательных статистик и путем сравнения количественных параметров с использованием программного обеспечения «ORIGIN PRO 2015». Описательные статистики представлены в виде средней (M) и её стандартной ошибки (m). Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними величинами исследуемых параметров оценивали с помощью параметри-

ческого двунаправленного t-критерия. Уровень (P) пороговой статистической значимости при этом принимали равным 0,05. Различия сравниваемых величин считали достоверными при значениях, не превышающих порогового уровня, определенного в 0,05 ($P < 0,05$). Анализ степени сопряженности процессов, с учетом небольших выборок и большой дисперсии, проводили с использованием непараметрического коэффициента корреляции Спирмена – (r).

Результаты и обсуждение

Структурная характеристика полотна электроспиннинга для трех композитов PCL с 0,5%

2% и 4% желатинизацией была следующей: средние размеры волокон при использовании композита PCL с 0,5% w/v желатинизаций - $498 \pm 0,05$ nm; 2% w/v - $418 \pm 0,04$ nm; 4% w/v - $460 \pm 0,04$ nm. Плотность «упаковки» волокна в полотне, выполненном из композита с PCL желатинизацией – 0,5%, 2% и 4% w/v в процентах от всего объема полотна в % ($M \pm m$), составила - $7,9 \pm 0,28\%$, $9,7 \pm 0,09\%$ и $9,7 \pm 0,09\%$, что соответствовало пористости, - 92,1%, 90,3% и 90,3% (таблица 1).

Средние значения времени продольной перфузии через полотно скаффолда при давлении 15 mm Hg без учета параметров электроспиннинга в секундах представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Время продольной перфузии 1 миллилитра физиологического раствора в секундах через полотно скаффолда при давлении 15 mm Hg

PCL с желатинизацией (% w/v)	Количество наблюдений n	Время перфузии 1 мл в секундах при давлении 15 mm Hg ($M \pm m$)
0,5%	15	$1360,9 \pm 12,2$
2%	15	$975,7 \pm 9,72^*$
4%	15	$804,7 \pm 4,01^*$

Примечание: * - $P < 0,05$, при сравнении с временем перфузии образцов из PCL с 0,5% w/v желатинизацией

Незначительное, но статистически значимое уменьшение плотности упаковки волокон в образцах PCL с желатинизацией 0,5% w/v не приводило к уменьшению времени перфузии в образцах, в то же время желатинизация капролактона 2% и 4% w/v значимо определяла сокращение времени продольной перфузии. Также был проведен анализ влияния параметров электроспиннинга на время продольной фильтрации в ходе которого была выявлена средне-слабая отрицательная связь между

скоростью вращения коллектора и временем продольной перфузии ($r = -0,3270$, $P < 0,05$), т.е. можно говорить о том, что с увеличением скорости вращения коллектора уменьшалось время продольной перфузии. Значения времени поперечной перфузии 1 мл физиологического раствора через полотно скаффолда PCL с желатинизацией 0,5%, 2% и 4% w/v без учета параметров электроспиннинга в секундах, при величинах давления в 5, 10 и 15 mm Hg представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Время поперечной перфузии в секундах 1 миллилитра физиологического раствора через полотно скаффолда при давлении 5, 10 и 15 mm Hg

PCL с желатинизацией композита (w/v %)	Количество наблюдений	Время перфузии 1 мл в секундах ($M \pm m$) при давлении 5 mm Hg	Время перфузии 1 мл в секундах ($M \pm m$) при давлении 10 mm Hg	Время перфузии 1 мл в секундах ($M \pm m$) при давлении 15 mm Hg
0,5%	15	$1462 \pm 13,7$	$1675 \pm 14,9$	$1989 \pm 15,8$
2%	15	$457,3 \pm 8,8^*$	$240 \pm 6,2^*$	$103 \pm 3,7^*$
4%	15	$892,2 \pm 12,8^*$	$1396 \pm 16,9^*$	$477 \pm 9,16^*$

Примечание: * - $P < 0,05$, при сравнении с временем перфузии образцов PCL с 0,5% W/V желатинизацией

Сравнивая значения времени поперечной перфузии раствора между образцами, следует отметить уменьшение времени перфузии в образцах, изготовленных из композитов PCL с желатинизацией 2% и 4% w/v. Однако оказалось неожиданным, что линейный характер уменьшения времени перфузии наблюдался только в образцах, изготовленных из композита PCL с желатинизацией 2% w/v, где с увеличением гидростатического давления уменьшалось время перфузии.

Влияние параметров электроспиннинга при получении полотна на время продольной перфузии раствора без учета состава композитного материала, представлено в таблице 3. Наиболее

подходящим оказался режим со скоростью вращения коллектора 450 оборотов в минуту, где значение времени поперечной перфузии было меньше практически на один порядок, нежели при скоростях в 90-180 об/мин. Помимо этого, была найдена слабая отрицательная связь поперечной скорости подающей иглы и времени поперечной перфузии, т.е. можно предполагать, что увеличение поперечной скорости подающей иглы сокращает время перфузии ($r = -0,189952$, $P < 0,05$). Однако для подтверждения этого требуется увеличить выборку наблюдений, чтобы однозначно показать тесную связь анализируемых процессов, уменьшение времени перфузии при увеличении скорости подающей иглы.

Таблица 3.

Время поперечной перфузии через полотно электроспиннинга (скаффолда) в секундах без учета состава композита, полученного при различных скоростях коллектора

Скорость вращения коллектора (оборотов в/ минуту)	Количество наблюдений, n	Время перфузии 1 мл в секундах ($M \pm m$) при давлении 15 mm Hg без учета состава композита.
90	9	879 $\pm$ 13,8
180	9	1234 $\pm$ 13,8*
360	9	364 $\pm$ 9*
450	9	98 $\pm$ 4,6*
540	9	767 $\pm$ 15,4*

Примечание: * - $P < 0,05$, при сравнении с полотном, изготовленным при скорости вращения коллектора 90 оборотов в минуту

Заключение

Наше исследование проведено в интересах главной стратегии тканевой инженерии сегодняшнего дня – формирования ткани de novo в условиях биореактора. Нами показана возможность продольной перфузии скаффолда при давлении 15 mm Hg и поперечной перфузии при давлениях 5, 10, 15 mm Hg. Найдено значимое влияние на перфузионные свойства скаффолда степени желатинизации поликапролактонового композита и параметров электроспиннинга при получении полотна. Так, полотно, изготовленное при скорости вращения коллектора в 450 об/мин, демонстрировало значение времени поперечной перфузии практически на один порядок меньше, нежели полотно, изготовленное при скоростях в 90-180 об/мин. В то же время, такой показатель как «пористость», определенный нами через расчеты плотности «упаковки» волокна, в нашем

исследовании не оказал решающего влияния на перфузионные свойства. Более того, пористость была большей в образцах поликапролактона с желатинизацией 0,5%, показавших большее время перфузии 1 мл физиологического раствора при сопоставлении с образцами, имевшими желатинизацию 2% и 4% w/v. Полученные в ходе данного исследования результаты позволяют оптимизировать процесс изготовления полимерного тканевого полотна методом электроспиннинга, чтобы достигнуть оптимальных характеристик перфузии через полотно при ведении скаффолда в условия биореактора.

Благодарность

Это исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (Грант No. 15-29-04849).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Антонова Л.В, Матвеева В.Г., Барбараш Л.С. Использование метода электроспиннинга в создании биodeградируемых сосудистых графтов малого диаметра: проблемы и решения (Обзор). Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015; 3: 12-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.17802/2306-1278-2015-3-12-22>
2. Antonova L. V., Matveeva V. G., Barbarash L. S. Electrospinning and biodegradable small-diameter vascular grafts: problems and solutions (Review). Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2015; 3: 12-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.17802/2306-1278-2015-3-12-22> [In Russ].
3. Nasonova M. V., Glushkova V. T., Borisov V. V., Velikanova E. A., Burago A. Yu., Kudryavtseva Yu. A. Biocompatibility and Structural Features of Biodegradable Polymer Scaffolds. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015; 160 (1): 134–140. DOI: 10.1007/s10517-015-3114-3
4. Ingavle G.C., Leach J.K. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. Tissue Eng Part B Rev. 2014; 20 (4): 277-293. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0276
5. Holzwarth J.M., Ma P.X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2011; 36 (32): P.9622-9629. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.009
6. Al-Himdani S., Jessop Z.M., Al-Sabah A., Combella E., Ibrahim A., Doak S.H. et al. Tissue-Engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery: Principles and Practice Front Surg. 2017; 4: 4. Published online 2017 Feb 23. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2017.00004>
7. Ami R. Amini, Cato T. Laurencin and Syam P. Nukavarapu Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. Crit Rev Biomed Eng. 2012; 40(5): 363–408.
8. Chen Z., Bachhuka A., Han S., Wei F., Lu S., Visalakshan R.M. et al. A Tuning Chemistry and Topography of Nanoengineered Surfaces to Manipulate Immune Response for Bone Regeneration Applications. ACS Nano. 2017 May 23;11(5):4494-4506. doi: 10.1021/acsnano.6b07808.
9. Hu X., Wang Y., Tan Y., Wang J., Liu H., Wang Y. et al. A Difunctional Regeneration Scaffold for Knee Repair based on Aptamer-Directed Cell Recruitment. Adv Mater. 2017 Apr; 29(15). doi: 10.1002/adma.201605235. Epub 2017 Feb 10.
10. Садовой М.А., Ларионов П.М., Самохин А.Г., Рожнова О.М. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы. Хирургия позвоночника. 2014; (2): 79–86
11. Sadovoy M.A., Larionov P.M., Samokhin A.G., Rozhnova O.M. Cellular matrices (scaffolds) for bone regeneration: state of the art. Hir. Pozvonoc. 2014; (2): 79-86. [In Russ].
12. Ларионов П.М., Садовой М.А., Самохин А.Г., Рожнова О.М., Гусев А.Ф., Принц В.Я. и др. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани и перспективы его использования в травматологии и ортопедии. Хирургия позвоночника. 2014; (3): 77–85. doi: 10.14531/ss2014.3.77-85.
13. Larionov P.M., Sadovoy M.A., Samokhin A.G., Rozhnova, Gusev A.F., Prinz V.Y. et al. Creation of tissue-engineered living bone equivalent and prospects for its application in traumatology and orthopaedics. Hir. Pozvonoc. 2014; (3):77-85. doi: 10.14531/ss2014.3.77-85 [In Russ]
14. Egger D., Spitz S., Fischer M., Handschuh S., Glösmann M., Friemert B. et al. Application of a Parallelizable Perfusion Bioreactor for Physiologic 3D Cell Culture. Cells Tissues Organs. 2017; 203 (5): 316-326. doi: 10.1159/000457792. .
15. Prabhakaran M.P. Venugopal J., Ramakrishna S. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. Acta Biomaterialia. 2009; 5 (8): 2884–2893. doi.org/10.1016/j.actbio.2009.05.007.

Статья поступила 08.06.2017.

Для корреспонденции:

Ларионов Пётр Михайлович

Адрес: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
Тел. +7(913) 398-69-83,
E-mail: ptrl@mail.ru

For correspondence:

Larionov Peter

Address: 17, Frunze st., Novosibirsk,
630091, Russian Federation
Тел. +7(913) 398-69-83,
E-mail: ptrl@mail.ru

ТРЕХЛЕТНИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ МЕДИКАМЕНТОЗНОГО И ХИРУРГИЧЕСКОГО РЕПЕРФУЗИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ТРОМБОЭМБОЛИЮ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ: ИСХОДЫ, КЛИНИЧЕСКИЙ СТАТУС, СОСТОЯНИЕ ЛЕГОЧНОЙ ПЕРФУЗИИ

**Р. С. ТАРАСОВ, А. Н. КАЗАНЦЕВ, А. Н. КОКОВ, А. В. БЕЗДЕНЕЖНЫХ,
Н. В. КОНДРИКОВА, Т. Ю. СЕРГЕЕВА, И. Н. СИЗОВА, Л. С. БАРБАРАШ**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

Цель. Оценить госпитальные и трехлетние результаты медикаментозного и хирургического реперфузионного лечения пациентов, перенесших ТЭЛА.

Материалы и методы. В одноцентровое проспективное исследование вошло 30 пациентов с острой ТЭЛА промежуточного высокого и высокого риска, имевших показания к реперфузионной терапии в объеме тромболитической терапии (ТЛТ) и/или хирургической тромбэктомии. Конечными точками исследования в госпитальном и отдаленном периоде наблюдения стали такие неблагоприятные кардиоваскулярные события, как смерть, инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения/транзиторная ишемическая атака, рецидив ТЭЛА.

Результаты. Показано, что реперфузионное лечение имело удовлетворительные показатели госпитальной выживаемости (97%), эффективности, что проявилось в существенном регрессе клинических симптомов и значимом снижении выраженности легочной гипертензии (с $56,93 \pm 17,18$ до $36,72 \pm 14,47$ мм рт. ст.) со значимым уменьшением трикуспидальной недостаточности (с 77% исходно до 24% на момент выписки) ($p < 0,05$). Спустя 3 года частота фатальных исходов достигла 33%, большинство из которых имело место в группе ТЛТ и было связано с рецидивом ТЭЛА. Среди выживших пациентов 55% имели проявления легочной гипертензии, 15% – крупные или сегментарные дефекты перфузии по данным перфузионной сцинтиграфии легких (ПСЛ).

Заключение. Наличие значимых дефектов перфузии легки, по результатам ПСЛ, у каждого седьмого из выживших пациентов более чем в половине случаев, вероятно, может быть следствием недостаточно частого использования хирургической опции лечения в клинической практике. Высокая частота фатальных исходов в отдаленном периоде наблюдения, реализуемая посредством рецидива ТЭЛА, свидетельствует о недостаточной комплаентности пациентов к медикаментозной терапии.

Ключевые слова: ТЭЛА, трехлетние результаты, тромбэндартерэктомия, тромболитическая терапия.

THREE-YEAR RESULTS OF MEDICAL AND SURGICAL REPERFUSIONAL TREATMENT OF PATIENTS TRANSPOSED BY THROMBOEMBOLIA OF PULMONARY ARTERY: OUTCOME, CLINICAL STATUS, STATE OF PULMONARY PERFUSION

**R. S. TARASOV, A. N. KAZANTSEV, A. N. KOKOV, A. V. BEZDENEZHNY,
N. V. KONDRIKOVA, T. Y. SERGEEVA, I. N. SIZOVA, L. S. BARBARASH**

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia

The purpose. To estimate hospital and three-year results of reperfusion treatment in pulmonary embolism (PE) patients.

Methods. One-center prospective study included 30 patients with intermediate high-risk and high-risk acute PE that had indications for reperfusion: thrombolytic therapy (TLT) and / or surgical thrombectomy. The endpoints of the study in the hospital and long-term follow-up period were such unfavorable cardiovascular events as death, myocardial infarction, acute cerebrovascular accident / transient ischemic attack, re-PE.

Results. It was shown that reperfusion treatment had satisfactory rates of hospital survival (97%), efficacy, with significant regression of clinical symptoms and pulmonary hypertension (from 56.93 ± 17.18 to 36.72 ± 14.47 mm Hg.). There was a significant decrease of tricuspid insufficiency (from 77% initially to 24% at the time of discharge)

($p < 0.05$). After 3 years, the rate of fatal outcomes reached 33%, most of which occurred in the TLT group and was associated with re-PE. Fifty five percent of the surviving patients had pulmonary hypertension, 15% had major or segmental perfusion defects according to perfusion lung scintigraphy (PSL) data.

Conclusion. The presence of significant pulmonary perfusion defects according to the results of PSL in one out of seven surviving patients in more than half of the cases is likely to be a result of insufficiently frequent use of the surgical option of treatment in clinical practice. The high frequency of fatal outcomes in the long-term follow-up period, realized through re-PE, indicates insufficient compliance of patients to medical therapy.

Key words: PE, three-year results, thrombendarterectomy, thrombolytic therapy.

Введение

Тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) является достаточно распространенным заболеванием, диагностируемым в 60-112 случаях на 100 тыс. человек в год [1]. По данным ряда исследований, летальность в острой фазе заболевания достигает 7–11% [2-3]. При этом острая фаза ТЭЛА выражается в широком спектре клинических проявлений с различными клиническими исходами. Для определения тактики лечения и показаний к реперфузионной терапии при ТЭЛА используется трехуровневая схема стратификации риска, разработанная Европейским обществом кардиологов и Американской ассоциацией кардиологов, основанная на состоянии гемодинамики, наличии правожелудочковой дисфункции или повреждении миокарда [4,5].

Выбор стратегии лечения зависит от стратификации риска летального исхода и вероятности развития значимого кровотечения в результате использования тромболитических средств. Тромболитическая терапия (ТЛТ) остается приоритетной опцией в лечении больных с ТЭЛА. Согласно действующим рекомендациям, ТЛТ показана пациентам с высоким и промежуточным риском и отсутствием противопоказаний [4,5]. Однако, по данным ряда мета-анализов, не было выявлено положительного влияния ТЛТ на общую смертность, тем не менее, повышалось число значимых геморрагических осложнений [6,7,8,9]. В случаях наличия нестабильной гемодинамики после проведенного ТЛТ, массивной ТЭЛА, при противопоказаниях к ТЛТ рекомендуется реализация хирургической опции лечения. Хирургическое лечение пациентов с ТЭЛА в ряде случаев может быть более предпочтительным по сравнению с ТЛТ, что, в частности, выражается в более эффективной профилактике и коррекции хронической посттромбоэмболической легочной гипертензии (ХПТЭЛГ) и ее последствий посредством устранения морфологического окклюзирующего субстрата [10,11].

От эффективности выбранной тактики зави-

сит прогноз и качество жизни пациентов. Эффективность проведенного лечения определяется по регрессу клинической симптоматики (цианоз, дыхательная недостаточность, тахикардия и т.д.), признакам перегрузки правых отделов сердца по данным эхокардиографии (ЭхоКГ) и электрокардиограммы (ЭКГ) и по положительной динамике перфузионной скинтиграфии легких (ПСЛ), а также ангиопульмонографии [12]. ПСЛ является важным объективным методом верификации адекватности легочной перфузии и может иметь принципиальное значение как для верификации диагноза, так и для оценки качества реперфузионного лечения на госпитальном, а затем и на амбулаторном этапе [13]. Так, в 2 – 4% случаев в отдаленном периоде (≥ 6 месяцев) сохраняется ХПТЭЛГ, проявляющаяся повышением среднего легочного артериального давления больше 25 мм рт.ст. и выражающаяся в прогрессировании правожелудочковой недостаточности [14]. Известно, что ПСЛ позволяет с высокой точностью идентифицировать ТЭЛА при небольшом объеме лучевой нагрузки, что особенно актуально и в динамической оценке [15]. По данным ряда авторов, чувствительность данного метода составляет 85,7%, специфичность – 75% [25,26]. Для определения общего дефицита перфузии дефект размером с сегмент расценивается как дефицит перфузии в 5%, размером равным нижней доле – 25%, правому легкому – 55%, левому легкому – 45%. На основе этой оценки по системе PIOPED определяется низкая/промежуточная/высокая вероятность ТЭЛА [15,16,17].

Несмотря на наличие современных рекомендаций по лечению пациентов с ТЭЛА, уровень летальности при данном состоянии остается высоким. Окончательно не решены вопросы, определяющие место хирургических методов. В связи с этим возрастает значимость верно выбранной тактики лечения на основании заключения междисциплинарной комиссии и стратификации риска неблагоприятных событий в госпитальном и отдаленном периодах [18]. Анализ отдаленных исходов реперфузионного лечения пациентов с

ТЭЛА, основанный на применении объективных методов визуализации (ЭхоКГ и ПСЛ), может способствовать получению новых знаний об эффективности проводимого лечения и прогнозе для больных.

Цель исследования

Оценка госпитальных и трехлетних результатов медикаментозного и хирургического реперфузионного лечения пациентов, перенесших ТЭЛА.

Материалы и методы

В одноцентровое проспективное исследование вошло 30 пациентов, госпитализированных в Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний с 2013 по 2014 гг. по поводу острой ТЭЛА промежуточного высокого и высокого риска, имевших показания к реперфузионной терапии в объеме ТЛТ и/или хирургической тромбэктомии. Дополнительные критерии включения в исследование: отсутствие тяжелой патологии лимитирующей ожидаемую продолжительность жизни (злокачественные новообразования), и возможность наблюдения в отдаленном периоде. Критерием исключения являлось наличие обструктивного шока, а также противопоказания к ТЛТ и/или хирургической тромбэктомии.

Десяти больным в качестве реперфузионной стратегии лечения была выполнена хирургическая тромбоэмболэктомия из легочных артерий, в двадцати случаях проводилась ТЛТ. В группу хирургии пациенты попадали путем случайной выборки при наличии у них двусторонней субмассивной ТЭЛА по данным МСКТ-АГ. По клинико-демографическим характеристикам группы статистически не отличались (таблица 1,2). В общей выборке пациентов преобладали лица женского пола ($n=17$, 56,6%). Средний возраст больных составил $61,7 \pm 12,98$ года при этом, половина из них относилась к пожилому возрасту (60 – 75 лет по классификации ВОЗ). В подавляющем большинстве случаев (86,6%) источником ТЭЛА стали глубокие вены нижних конечностей, в остальных случаях установить источник не представилось возможным. Общая выборка пациентов характеризовалась наличием тяжелой сопутствующей патологии. Трое больных страдали сахарным диабетом 2 типа (СД), семе-

ро – ожирением. У семи больных диагностировано наличие мультифокального атеросклероза (МФА) (таблица 1).

В госпитальном периоде всем больным были выполнены такие методы визуализации, как мультиспиральная компьютерная томография с ангиографией (МСКТ-АГ) и ЭхоКГ, по данным которой оценивалась эффективность проведенного оперативного лечения и/или ТЛТ. Был проведен анализ клинических исходов и структуры осложнений госпитального периода наблюдения. Для определения эффективности проведенного лечения в отдаленном периоде, который составил $35,31 \pm 7,15$ месяцев, всем пациентам выполнялась ПСЛ (аппарат GE Discovery NMCT 670 с 99mTc -макротехом, 7 мКи; лучевая нагрузка: $2,8\text{мЗв}$; в томографическом и планарном режимах) и ЭхоКГ на аппарате экспертного класса с оценкой комплекса показателей. Также оценивалась динамика клинического статуса и адекватности получаемой медикаментозной терапии.

Конечными точками исследования в госпитальном и отдаленном периоде наблюдения стали такие неблагоприятные кардиоваскулярные события, как смерть, инфаркт миокарда (ИМ), острое нарушение мозгового кровообращения/транзиторная ишемическая атака (ОНМК/ТИА), рецидив ТЭЛА.

Сравнение количественных признаков в группах проводили с помощью критерия Краскела-Уолеса и Манна – Уитни. Для оценки динамики изменений ЭхоКГ показателей применялась Анова. При оценке качественных признаков использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Результаты исследований обработаны при помощи пакета прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты

Клинические проявления ТЭЛА выражались в эпизодах приступообразной одышки, кашля, кровохарканья и снижением сатурации до средних значений $88,8 \pm 5,6\%$. Проявления тяжелой дыхательной недостаточности имел каждый четвертый пациент. У большинства пациентов (56,6%) отмечались признаки острого легочного сердца. Двадцать больных характеризовалась промежуточным высоким риском по классификации PESI, десять – высоким или очень высоким (таблица 1).

Таблица 1.

Клинико-демографические характеристики (в госпитальном периоде)

Показатель	На момент выписки (ТЛТ)		На момент выписки (Тромбэмболектомия)		Р
	N = 20	%	N = 10	%	
Возраст	63,6±13,33		57,9±11,97		1
Мужской пол	8	40	5	50	0,512
Кашель	12	60	5	50	1
Кровохарканье	3	15	2	20	0,453
Эпизоды приступообразной одышки	6	30	2	20	0,6
II функциональный класс ХСН (NYHA)	1	5	1	10	1
III функциональный класс ХСН (NYHA)	5	25	2	20	0,617
IV функциональный класс ХСН (NYHA)	1	5	0	0	-
Артериальная гипертензия	9	45	3	30	0,51
ДН II	9	45	5	50	0,22
ДН III	3	15	3	30	0,326
Острое легочное сердце	11	55	6	60	0,453
Ожирение ≥2 ст.	4	20	3	30	0,3
Резидуальные явления ОНМК с выраженным неврологическим дефицитом	0	0	1	10	-
Миома тела матки	1	5	1	10	1
МФА	4	20	3	30	0,3
ЧКВ в анамнезе	0	0	2	20	-
ПИКС в анамнезе	1	5	2	20	0,598
СД 2 типа	2	10	1	10	0,725
ХОБЛ	1	5	0	0	-
Рецидив ТЭЛА	3	15	2	20	0,598
PESI: класс 3, промежуточный риск	9	45	5	50	0,527
PESI: класс 4, высокий риск	5	25	3	30	0,3
PESI: класс 5, очень высокий риск	2	10	0	0	-
Источник ТЭЛА: вены нижних конечностей	18	90	8	80	1
Источник ТЭЛА: неизвестен	2	10	2	20	1

Примечание: ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии, NYHA - New York Heart Association, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ДН – дыхательная недостаточность, МФА – мультифокальный атеросклероз, ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство, ПИКС – постинфарктный кардиосклероз, СД – сахарный диабет, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких, PESI - Pulmonary Embolism Severity Index, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

У более чем половины пациентов (56,6%) по результатам МСКТ-АГ имела место двусторонняя субмассивная ТЭЛА, по наличию или отсутствию которой группы статистически не различались (таблица 3). По данным исходной ЭхоКГ, различий в исследуемых группах не наблюдалось. В обеих группах определялась легочная гипертензия со средним систолическим

давлением в легочной артерии 56,93±17,18 мм. рт. ст. (56,4±17,2 в группе ТЛТ и 58±18 мм рт ст в группе хирургического лечения) (таблица 4). У половины (53,3%) пациентов перегрузка правого желудочка (ПЖ) сопровождалась регургитацией на трикуспидальном клапане (ТК) второй степени, у 23% пациентов – третьей степени. Большинство больных обеих групп имело ЭхоКГ

Таблица 2.

Клинико-демографические характеристики (в отдаленном периоде)

Показатель	Контрольная точка* (35,31±7,15 мес.) (ТЛТ)		Контрольная точка* (35,31±7,15 мес.) (Тромбэмболектомия)		Р
	N = 13	%	N = 7	%	
Кашель	2	15,4	0	0	1
Кровохарканье	0	0	0	0	1
Субъективно отмечаемые эпизоды приступообраз- ной одышки	2	15,4	0	0	1
II функциональный класс ХСН (NYHA)	3	23	1	14,3	1
III функциональный класс ХСН (NYHA)	9	69,2	4	57,14	0,22
IV функциональный класс ХСН (NYHA)	0	0	0	0	1
ДН II	9	69,2	4	57,14	0,617
ДН III	0	0	0	0	1
Рецидив ТЭЛА	7	53,8	2	28,6	0,746

Примечание: ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии, NYHA - New York Heart Association, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ДН – дыхательная недостаточность, ТЛТ- тромболи-
тическая терапия

Таблица 3.

Исходные клинико-инструментальные показатели в группах

Показатель	ТЛТ		Тромбэмболектомия		Р
	N=20	%	N=10	%	
МСКТ-АГ: двусторонняя субмассивная ТЭЛА	8	40	9	90	0,389
МСКТ-АГ: двусторонняя массивная ТЭЛА	5	25	1	10	0.490
МСКТ-АГ: двусторонняя ТЭЛА долевых и сегментарных ветвей	2	10	0	0	-
МСКТ-АГ: массивная односторонняя ТЭЛА	1	5	0	0	-
МСКТ-АГ: двусторонняя ТЭЛА + ин- фаркт-пневмония	4	20	0	0	-
Шоковый индекс	0,58±0,33		0,795±0,31		1
D-димер	3209,3±1447,44		3495±926,63		1
SpO2, %		89,05±6,28		89±3,4	1
Рецидив ТЭЛА	7	53,8	2	28,6	0,746

Примечание: ТЛТ – тромболитическая терапия, МСКТ-АГ – мультиспиральная компьютерная
томография с ангиографией, ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии, SpO2 – процентное содер-
жание оксигемоглобина в артериальной крови

признаки дилатации правого желудочка (ПЖ) и
правого предсердия (ПП), а также левого пред-
сердия (ЛП) (таблица 4,5).
Тромбэмболектомия выполнялась у всех
пациентов группы хирургического лечения в
условиях параллельного искусственного кро-
вообращения (ИК) со средней длительностью
последнего 157,5±32,4 минут. В двух случаях, в

связи с выраженным поражением венечных арте-
рий, операция сочеталась с коронарным шунти-
рованием (КШ). Ретроградная перфузия легких
применялась у двух пациентов. В трех случаях
операция выполнялась после ТЛТ, оказавшейся
неуспешной. Тромбэмболектомия выполнялась
механически и при помощи микроаспиратора
Джемиэйсона. При ушивании артериотомных

Таблица 4.
Динамика эхокардиографических показателей внутри групп пациентов в различные интервалы наблюдения

Группа	Показатель	ЭХО КГ до лечения (1)		ЭХО КГ перед выпиской (2)		ЭХО КГ контрольная точка (3)		ANOVA
		N = 30	%	N = 29	%	N = 20	%	P
ТЛТ	ФВ	60,2±5,7		63,4±5		60,5±11		Нет различий
	ДЛА	56,4±17,2		41,1±15,6		38,7±11,9		P 1 – 2: 0,0095 P 2 – 3: 0,0065
	ПП	5,0±0,59		4,53±0,65		4,45±0,58		Нет различий
	ПЖ	2,72±0,47		2,2±0,52		2,39±0,49		P 1 – 2: 0,0056
	ТК: регургитация II	13	65	3	15	3	15	P 1 – 3: 0,0329
	ТК: регургитация III	3	15	3	15	1	5	
	Легочная гипертензия	20	100	11	55	8	40	P 1 – 2: 0,0012 P 1 – 3: 0,0001
Тромбэм-болэктомия	ФВ	63,1±12,8		64,5±4,11		63,4±7,8		Нет различий
	ДЛА	58±18		28,3±6,42		30,7±9,44		P 1 – 2: 0,00018 P 1 – 3: 0,00067
	ПП	4,69±0,28		4,15±0,54		4,57±0,63		Нет различий
	ПЖ	2,72±0,67		1,94±0,17		2,44±0,53		P 1 – 2: 0,0089
	ТК: регургитация II	3	30	0	0	1	10	Нет различий
	ТК: регургитация III	4	40	1	10	2	20	
	Легочная гипертензия	10	100	2	20	3	30	P 1 – 2: 0,000306 P 1 – 3: 0,01256

Примечание: ЭХО КГ – эхокардиография, ФВ – фракция выброса, ДЛА – давление в легочной артерии, ПП – правое предсердие, ПЖ – правый желудочек, ТК – трикуспидальный клапан сердца

отверстий в легочной артерии использовалась заплатка из ксеноперикарда «Кемпериплас Нео». При выполнении ТЛТ у большинства пациентов, в качестве тромболитика применялась стрептокиназа в дозе 1,5 млн. единиц (таблица 5).

В госпитальном периоде наблюдения в группе ТЛТ произошел один летальный исход (5%), который был связан с развитием ИМ у пожилой пациентки с наличием высокого функционального класса стенокардии при диффузном поражении коронарного русла. В группе хирургического лечения в одном случае (10%) наблюдалось ОНМК, манифестировавшее после тромбэмболэктомии. В этой же группе в подавляющем большинстве случаев отмечалась интраоперационная кровопотеря (BARC ≥ 3а), потребовавшая переливания компонентов крови, тем не менее, фатальных кровотече-

ний и геморрагических осложнений, требовавших ремедиастинотомии, не наблюдалось. В одном случае оперативное вмешательство сочеталось с перевязкой поверхностной бедренной вены справа.

В подавляющем большинстве случаев реперфузионное лечение (ТЛТ или хирургическая тромбэмболэктомия) было успешным, что проявлялось регрессом клинической симптоматики, уменьшением размеров правых отделов сердца, значимым снижением систолического давления в легочной артерии. Динамика снижения частоты встречаемости трикуспидальной регургитации III ст. была более убедительной в группе хирургического лечения в сравнении с группой ТЛТ (таблица 4).

Интервал между выпиской и контрольной точкой исследования в отдаленном периоде наблюдения составил около трех лет (35,31±7,15

Таблица 5.

Периоперационные характеристики и виды использованных тромболитиков

Показатель	N = 30	%
ИК, мин.	157,5±32,4	
В сочетании с КШ	2	6,66
Эмболэктомия из нижней полой вены	1	3,33
Ретроградная перфузия легких	2	6,66
Тип тромболитика (для пациентов с ТЛТ)		
Стрептокиназа (1,5 млн)	16	53,33
Актилизе (100 мг)	1	3,33
Эберкиназа (1,5 млн)	3	10

Примечание: ИК – искусственное кровообращение, КШ – коронарное шунтирование, ТЛТ – тромболитическая терапия

Таблица 6.

Данные перфузионной сцинтиграфии легких в отдаленном периоде наблюдения в зависимости от стратегии реперфузии

Показатель	ТЛТ		Тромбэмболэктомия		p
	N=13	%	N=7	%	
Нарушение капиллярного кровотока	13	100	6	85,7	1
Разница в интенсивности накопления РФП (между правым и левым легким), %		11,92±10		6,68±3	1
Отклонение в разности интенсивности накопления РФП (между правым и левым легким)	4	30,7	7	100	0,45
Крупные дефекты перфузии	1	7,7	1	14,3	1
Сегментарные дефекты перфузии	0	0	1	14,3	-
Краевые дефекты перфузии	7	53,8	4	57,1	1
Множественные дефекты перфузии	5	38,4	1	14,3	1

Примечание: РФП – радиофармпрепарат, ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии

месяцев). Показатель смертности больных общей выборки к этому моменту составила 33% (n=10), в связи с чем обследование было выполнено у 20 выживших пациентов. Частота встречаемости фатальных исходов в исследуемых группах была практически идентичной, тогда как рецидивы ТЭЛА несколько чаще встречались в группе ТЛТ (таблица 7). В группе хирургического лечения в одном случае причиной смерти стал прогрессирующий онкологический процесс, в другом – раневые инфекционные осложнения, в третьем случае – рецидив ТЭЛА. В группе пациентов с ТЛТ подавляющим большинством причиной смерти стал рецидив ТЭЛА (n=8; 40%), в одном случае – ИМ. Таким образом, в общей выборке пациентов наиболее частым неблагоприятным событием стал летальный исход

и рецидив ТЭЛА. Другие неблагоприятные кардиоваскулярные события регистрировались в единичных случаях (таблица 7).

На момент обследования пациентов в отдаленном периоде субъективная отрицательная динамика в виде постепенного нарастания одышки наблюдалась у пяти больных группы ТЛТ, тогда как в группе хирургического лечения такие пациенты отсутствовали. Более половины пациентов каждой группы имели III функциональный класс (ФК) ХСН (NYHA). Тем не менее, отсутствовали пациенты, которые бы имели одышку в состоянии покоя. Декомпенсации хронического легочного сердца и признаков острого легочного сердца также не было ни в одном случае (таблица 2).

Всем пациентам была проведена контрольная ЭхоКГ. По данным статистического анализа полу-

чена значимая динамика ряда показателей. В частности, в обеих группах наблюдалось ремоделирование миокарда как правого, так и левого сердца, проявлявшееся в дилатации камер левого сердца (в большей степени выраженной в группе ТЛТ) и уменьшением правых отделов в сравнении с исходными данными. Тем не менее, положительная динамика снижения систолического давления в легочной артерии сохранилась как в группе ТЛТ, так и в группе хирургического лечения (таблица 4). Данная динамика демонстрирует компенсаторное ремоделирование отделов сердца, а также эффективность проведенного лечения.

По результатам ПСЛ обе группы статистически не отличались. У большей части больных общей выборки (60%) выявлялось отклонение в разнице интенсивности накопления радиофармацевтического препарата между правым и левым легким ($10,09 \pm 8,47\%$), в половине случаев наблюдались краевые дефекты перфузии, крупные дефекты перфузии имели место у одного пациента в каждой

Таблица 7.

Осложнения и исходы течения заболевания в отдаленном периоде наблюдения

Показатель	ТЛТ		Тромбэмболектомия		p
	N = 20	%	N=10	%	
Смерть	7	35	3	30	0,097
Рецидив ТЭЛА	7	35	2	20	0,74
Инфаркт миокарда	1	5	0	0	-
ОНМК/ТИА	0	0	1	10	-

группе (таблица 6). При этом сниженные показатели перфузии у подавляющего большинства локализовались в нижней зоне обоих легких, повышенный – в средней и верхней зоне (рис. 1, 2).

На момент обследования в отдаленном периоде наблюдения, приверженность к медикаментозной терапии демонстрировали 85% выживших пациентов, при этом лишь 45% больных принимали непрямые антикоагулянты. Большая часть пациентов соблюдала рекомендации по ношению компрессионного трикотажа (таблица 8).

Обсуждение

Очевидно, что у больных при ТЭЛА, в особенности пожилого возраста, имеющих тяжелую сопутствующую патологию, требуется максимально быстрая реализация оптимальной реперфузионной стратегии лечения [19]. Так, половина всех пациентов, включенных в представленное исследование, характеризовалась пожилым воз-

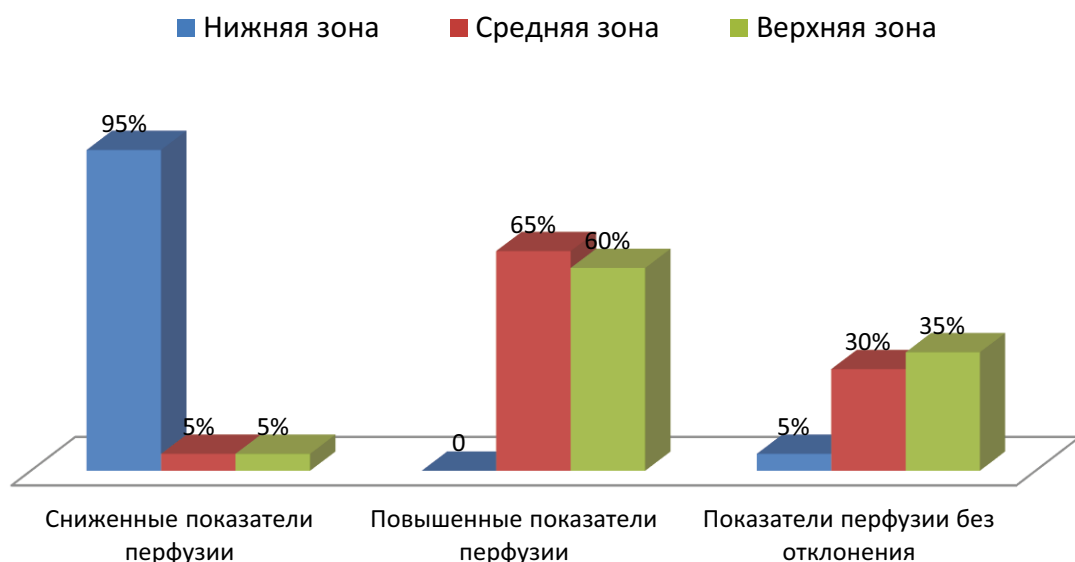


Рисунок 1. Показатели перфузии левого легкого

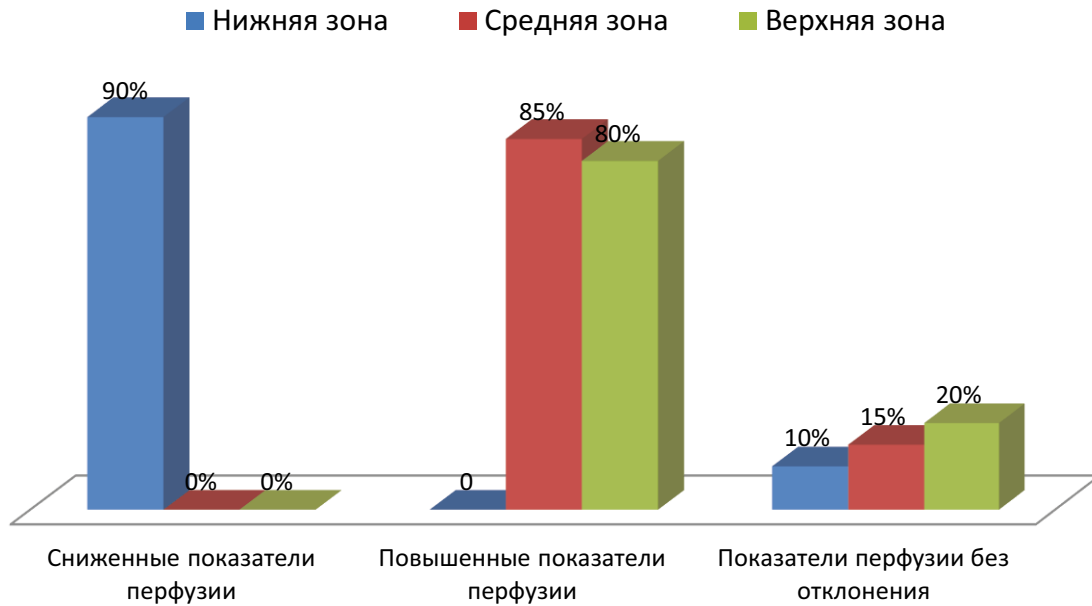


Рисунок 2. Показатели перфузии правого легкого

Таблица 8.

Антикоагулянтная терапия, комплаентность

Показатель	ТЛТ		Тромбэмболектomia		p
	N = 13	%	N=7	%	
Непостоянный прием лекарственных средств	3	23,07	0	0	-
Ношение компрессионного трикотажа	9	69,2	5	71,4	1
Прием НОАК	7	53,8	3	42,8	1
Варфарин	6	46,1	4	57,1	1
Ксарелто	5	38,5	3	42,8	1

растом по классификации ВОЗ и имела серьезные сопутствующие хронические заболевания. На основании действующих рекомендаций, методом выбора реперфузии при ТЭЛА является ТЛТ. Однако, по данным ряда исследований, хирургическая тромбоэмболектomia из легочной артерии демонстрирует более благоприятное воздействие на долгосрочные результаты, более эффективно, в сравнении с ТЛТ, обеспечивает легочную перфузию, профилактируя развитие ПТЭЛГ [4,5]. Так, по результатам проведенного исследования, наибольшее число пациентов с отрицательной динамикой клинического статуса и легочной гипертензией в отдаленном периоде наблюдалось в группе пациентов после ТЛТ.

В настоящее время локализация эмболов в легочной артерии не рассматривается как значимый фактор, влияющий на выбор опти-

мальной реперфузионной стратегии и прогноз неблагоприятного госпитального исхода. Несмотря на это, в ряде исследований было подчеркнуто, что тромбоэмболия мелких ветвей по сравнению с субмассивной и массивной ТЭЛА несет более благоприятный прогноз [20,21]. В данной когорте пациентов отмечались тяжелые клинические проявления заболевания, высокие показатели систолического ДЛА и выраженные расстройства газообмена и гемодинамического статуса. Выживаемость у больных с массивной и субмассивной ТЭЛА была значительно ниже, чем у пациентов с сегментарным и субсегментарным тромбозом [22-24].

На основании действующих рекомендаций, при выборе стратегии лечения в должной степени не учитывается морфология и локализация тромбоэмболов [4,5], что, вероятно, является их существенным ограничением. Можно предпо-

ложить, что в определенных ситуациях (крупный тромбоэмбол с локализацией в стволе легочной артерии и/или крупных проксимальных ее ветвях) даже при стабильной гемодинамике хирургическая тромбоэмболектомия может быть более эффективной по сравнению с ТЛТ опцией реперфузии [25].

В представленном исследовании в общей выборке пациентов по результатам МСКТ-АГ преобладала двусторонняя субмассивная ТЭЛА, что свидетельствует о тяжести заболевания и неблагоприятном прогнозе вне реперфузионного лечения. У подавляющего большинства пациентов на фоне повышенного систолического ДЛА (сДЛА) отмечалась дилатация правых отделов сердца и признак McConnell (гипокинезия стенок ПЖ) в сочетании с регургитацией на трехстворчатом клапане II-III ст. По данным литературы, имеется корреляция между выраженностью сократительной дисфункции ПЖ, его дилатации и уровнем сДЛА [26].

В 10 из 30 случаев на основании данных МСКТ-АГ в качестве реперфузионной стратегии была выбрана хирургическая, важно отметить, что в трех случаях операция выполнялась после неуспешной ТЛТ. Проведенное лечение продемонстрировало удовлетворительные показатели выживаемости и эффективности, что проявилось в существенном регрессе клинических симптомов и значимом снижении выраженности легочной гипертензии и положительном remodelировании правых отделов сердца с уменьшением проявлений трикуспидальной недостаточности. На момент выписки и контрольной точки наблюдалась тенденция к уменьшению дилатации и зон гипокинезии правых отделов сердца, сопряженная с нормализацией сДЛА.

Несмотря на высокий риск геморрагических осложнений, связанных как с ТЛТ, так и с операцией, в исследуемой выборке пациентов тяжелых или фатальных кровотечений отмечено не было. Вероятнее всего, это было связано с тщательной оценкой показаний и противопоказаний к ТЛТ или хирургической тромбоэмболектомии, основанной на стратификации риска геморрагических осложнений.

В отличие от обнадеживающих госпитальных результатов лечения, пациенты исследуемой выборки в отдаленном периоде наблюдения продемонстрировали высокие показатели ле-

тальности, достигшие в общей выборке спустя 3 года 33%. Большинство фатальных исходов имело место в группе ТЛТ и было связано с рецидивом ТЭЛА. Вероятнее всего, это отражает низкую комплаентность пациентов к антикоагулянтной терапии. Среди выживших пациентов 55% имели проявления легочной гипертензии, тем не менее, среднее значение сДЛА составило лишь $35,9 \pm 11,5$ мм рт.ст. На этапе контрольного исследования четверть больных общей выборки имели клинические и эхокардиографические признаки сердечной недостаточности и компротации гемодинамики в малом круге кровообращения. Каждый третий – высокую вероятность ТЭЛА по системе PIONEER при ПСЛ, что отражало персистирующие нарушения легочной перфузии. Группа ТЛТ характеризовалась большей долей пациентов, имевших признаки легочной гипертензии в отдаленном периоде наблюдения по сравнению с группой хирургического лечения, что наряду с меньшим количеством пациентов в группе тромбоэмболектомии, имеющих дыхательную недостаточность и рецидивы ТЭЛА свидетельствует, о большей эффективности хирургического лечения.

По результатам проведенного исследования, на момент контрольной точки все пациенты имели дефекты перфузии разного объема, при этом у 15% пациентов отмечались крупные или сегментарные дефекты, локализующиеся в подавляющем большинстве случаев в нижних отделах легких. Наличие крупных дефектов перфузии сопровождалось выраженными изменениями по ЭхоКГ: дилатация правых отделов, высокая сДЛА. Данный факт подчеркивает эффективное комбинированное применение этих методов исследования для диагностики ТЭЛА и выраженности нарушений легочной перфузии в госпитальном и отдаленном периоде наблюдения. Полученные данные свидетельствуют о неполной эффективности реперфузионного лечения и существенных нарушениях легочной перфузии у каждого седьмого из выживших пациентов.

Таким образом, полученные результаты реперфузионного лечения пациентов с острой ТЭЛА позволяют сделать выводы об эффективности и безопасности ТЛТ и хирургической тромбоэмболектомии в госпитальном периоде и необходимостью применения каждой из этих стратегий, а в ряде случаев и их комбинации.

Высокая частота смертельных исходов, достигающая к третьему году наблюдения 33%, реализуемая в большинстве случаев через рецидивы ТЭЛА, свидетельствует о низкой комплаентности пациентов к назначаемой терапии и необходимости более активной мотивации больных к лечению при тщательном амбулаторном контроле.

Существующие рекомендации по лечению пациентов с ТЭЛА не содержат достаточной доказательной базы относительно такой опции реперфузии, как хирургическая тромбоэмбоэктомия, что приводит к недостаточно частому ее применению в клинике. В связи с этим требуются дальнейшие исследования в этой области, направленные на сравнение медикаментозного и хирургического метода восстановления легочной перфузии. Актуальность данного вопроса подтверждается субоптимальными клиническо-инструментальными отдаленными результатами лечения пациентов, что, в частности, может быть связано с недостаточной частотой применения хирургической опции лечения и низкой комплаентностью больных к назначаемой медикаментозной терапии на амбулаторном этапе.

Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало эффективность реперфузионного лечения (ТЛТ или хирургическая тромбоэмбоэктомия) у пациентов с острой ТЭЛА, что проявлялось регрессом клинической симптоматики, физиологическим ремоделированием правых отделов сердца, значимым снижением давления в легочной артерии и уменьшением недостаточности трехстворчатого клапана уже в госпитальном периоде. В отдаленном периоде наблюдения ($35,31 \pm 7,15$ месяцев) выживаемость больных общей выборки составила 67%, значимо не различаясь в группах ТЛТ и хирургического лечения. Тромбоэмбоэктомия не ассоциировалась с высоким риском геморрагических осложнений. Наличие значимых дефектов перфузии легких по результатам ПСЛ у каждого седьмого из выживших пациентов с сохранением легочной гипертензии более чем в половине случаев может быть следствием недостаточно частого использования хирургической опции лечения в клинической практике. Об этом же

свидетельствует несколько большая эффективность хирургической тромбоэмбоэктомии по влиянию на клиническую симптоматику и наличие легочной гипертензии в отдаленном периоде наблюдения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Wiener R.S., Schwartz L.M., Woloshin S. Time trends in pulmonary embolism in the United States: evidence of overdiagnosis. *Arch Intern Med.* 2011;171:831–837.
2. Laporte S., Mismetti P., Decousus H. et al. Clinical predictors for fatal pulmonary embolism in 15,520 patients with venous thromboembolism: findings from the Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbolica venosa (RIETE) Registry. *Circulation.* 2008;117:1711–1716.
3. Aujesky D., Hughes R., Jimenez D. Short-term prognosis of pulmonary embolism. *J Thromb Haemost.* 2009;7 (Suppl. 1): 318–321.
4. Konstantinides S.V., Torbicki A., Agnelli G. et al. Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology(ESC). 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J.* 2014 Nov 14;35(43):3033–3069
5. Jaff M.R., McMurtry M.S., Archer S.L et al. Management of massive and submassive pulmonary embolism, iliofemoral deep vein thrombosis, and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011;123:1788–1830.
6. Wan S., Quinlan D.J., Agnelli G. et al. Thrombolysis compared with heparin for the initial treatment of pulmonary embolism: a meta-analysis of the randomized controlled trials. *Circulation.* 2004;110:744–749.
7. Thabut G., Thabut D., Myers R.P. et al. Thrombolytic therapy of pulmonary embolism: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1660–1667.
8. Kearon, C., Kahn, S.R., Agnelli, G. et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2008;133:454S–545S.
9. Anand V., Garg S., Duval S., Thenappan T. A systematic review and meta-analysis of trials using statins in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 2016;6(3):295–301.

10. Карпенко А.А., Старосойская М.В., Чернявский М.А. и др. Отдаленные результаты хирургического лечения массивной тромбоэмболии легочных артерий. *Флебология*. 2012;1:52-55.

Karpenko A.A., Starosotskaya M.V., Chernyavsky M.A. et al. Long-term results of surgical treatment of massive pulmonary thromboembolism. *Phlebology*. 2012; 1: 52-55. [In Russ.]

11. Чернявский А.М., Новикова Н.В., Едемский А.Г. и др. Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия: сложные аспекты диагностики и лечения. *Медицинский алфавит*. 2015;10:5-9.

Chernyavsky A.M., Novikova N.V., Edemsky A.G. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: complex aspects of diagnosis and treatment. *Medical alphabet*. 2015; 10: 5-9. [In Russ.]

12. Гуревич М.А. Тромбоэмболия легочной артерии (вопросы клиники, диагностики и терапии) Альманах клинической медицины. 2015; 38: 90–94.

Gurevich M.A. Thromboembolism of the pulmonary artery (questions of the clinic, diagnosis and therapy) *Almanac of clinical medicine*. 2015; 38: 90-94. [In Russ.]

13. Валеев И. Г., Закирова А. Н. Значение перфузионной сцинтиграфии в диагностике тромбоэмболии легочной артерии. Тезисы VIII Всероссийского форума «Вопросы неотложной кардиологии»; 2015. С.12-13.

Valeev I.G., Zakirova A.N. The meaning of perfusion scintigraphy in the diagnosis of pulmonary artery thromboembolism. *Theses of the VIII All-Russian Forum «Urgent Cardiology»*; Moscow; 2015. P. 12-13. [In Russ.]

14. Zarrabi K., Zolghadrasli A., Ostovan M. et al. Residual pulmonary hypertension after retrograde pulmonary embolectomy: long-term follow-up of 30 patients with massive and submassive pulmonary embolism. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;17(2):242-6.

15. Грабовский Ю.В. Опыт диагностики тромбоэмболии легочной артерии при помощи перфузионной пульмосцинтиграфии с ^{99m}Tc-макроальбумин. *Экстренная медицина*. 2016;2:209-213.

Grabovsky Yu.V. The experience of diagnosis of pulmonary embolism by perfusion pulmoscintigraphy with ^{99m}Tc-makro-albumon. *Emergency medicine*. 2016, 2: 209-213. [In Russ.]

16. Валеев И.Г., Закирова А.Н., Мухаметова

Л.И. и др. Значение перфузионной сцинтиграфии в диагностике тромбоэмболии легочной артерии. Тезисы VIII Всероссийского форума «Вопросы неотложной кардиологии»; Москва; 2015. С. 12-13.

Valeev I.G., Zakirova A.N., Mukhametova L.I. et al. Value of perfusion scintigraphy in the diagnosis of pulmonary embolism. *Questions of emergency cardiology: theses of the VIII All-Russian Forum*; Moscow; 2015. P. 12-13. [In Russ.]

17. Мигунова Е.В., Кудряшова Н.Е., Никитина О.В. и др. Оценка эффективности тромболитической терапии по данным перфузионной сцинтиграфии легких. *Молекулярная медицина*. 2013;4:46-50.

Migunova E.V., Kudryashova N.E., Nikitina O.V. et al. Evaluation of the effectiveness of thrombolytic therapy according to perfusion lung scintigraphy data. *Molecular medicine*. 2013; 4: 46-50. [In Russ.]

18. Малышенко Е. С., Попов В. А., Хаес Б. Л. Алгоритм интенсивного лечения острых тромбоэмболий легочной артерии: акцент на инвазивность. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2015;1:71 – 77.

Malysenko E.S., Popov V.A., Hayes B.L. Algorithm of intensive treatment of acute pulmonary thromboembolism: an emphasis on invasiveness. *Complex problems of cardiovascular diseases*. 2015; 1: 71-77. [In Russ.]

19. Никоненко А.С., Никоненко А.А., Матвеев С.А. Ближайшие результаты лечения тромбоэмболии лёгочной артерии Запорожский медицинский журнал. 2015;4:17-20.

Nikonenko A.S., Nikonenko A.A., Matveyev S.A. Upcoming results of treatment of pulmonary embolism. *Zaporozhye Medical Journal*. 2015; 4: 17-20. [In Russ.]

20. Alonso Martinez J.L., Annicchero Sánchez F.J., Urbiet Echezarreta M.A. et al. Central Versus Peripheral Pulmonary Embolism: Analysis of the Impact on the Physiological Parameters and Long-term Survival. *N Am J Med Sci*. 2016;8(3):134-142.

21. Donato A.A., Khoche S., Santora J. et al. Clinical outcomes in patients with isolated subsegmental pulmonary emboli diagnosed by multidetector CT pulmonary angiography. *Thromb Res*. 2010;126:e266–70.

22. Madani M.M., Auger W.R., Pretorius V. et al. Pulmonary endarterectomy: recent changes in a single institution's experience of more than 2,700 patients. *Ann Thorac Surg* 2012;94:97–103.

23. Mayer E., Jenkins D., Lindner J. et al. Surgical management and outcome of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: results from an international prospective registry. J Thorac Cardiovasc Surg 2011;141:702–710.

24. Toth P.P. Considerations for long-term anticoagulant therapy in patients with venous thromboembolism in the novel oral anticoagulant era. Vasc Health Risk Manag. 2016;12:23-34.

25. Абдульянов И.В., Вагизов И.И., Омеляненко А.С. Современная стратегия лечения острой тромбоэмболии легочной артерии. Практическая медицина. 2015;3-2:35-40.

Abduljanov I.V., Vagizov I.I., Omelyanenko AS Modern strategy of treatment of acute pulmonary

embolism. Practical medicine. 2015; 3-2: 35-40.

26. Матвеева Н.В., Нарциссова Г.П., Карпенко А.А. и др. Оценка ремоделирования полостей сердца у пациентов с острой тромбоэмболией легочной артерии методом трансторакальной эхокардиографии. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2013;1:11-14.

Matveeva N.V., Narcissova G.P., Karpenko A.A. et al. Evaluation of cardiac cavity remodeling in patients with acute pulmonary arterial thromboembolism using the method of transthoracic echocardiography. Pathology of blood circulation and cardiosurgery. 2013; 1: 11-14. [In Russ.]

Статья поступила 17.03.2017

Для корреспонденции:

Тарасов Роман Сергеевич

Адрес: 650002, г. Кемерово,
Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7 (923)526-04-46,

E-mail: roman.tarasov@mail.ru

For correspondence:

Tarasov Roman

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,
650002, Russian Federation

Тел. +7 (923)526-04-46,

E-mail: roman.tarasov@mail.ru

ПРЕДИКТОРЫ КОРОНАРНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА У МУЖЧИН С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Д. М. РУДАКОВА^{1,2}, Н. Г. ВЕСЕЛОВСКАЯ¹, Г. А. ЧУМАКОВА¹, Е. С. ОСИПОВА¹

¹ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет МЗ России, Барнаул, Россия

²КГБУЗ Алтайская краевая клиническая больница, Барнаул, Россия

Цель. Изучить совокупность факторов риска (ФР), наиболее значимо связанных с риском коронарного атеросклероза у мужчин с метаболическим синдромом (МС).

Материалы и методы. В исследование было включено 82 мужчины с МС по критериям ВНОК, 2009 г., в возрасте 39-73 лет ($56,42 \pm 7,3$ лет). Группу 1 ($n=40$) составили пациенты с МС и ИБС – стенокардией напряжения II-III ф. кл. и коронарным атеросклерозом по данным коронароангиографии; группу 2 ($n=42$) – пациенты с МС, не имеющие ИБС – стенокардии напряжения и признаков коронарного атеросклероза. В группах сравнения был проведен анализ основных и дополнительных метаболических ФР и с помощью метода логистической регрессии поиск наиболее неблагоприятной совокупности ФР, связанных с коронарным атеросклерозом у пациентов с МС.

Результаты. У пациентов группы 1 ($n=40$) были определены более высокие показатели инсулина ($p<0,001$), индекса HOMA-IR ($p<0,001$), Апо В ($p<0,05$), ЛПв ($p<0,05$), ИЛ-6 ($p<0,05$), ФНО- α ($p<0,05$), вЧСРБ ($p<0,05$) и более низкие показатели Апо А1 ($p<0,05$), апелина ($p<0,001$), чем в группе 2 ($n=42$). Наиболее неблагоприятной совокупностью ФР, связанных с коронарным атеросклерозом у пациентов с МС, стали показатели, характеризующие нейрогуморальную активность висцеральной жировой ткани (ВЖТ) (апелин), показатель липидного спектра крови (АпоВ), показатель углеводного обмена (инсулин), показатели провоспалительной активности плазмы (ИЛ-6, вЧСРБ) и показатель абдоминального ожирения (ОТ).

Заключение. Полученная совокупность предикторов позволяет выбрать более перспективные и рациональные схемы медикаментозной и немедикаментозной профилактики сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с МС. Полученные данные являются также ценным материалом для проведения дальнейших научных исследований с изучением роли нейрогуморальной и провоспалительной активности ВЖТ в риске развития ИБС у пациентов с МС.

Ключевые слова: метаболический синдром, коронарный атеросклероз, факторы риска.

PREDICTORS OF CORONARY ATHEROSCLEROSIS AT MEN WITH THE METABOLIC SYNDROME

D. M. RUDAKOVA^{1,2}, N. G. VESELOVSKAYA¹, G. A. CHUMAKOVA¹, E. S. OSIPOVA¹

¹Internal medicine, Altay State Medical University, Barnaul, Russia

²Altay regional hospital, Barnaul, Russia

The purpose. To study set of the risk factors (RF) which are most significantly connected with risk of coronary atherosclerosis at men with the metabolic syndrome (MS).

Material and methods. The research included 82 men from MS by criteria of BHOK, 2009, at the age of 39 - 73 years ($56,42 \pm 7,3$ years). Group 1 ($n=40$), patients with MS and a coronary heart disease: angina of pectoralis of II-III f.cl. and a coronary atherosclerosis according to a coronaroangiography, group 2 ($n=42$), patients about the MS which don't have a coronary heart disease: angina of pectoralis and symptoms of coronary atherosclerosis. In groups of comparison the analysis of the main and additional metabolic RF and by means of a method of logistic regression search of the most adverse set of RF bound to a coronary atherosclerosis at patients with MS was carried out.

Results. At patients of group 1 ($n=40$) higher rates of insulin ($p<0,001$), HOMA-IR index ($p<0,001$), Apo B ($p<0,05$), LPA ($p<0,05$), IL-6 ($p<0,05$), FNO- α ($p<0,05$), CRP ($p<0,05$) and lower indicators of ApoA1 ($p<0,05$), apelin ($p<0,001$), than in group 2 ($n=42$) were defined. The predictors which are the most significantly connected with coronary atherosclerosis at patients with in steel MS: apelin, ApoB, insulin, IL-6, CRP and waist circumference.

Conclusion. The received set of predictors allows to choose more perspective and schemes of prophylaxis of cardiovascular complications at patients with MS are rational. The obtained data, are also valuable material for carrying out further scientific research with studying of a role of neurohormonal and pro-inflammatory activity of visceral adipose tissue in risk of development of a coronary heart disease in patients with MS.

Keywords: metabolic syndrome, coronary atherosclerosis, risk factors.

Большой интерес к метаболическому синдрому (МС) до настоящего времени связан с его высокими распространенностью и риском развития атеросклероза, в том числе коронарного. В общей популяции распространенность МС колеблется от 14 до 40% [1]. Так, в одном из крупных исследований показано, что МС встречается у 47 млн американцев, что составляет 23,7% всей популяции [2]. У пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) признаки МС были выявлены у 65,6% больных с нормальным индексом массы тела (ИМТ) и 96,3% больных с ожирением [3]. Проведено множество исследований, доказывающих связь МС с повышенным сердечно-сосудистым риском [4,5,6]. В исследовании Moger G.C. et al., 2014, (n=1369), было показано, что МС встречается в популяции в 22,7% случаев и связан с более высоким риском развития сердечно-сосудистых событий [7].

Тем не менее, в последние годы появились публикации с критическим отношением к МС. Сомнения и вопросы связаны с правомочностью существования МС как клинического диагноза. Остается открытым вопрос о прогностическом значении МС в отношении ишемической болезни сердца (ИБС), так как отсутствует четкая обоснованность пороговых значений основных и дополнительных сердечно-сосудистых факторов риска (ФР), включенных в понятие МС.

Таким образом, это диктует необходимость более тщательного подхода к диагностике МС для выделения группы пациентов действительно высокого риска ИБС с поиском наиболее значимой совокупности ФР, связанных с коронарным атеросклерозом у этой категории больных.

Цель исследования

Выявить совокупность ФР, наиболее значимо связанных с риском развития коронарного атеросклероза у мужчин с МС.

Материал и методы

В исследовании участвовали 170 пациентов мужчин, поступивши в Алтайский краевой кардиологический диспансер с неуточненным болевым синдромом с целью верификации диагноза стенокардии, имеющие гипертоническую болезнь I-II стадии (АГ) и другие критерии МС (ВНОК, 2009). Всем пациентам проводилась ве-

лоэргометрия (ВЭМ). При наличии положительного теста проводилась коронароангиография (КАГ), а при отрицательном тесте – мультиспиральная компьютерная томография коронарных артерий (МСКТ КА).

Таким образом, в исследование было включено 82 мужчины с МС в возрасте 39-73 лет ($56,42 \pm 7,3$ лет). Группу 1 (n=40), составили пациенты с МС, стенокардией напряжения II-III ф кл. и коронарным атеросклерозом по данным КАГ, группу 2 (n=42) – пациенты с МС, не имеющих признаков стенокардии напряжения и коронарного атеросклероза по данным МСКТ КА.

ВЭМ проводили всем пациентам при отсутствии противопоказаний при включении в исследование. Критериями прекращения пробы считались: развитие типичного приступа стенокардии, горизонтальное или косонисходящее смещение сегмента ST больше 1 мм от изолинии, инверсия зубца Т, жизнеугрожающие нарушения ритма сердца, снижение АД во время нагрузки на 20 мм рт.ст. или повышение АД, превышающее исходное на 50%, появление слабости, головокружения, одышки, невозможности продолжения пробы в связи с усталостью пациента или при достижении субмаксимальной частоты сердечных сокращений.

Селективная КАГ с определением протяженности и диаметра пораженных сосудов в период стационарного лечения проводилась на ангиографическом аппарате INNOVA 3100 (США). Проводили пункцию бедренной или лучевой артерии под местной анестезией по методу Селдингера с установкой интродьюсера 6-7 Fr.

При МСКТ КА проводился кальций-скрининг (определение индекса коронарного кальция), а затем визуализация коронарных артерий на мультиспиральном рентгеновском компьютерном томографе Aquilion-64 «Toshiba» (Япония) с обработкой данных на рабочей станции VITREA.

Всем пациентам была проведена оценка основных метаболических ФР: глюкозы крови, общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов высокой и низкой плотности (ХСЛПВП/ХСЛПНП).

Также всем пациентам была проведена оценка дополнительных метаболических факторов риска: определение аполипопротеина А1 (АпоА1), аполипопротеина В (АпоВ) и липопротеина а (ЛП_а) проводилось с использованием метода, основанного на измерении иммуно-

преципитации, усиленной полиэтиленгликолем, при 340 нм на аналитической биохимической платформе Modular SWA (Roshe); оценку уровня инсулина в сыворотке проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы DRG (США); для оценки степени резистентности к инсулину использовалась малая модель гомеостаза (HomeostasisModelAssessment) с определением индекса HOMA-IR, вычисление которого проводилось по формуле: $[\text{инсулин натошак (мкМЕ/мл)} \times \text{глюкоза крови натошак (ммоль/л)}] / 22,5$; определение концентрации цитокинов – фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкин-6 (ИЛ-6) в сыворотке крови проводили методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск); определение высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ), проводимым методом иммунопреципитации с латексным усилением с использованием наборов ThermoFisherScientific (Финляндия) на автоматическом биохимическом анализаторе. Уровень апелина в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного анализа реагентами BenderMedSystem (Австрия) в соответствии с инструкциями по постановке на иммунохимическом автоматическом анализаторе «IMMULITE 2000 (SIEMENS)».

Методы статистического анализа

Процедуры статистического анализа выполнялись с помощью статистического пакета STATISTICA 10. Проверка нормальности рас-

Таблица 1.

Клиническая характеристика пациентов в группах сравнения

Показатель	1 группа (n = 40)	2 группа (n = 42)	P
Возраст, лет	56,63±0,90	58,79±1,20	P1-2> 0,05
ОТ, см	110,03±1,60	108,62±1,10	P1-2> 0,05
ОБ, см	102,40±1,20	99,86±0,60	P1-2> 0,05
ИМТ, кг/м ²	32,36±0,60	31,13±0,40	P1-2> 0,05
Табакокурение, n (%)	14(35)	19(45)	P1-2> 0,05
САД мм.рт.ст.	168,30±13,90	161,20±13,40	P1-2> 0,05
ДАД мм.рт.ст.	99,30±12,40	96,90±12,10	P1-2> 0,05
Наследственность, отягощенная по ССЗ, n (%)	13 (32%)	10 (23%)	P1-2> 0,05
ХСН (ф.кл. по NYHA)	1,2±0,4	1,4±0,6	P1-2> 0,05

Примечание: ОТ – окружность талии, ОБ – окружность бедер, САД – систолическое АД, ДАД – диастолическое АД, ХСН – хроническая сердечная недостаточность

пределения количественных признаков в отдельных группах сравнения проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка средних арифметических и среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего, а также коэффициента вариации, медианы, определение 25% и 75% процентилей. Deskриптивные статистики в тексте представлены как $M \pm SD$, где M – среднее, а SD – стандартное отклонение. Для сравнения двух независимых групп использовался метод Манна-Уитни. Анализ взаимосвязи между одним качественным признаком, выступающим в роли зависимого, результирующего показателя (коронарный атеросклероз) и подмножеством количественных признаков проводился с использованием метода логистической регрессии с пошаговым включением и исключением предикторов. Результат оценки уравнения логистической регрессии представлен коэффициентами регрессии, достигнутым уровнем значимости, а также оценкой показателя согласия (Concordant) фактической принадлежности пациента к той или иной из групп и теоретической принадлежности, полученной по уравнению логит-регрессии. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05.

Результаты

Прежде всего проведено сопоставление клинических характеристик пациентов (таблица 1) в группах сравнения.

При сравнении клинических ФР группы не отличались по возрасту, курению, отягощенной наследственности, параметрам ожирения и исходным цифрам артериального давления.

Несмотря на то, что обе группы мужчин имели критерии МС и не отличались по основным

Таблица 2.

Сравнительная характеристика метаболических ФР в группах 1 и 2

Показатель	Группа 1 (n = 40)	Группа 2 (n = 42)	P
Общий холестерин, ммоль/л	6,84±0,20	5,16±0,2	>0,05
ЛПНП, ммоль/л	4,81±0,20	3,45±0,16	> 0,05
ЛПВП, ммоль/л	1,0±0,00	1,02±0,04	> 0,50
Триглицериды, ммоль/л	3,16±0,2	3,02±0,13	> 0,50
Апо А1, мг/дл	84,27±2,8	98,16±4,1	<0,05
Апо В, мг/дл	114,62±5,3	90,47±3,4	<0,05
ЛПa, мг/дл	48,81±6,4	39,13±4,2	<0,05
Глюкоза, ммоль/л	5,80±0,11	5,87±0,12	>0,50
Инсулин, мкМЕ/мл	13,40±0,40	9,08±0,50	<0,001
НОМА-IR, усл. ед.	4,07±0,16	2,36±0,10	<0,001
ФНО-α, пг/л	5,50±0,36	3,41±0,20	<0,05
ИЛ-6, пг/л	6,35±0,31	3,45±0,02	<0,05
вчСРБ, мг/л	8,78±0,43	6,44±0,4	<0,05

Было выявлено, что группы сравнения не отличались по основным показателям липидного спектра крови: ОХС, ХС ЛПНП, ТГ, ХС ЛПВП. Но в группе 1 пациентов с МС и коронарным атеросклерозом были выявлены более высокие показатели АпоВ, ЛПa и более низкие показатели Апо А1.

При проведении сравнительного анализа показателей углеводного обмена было выявлено, что в группе 1 определялись более высокие по-

казатели инсулина и индекса НОМА-IR.

В группе 1 пациентов, имеющих коронарный атеросклероз на фоне МС, определялись более высокие показатели ФНО-α, ИЛ-6 и вчСРБ (таблица 2).

Нами проведен анализ уровня апелина в группах с МС и коронарного атеросклероза (группа 1) и в группе пациентов с МС, но без коронарного атеросклероза (группа 2) (рис. 1).

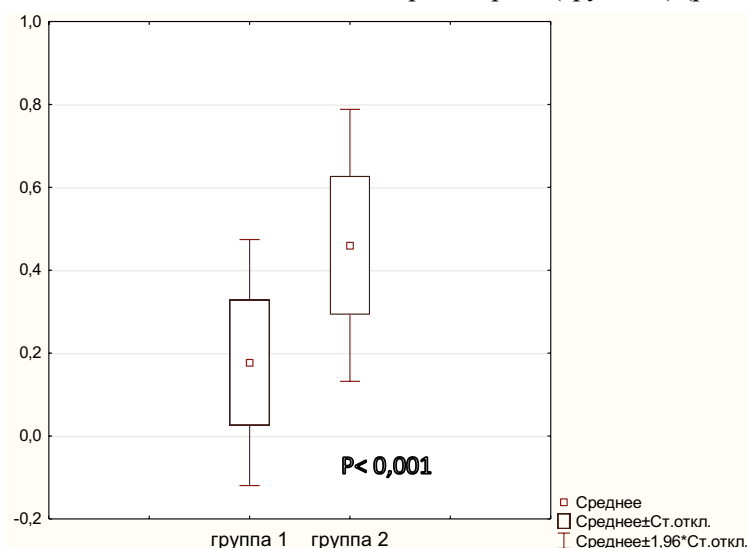


Рисунок 1. Средние показатели апелина в группах сравнения

Было выявлено, что в группе 1 уровни апелина были статистически значимо ниже и составили $0,17 \pm 0,15$ пг/л, в сравнении с группой 2 – $0,46 \pm 0,15$ пг/л ($p < 0,001$).

Важно, что выделение группы риска атеросклероза среди пациентов с МС позволит оптимизировать первичную профилактику ИБС. Вероятностная природа причинно-следственных связей в развитие коронарного атеросклероза в большинстве случаев является многофакторной. Поэтому нами были проведены поиск и изучение наиболее значимой совокупности ФР у пациентов с МС, связанных с риском коронарного атеросклероза методом логистической регрессии.

Для построения логистических уравнений использовалось около 20 количественных и качественных ФР в самых разнообразных сочетаниях. Анализ проводился независимо от фактора курения и возраста, которые не включались в

анализ как общепринятые факторы риска атеросклероза. При построении моделей логистической регрессии использовался единый алгоритм. На первом этапе производился отбор переменных для включения в модели с помощью оценки значимости различий между группами с наличием или отсутствием коронарного атеросклероза по каждому признаку.

Всего было получено около 10 уравнений логит-регрессии, из которых производился отбор уравнения, имеющего самые высокие значения процента верного предсказания. В результате было получено уравнение, которое показало наибольшую предсказательную ценность совокупности предикторов. При оценке уравнения регрессии использовался метод пошагового включения предикторов, который ранжирует признаки в соответствии с их вкладом в модель. Уравнение имело следующий окончательный вид:

$$P = \frac{\exp(-6,0351 + 0,0794 \cdot X_1 + 0,00354 \cdot X_2 + 0,2345 \cdot X_3 + 1,098 \cdot X_4 + 0,2567 \cdot X_5 + 0,0783 \cdot X_6)}{1 + \exp(-6,0351 + 0,0794 \cdot X_1 + 0,00354 \cdot X_2 + 0,2345 \cdot X_3 + 1,098 \cdot X_4 + 0,2567 \cdot X_5 + 0,0783 \cdot X_6)}$$

где P – вероятность наличия коронарного атеросклероза в %, X_1 – значение вчСРБ в мг/л; X_2 – значение апелина в пг/л; X_3 – значение АпоВ в мг/дл; X_4 – значение ИЛ-6 в пг/л; X_5 – значение инсулина в мкМЕ/мл; X_6 – значение ОТ в см, $-6,0351$ – свободный член уравнения

Уровень значимости для включения предикторов в уравнение регрессии задавался таким образом, чтобы достигнутый уровень значимости критерия Вальда Хи-квадрат для каждого предиктора по окончании пошаговой процедуры не превышал 10%. Пошаговый порядок (Step) включения отобранных предикторов (Variable) в

уравнение с указанием процента верного предсказания на каждом шаге и коэффициентов регрессии отражен в таблице 3, по которой можно проследить динамику предсказательной ценности предикторов и их совокупности при оценке уравнения логит-регрессии в целом.

Таблица 3.

Результаты пошаговой процедуры логистической регрессии

Шаг	Показатель Апелин и Инсулин	Статистика Вальда Хи-ква- драт	Стандарти- зованный коэффициент регрессии	Процент верно- го предсказания	P
1	вчСРБ	14,543	0,4186	54,6%	<0,0001
2	апелин	21,734	0,3037	66,1%	<0,0001
3	АпоВ	24,467	0,2351	73,4%	<0,0001
4	ИЛ-6	27,432	0,2089	76,2%	<0,0001
5	инсулин	28,354	0,1935	78,3%	<0,0001
6	ОТ	29,213	0,1432	80,1%	<0,0001

Полученное уравнение с одним предиктором обеспечивало уровень конкордации в 54,6%, тогда как с двумя предикторами эта величи-

на составила уже 66,1%, далее при включении остальных предикторов в уравнение логит-регрессии уровень конкордации увеличивался не-

значительно, и его значение для всего уравнения составило 80,1%. Другие липиды не вошли в данную совокупность, так как были исходно сопоставимы в группах.

Таким образом, у мужчин с МС значимой совокупностью предикторов, обеспечивающей процент верного предсказания коронарного атеросклероза 80,1%, были показатели, характеризующие нейрогуморальную активность висцеральной жировой ткани (апельин), показатель липидного спектра крови (АпоВ), показате-

тель углеводного обмена (инсулин), показатель провоспалительной активности плазмы (ИЛ-6, вчСРБ) и показатель абдоминального ожирения (ОТ).

Для оценки качества полученной модели кроме процента верных отнесений использовалось построение ROC-кривой. Оценивалась площадь под ROC-кривой, которая составила 0,8150, что указывает на высокое качество полученной математической модели.

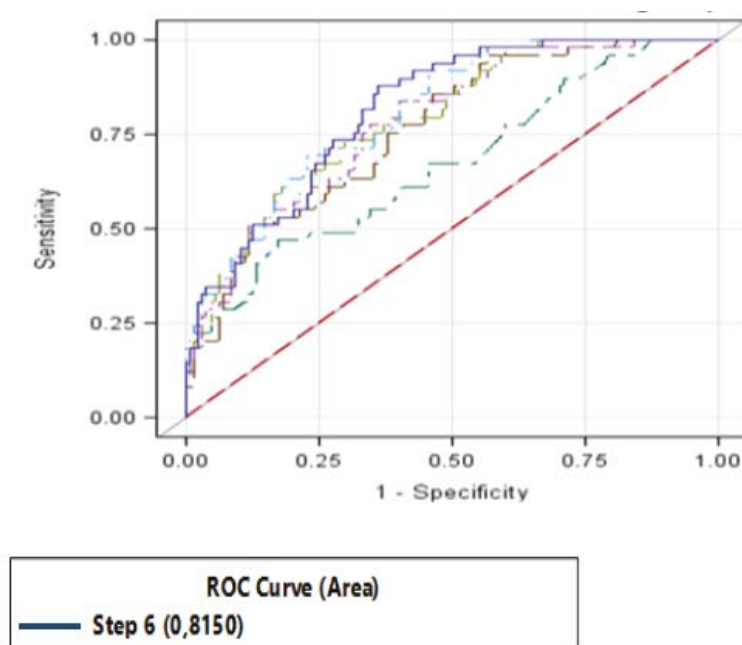


Рисунок 2. ROC-кривая. Площадь под кривой на 6 шаге включения равна 0,8150

Обсуждение

В нашем исследовании у пациентов с МС в группе 1, имеющих коронарный атеросклероз, определялись более высокие уровни показатели липидного спектра крови: ЛП_а, АпоВ и АпоА. Так, ранее было изучено, что ЛП_а участвует в процессе сосудистого воспаления, индуцируя экспрессию молекул адгезии на эндотелий сосудов, хемотаксис моноцитов и пролиферацию гладко-мышечных клеток, тем самым потенцируя развитие и прогрессирование атеросклероза. Кроме того, было выявлено, что ЛП_а, циркулируя в кровотоке, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов сосудистым эндотелием [8].

Известно, что механизмом, связывающим ожирение и метаболические нарушения с коро-

нарным атеросклерозом, является инсулинорезистентность (ИР). У пациентов с гиперинсулинемией отмечается высокая постпрандиальная дислипидемия, что играет важную роль в формировании атеросклероза. В нашем исследовании у пациентов группы 1 были более высокие показатели инсулина и индекса НОМА-ИР. Так, в одном из исследований у бессимптомных пациентов ИР ассоциировалась с коронарным атеросклерозом независимо от других ФР [9]. Ранее было показано, что показатели ИР связаны с эпикардальным ожирением и коронарным атеросклерозом [10].

В нашем исследовании наиболее неблагоприятной совокупностью ФР, связанных с коронарным атеросклерозом у пациентов с МС, стали показатели провоспалительной активности плазмы (ИЛ-6, вчСРБ), апельин, АпоВ, инсулин

и ОТ.

В ряде научных работ доказано, что именно центральное (абдоминальное), а не общее ожирение, в виде увеличенного ИМТ, связано с повышенным риском развития ИБС и ее осложнений. При абдоминальном ожирении увеличивается количество висцерального жира брыжейки, межпечерного пространства, большого и малого сальников. В отличие от подкожной жировой ткани, висцеральный жир представляет собой гормонально-активную белую жировую ткань, которая продуцирует большое количество биологически-активных веществ – адипокинов, хемокинов, цитокинов, активно участвующих в метаболических нарушениях, процессах воспаления, тромбообразования и атерогенеза. Одним из таких адипокинов является апелин, представляющий собой пептид, идентифицированный как лиганд для ангиотензинподобных рецепторов-1, который в основном секретируется эндотелиальными клетками и адипоцитами жировой ткани. Данные о роли апелина в риске развития ИБС и сердечно-сосудистых осложнений (ССО), по литературным источникам противоречивы, нет данных о связи апелина и коронарного атеросклероза у пациентов с МС.

Ранее по результатам экспериментальных исследований было показано, что лечение больных с ожирением апелином приводит к снижению инсулина в крови, улучшению усвоения глюкозы и активации липолиза. В ряде исследований продемонстрировано, что при ожирении и сахарном диабете 2 типа плазменные уровни апелина, а также экспрессия гена апелина в жировой ткани увеличивается [11,12]. В другом исследовании авторы после обследования 290 мужчин показали, что ожирение не было связано с увеличением уровня апелина [13]. В нашем исследовании у пациентов с МС и коронарным атеросклерозом (группа 1) уровень апелина был меньше, чем в группе пациентов с МС без коронарного атеросклероза (группа 2).

ИЛ-6 – многофункциональный цитокин, продуцируемый многими клетками в организме, включая адипоциты висцеральной жировой ткани, синтезирующие до 35% циркулирующего в плазме ИЛ-6 [14]. В нашем исследовании у пациентов с МС и коронарным атеросклерозом средние показатели ИЛ-6 были выше, чем в группе без коронарного атеросклероза. Кроме

того, данный ФР вошел в совокупность наиболее значимых предикторов, связанных с ИБС у пациентов с МС. Действительно, ожирение ассоциируется с увеличением уровня ИЛ-6 в организме, тогда как снижение веса приводит к уменьшению его концентрации. ИЛ-6 совместно с другими цитокинами является медиатором атеротромбоза, посредством стимуляции синтеза металлопротеиназ, окисления липидов [15]. В одном из исследований у пациентов с МС ИЛ-6 был предиктором наличия эндотелиальной дисфункции и повышения жесткости артериальной стенки [16]. В другом исследовании уровень провоспалительных цитокинов был связан с прогрессированием коронарного атеросклероза и развитием ССО [17].

В нашем исследовании показатели СРБ были выше в группе ИБС, кроме того, вЧСРБ вошел в совокупность наиболее неблагоприятных предикторов, связанных с коронарным атеросклерозом, при проведении логистического регрессионного анализа. Известно, что СРБ является одним из основных маркеров хронического воспаления и непосредственно участвует в прогрессировании атеросклероза КА [18]. В одном из исследований выявлено, что висцеральная жировая ткань (ВЖТ) стимулирует синтез СРБ [19]. Ранее была выявлена связь СРБ с атеросклеротическим поражением как коронарных, так и других периферических артерий [20]. Доказано, что СРБ и окисленные ХСЛПНП непосредственно связаны с воспалительным повреждением артерий при ИБС [21].

Заключение

Принятые в настоящее время критерии диагностики МС недооценивают роль гормональной активности ВЖТ и не всегда дифференцируют группу высокого коронарного риска у пациентов с абдоминальным ожирением.

Результаты проведенного исследования предлагают совокупность наиболее значимых предикторов коронарного атеросклероза у мужчин с МС, которые могут быть включены в алгоритм обследования, что позволит выбрать более рациональные схемы медикаментозной и немедикаментозной профилактики атеросклероза у данной категории пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES:

1. World Health Organization: Obesity and overweight fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Accessed 04 Nov 2016.
2. Stevens G.A., Singh G.M., Lu Y., Danaei G., Lin J.K., Finucane M.M. et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr.* 2012; 10: 22-26.
3. Квиткова Л.В., Бородкина Д.А., Груздева О.В. Метаболические признаки абдоминального ожирения у больных острым инфарктом миокарда с нормальной и повышенной массой тела. *Проблемы эндокринологии.* 2012; 4: 27-31.
4. Kvitkova L.V., Borodkina D.A., Gruzdeva O.V. Metabolic symptoms of abdominal obesity at patients with an acute myocardial infarction with the normal and increased body weight. *Endocrinology problems.* 2012; 4: 27-31. [In Russ]
5. Mottillo S., Filion K.B., Genest J., Joseph L., Pilote L., Poirier P., et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J AM Coll Cardiol.* 2010; 56: 1113–1132.
6. Gami A.S., Witt B.J., Howard D.E., Erwin P.J., Gami L.A., Somers V.K. et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death. A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 403–414.
7. Janczura M., Bochenek G., Nowobilski R. The Relationship of Metabolic Syndrome with Stress, Coronary Heart Disease and Pulmonary Function - An Occupational Cohort-Based Study. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0133750.
8. Moreira G.C., Cipullo J.P. Prevalence of Metabolic Syndrome: Association with Risk Factors and Cardiovascular Complications in an Urban Population. *PLoS One.* 2014; 9(9): e105056.
9. Fan J., Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.* 2003;10 (2): 63–71.
10. Reilly M.P., Wolfe M.L., Rhodes T. Measures of insulin resistance add incremental value to the clinical diagnosis of metabolic syndrome in association with coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2004; 110 (7): 803-809.
11. Веселовская Н.Г., Чумакова Г.А., Отт А.В., Гриценко О.В. Неинвазивный маркер инсулинорезистентности у пациентов с ожирением. *Российский кардиологический журнал.* 2013; 6(104): 28-32.
12. Veselovskaya N.G., Chumakova G.A., Ott A.V., Gritsenko O.V. Noninvasive marker of insulin resistance at patients with obesity. *Russian cardiological journal.* 2013; 6(104): 28-32.
13. Ba H.J. Associations between serum apelin-12 levels and obesity-related markers in Chinese children. *PLoS One.* 2014;9(1): e86577.
14. Castan-Laurell I., Vitkova M., Daviaud D. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(6): 905-910.
15. Harithy R. Serum Apelin-12 Concentration in Saudi Obese Middle-Aged Men. *Life Science Journal.* 2014; 11(10): 1113-1117.
16. Abeywardena M.Y., Leifert W.R., Warnes K.E. Cardiovascular biology of interleukin-6. *Current Pharmaceutical Design.* 2009; 15(15):1809–1821.
17. Schuett H., Luchtefeld M., Grothusen C. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis.* 2009; 102(2): 215–222.
18. Zakyntinos E., Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *J Cardiol* 2009; 53(3): 317-33.
19. Zhou Y., Wang Y., Qiao S. Apelin: a potential marker of coronary artery stenosis and atherosclerotic plaque stability in ACS patients. *Int Heart J.* 2014; 55(3): 204-212.
20. Momiyama Y. Associations between plasma C-reactive protein levels and the severities of coronary and aortic atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.* 2010; 17(5): 460–467.
21. Ouchi N., Kihara S., Funahashi T. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 2003; 107(5): 671–674.
22. Алекперов Э.З., Наджафов Р.Н. Современные концепции о роли воспаления при атеросклерозе. *Кардиология.* 2010; 50(6): 88-91.
23. Alekperov E.Z., Nadzharov R.N. Modern concepts about an inflammation role at an atherosclerosis. *Cardiology.* 2010; 50(6): 88-91.
24. Панюгова Е.В., Александрова Е.Н., Насонов Е.Л. Атеросклеротическое поражение сосудов у больных со стабильным течением ишемической болезни сердца: связь с С-реактивным

белком. Кардиология. 2009; 49(4):40-45.

Panugova E.V., Alexandrova E.N., Nasonov E.L. Atherosclerotic lesion of vessels at patients with the stable course of coronary heart disease:

communication with C-reactive protein. Cardiology. 2009; 49(4): 40-45.

Статья поступила 26.06.2017

Для корреспонденции:

Веселовская Надежда Григорьевна

Адрес: 656055, г. Барнаул, ул. Малахова, 46,

Тел. +7 (913) 020-70-70,

E-mail: nadezhda100@rambler.ru

For correspondence:

Veselovskaya Nadezhda

Address: 46, Malakhova st., Barnaul, 656055,

Russian Federation

Тел. +7 (913) 020-70-70,

E-mail: nadezhda100@rambler.ru

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО КОНТРАСТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

**Р. А.МУХАМАДИЯРОВ¹, В. В.СЕВОСТЬЯНОВА¹, Д. К.ШИШКОВА¹, М. В.НАСОНОВА¹,
С. Ф.ЗИНЧУК², Ю. А.КУДРЯВЦЕВА¹**

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

²*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Кемерово, Россия*

Цель исследования. Модификация метода сканирующей электронной микроскопии в обратно – рассеянных электронах для изучения биологических образцов, имеющих массивные металлические или минеральные включения.

Материалы и методы. В статье предложен альтернативный метод, не требующий приготовления срезов. Образцы для исследования (пластинки из никелида титана с окружающими тканями после субкутантной имплантации, эксплантированные стенты, эксплантированные эпоксиобработанные ксеноаортальные биопротезы клапанов сердца, эксплантированные биodeградируемые сосудистые графты из брюшной аорты крыс) заливали в эпоксидную смолу, полимеризовали, получали поверхностные шлифы блоков с образцами, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в обратно-рассеянных электронах.

Основные результаты. В результате предложенного нами метода образцы приобретали композиционный контраст и субклеточные структуры хорошо визуализировались при просмотре в сканирующем электронном микроскопе.

Заключение. Показана возможность исследовать микроструктурные особенности контактов между твердым материалом и биологическими тканями, анализировать клеточный состав на границе имплант – живая ткань. Кроме того, этот метод универсален и может быть использован для изучения различного материала, особые преимущества он имеет при исследовании образцов с объемными металлическими и минеральными включениями. Еще одним достоинством метода является возможность исследования образцов, имеющих большую площадь поверхности, что невозможно при использовании метода трансмиссионной электронной микроскопии.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия, композиционный контраст, микроструктура поверхности.

COMPOSITE CONTRAST USING TO RESEARCH BIOLOGICAL OBJECTS BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

**P. A.MUKHAMADIAROV¹, V. V.SEVOSTIANOVA¹, D. K.SHISHKOVA¹,
M. V. NASONOVA¹, S. F.ZINCHUK², U. A.KUDRYAVCEVA¹**

¹*Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia.*

²*Federal State Budgetary Educational Institution of higher professional education Kemerovo state medical university, Kemerovo, Russia*

The purpose. Modification of scanning electron microscopy method in backscattered electrons to research biological samples with massive metal or mineral inclusions.

Materials and methods. In the article the alternative method without cutting sections were supplied. Samples for researching (plates from NiTi surrounded by tissues after subcutal implantation, explanted stents, explanted epoxy covered xenoaortic bioprosthetic heart valves, explanted biodegradable vascular grafts from rats abdominal aorta) were embedded in epoxy resin, polymerized, made surface slices from blocks with samples, contrasted by uranyl acetate and lead citrate and researched in backscattered electrons.

Results. By using the proposed method samples acquired composite contrast and subcellular structures had good visualization in scanning electron microscopy.

Conclusion. Our research showed availability this method to research microstructural characteristics of contacts between hard material and biological tissues and to analyze cellular structure on implant- tissue border. Besides, this method is universal for researching different biological samples, and it has special advantages for research materials with volumetric metal and mineral inclusions. Another advantage of this method is ability to research samples with large square of surface, what can't be made by using transmission electron microscopy method.

Keywords. Scanning electron microscopy, composite contrast, microstructure of surface.

Введение

Одним из направлений современной медицины является создание искусственных имплантатов и тканеинженерных конструкций для замещения повреждённых или утраченных тканей и органов, а также восстановления их функций [1, 2]. Важным вопросом в разработке протезов является изучение особенностей взаимодействия клеток организма с неорганическим материалом и тканевой реакции на имплантат. В свою очередь, взаимодействие материала протеза с тканями реципиента обуславливает его дальнейшую функциональность. Этот процесс проявляется, главным образом, на клеточном уровне. Поэтому инструментальная оценка реакции клеток на имплантированный материал имеет большое значение. Для этих целей широко применяют методы световой и электронной микроскопии. Вместе с тем, при использовании традиционных методов исследования встречаются проблемы, затрудняющие пробоподготовку изучаемого материала. Это может быть связано с наличием в составе имплантатов твердых материалов, препятствующих получению срезов. В частности, в их составе могут присутствовать металлические сплавы и керамика. При наличии в составе имплантируемых конструкции металлических элементов, имеющих малое поперечное сечение, возможным решением проблемы может быть заключение изучаемого материала в метакрилатные или эпоксидные смолы с последующей резкой ножом с высокой твердостью [3]. В случае более массивных включений вариантом решения может быть использование метода *sawing and grinding* (пилка с последующей шлифовкой). Способ основан на отпиливании тонкого среза образца, заключенного в смолу, прецизионной дисковой пилой с последующей шлифовкой и полировкой до необходимой толщины [4]. Однако при этом способе не всегда удается сохранить материал имплантата в составе среза, так как при малой толщине среза образец утрачивается в процессе полировки из-за разности механических свойств

материала графта и смолы.

Ранее нами был разработан способ получения гистологических образцов, заключённых в эпоксидные смолы, методом шлифовки-полировки без приготовления срезов [5]. Метод позволяет визуализировать биологические объекты с твердыми металлическими или минеральными включениями. Недостатком метода является то, что при наличии в материале образцов сложной формы лежащий под поверхностью материал при нижнем освещении через конденсор микроскопа дает тень, что часто не позволяет получить удовлетворительный уровень освещенности препарата.

Возможным решением этой проблемы может стать применение сканирующей электронной микроскопии в обратном – рассеянных электронах (SEM BSE) вместо световой микроскопии. При этом методе исследования пучок электронов падает на объект сверху, что исключает затенение образца. В результате получается изображение клеток, визуальное сходное с таковым при трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

Цель работы

Продемонстрировать возможности применения метода композиционного контраста в модификации авторов для исследования структуры биологических объектов.

Материал и методы исследования

Образцы для исследования

Удаленные стенты с окружающими тканями.

Исследованы эксплантированные стенты фирм Pro-Kinetic, Omnilink, Racer, которые применяли при коррекции выводного отдела правого желудочка у 7 пациентов. Средний срок нахождения стента в организме составил 3 месяца (от 1 до 7 месяцев).

Пластины из никелида титана.

Для изучения реакции тканей на никелид титан, как потенциальный материал для изготовления протезов и их деталей, осуществляли

имплантацию пластинок из данного металла подкожно крысам линии Wistar (массой 70-80 г). Операцию проводили под ингаляционным наркозом 2% изофлюрана в асептических условиях. Пластины из никелида титана размером 10 мм х 10 мм х 1 мм стерилизовали этиленоксидом и имплантировали в подкожные «карманы» на спине животного справа и слева вдоль позвоночника. Образцы (16 шт.) извлекали через один и три месяца.

Створки биопротезов клапанов сердца.

Исследованы эпоксиобработанные ксено-аортальные биопротезы клапанов сердца («Кем-Кор» и «Перикор», ЗАО «Неокор» г. Кемерово) в количестве 12 шт., эксплантированные из митральной позиции у восьми пациентов по причине развития кальциевой дегенерации. Средний срок функционирования биопротезов составил $8,75 \pm 2,8$ года (от 6 до 12 лет). Для исследований эксплантированные ксеногенные клапаны целиком помещали в 4% забуференный параформальдегид, затем вырезали из них образцы для исследований.

Аутопсийный материал брали только при наличии договора информированного согласия на забор биоматериала.

Биодеградируемые сосудистые графты.

Изготовление биодеградируемых сосудистых графтов, а также их имплантацию в брюшную аорту крыс проводили согласно модели, описанной Севостьяновой В.В. (Sevostyanova et al, 2015). Сосудистые графты с внутренним диаметром 2 мм изготавливали методом электроспиннинга из биодеградируемого полимера поликапролактона (polycaprolactone, PCL, M=80.000) (Sigma-Aldrich, США).

PCL графты имплантировали в брюшную часть аорты крыс линии Wistar под ингаляционным наркозом 2% изофлюрана. Через 10 месяцев после имплантации графты выделяли вместе с прилежащими участками аорты. Всего изучено 8 образцов.

Нативные органы крыс популяции Wistar.

Сердца и печень крыс (5 шт.) извлекали после эвтаназии животных в атмосфере углекислого газа. Образцы сразу же переносили в 4% раствор параформальдегида охлажденный до 6 °С.

Всех животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующем нормативам ГОСТа. Исследование проводили, соблюдая

принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986).

Пробоподготовка материала

Фиксация образцов

После эксплантации все образцы помещали в 4%-й раствор параформальдегида, приготовленный на 0,1 М натрий-фосфатном буфере и охлажденный до 6 °С. Через 1 час после предварительной фиксации образцы разрезали на фрагменты, которые переносили в свежую порцию фиксатора и оставляли на 24 часа при 6 °С.

Часть образцов, содержащих никелид титан, после фиксации раствором параформальдегида дополнительно фиксировали 2% водным раствором тетраокиси осмия в течение 12 часов.

Обезвоживание образцов.

Перед обезвоживанием все образцы промывали в двух сменах 0,1 М фосфатного буфера по 15 мин. в каждом. Далее осуществляли их обезвоживание, последовательно помещая в растворы этилового спирта возрастающей концентрации.

1. 30% этиловый спирт – 2 раза по 30 минут
2. 50% этиловый спирт – 2 раза по 30 минут
3. 70% этиловый спирт – 2 раза по 40 минут
4. 80% этиловый спирт – 2 раза по 60 минут
5. 95% этиловый спирт – 60 минут
6. 95% этиловый спирт – 120 минут
7. 100% этиловый спирт – 60 минут
8. 100% этиловый спирт – 60 минут

Заклучение образцов в эпоксидные смолы.

Заклучение образцов в эпоксидные смолы позволяет решить проблему различной плотности материала протеза и биологических тканей при шлифовке и полировке.

Обезвоженные образцы помещали в ацетон – 2 раза по 60 минут. Затем образцы выдерживали в смеси ацетона и смолы в соотношении 1:1 в течение 12 часов, после чего погружали в заливочную смолу и выдерживали в системе вакуумной импрегнации CitoVac (Struers, Дания) 12 часов. Пропитанные смолой образцы помещали в специальные формы (Fixi-Form, Struers) диаметром 25 мм для шлифовально-полировального станка TegraPol-11 (Struers, Дания), заливали свежей порцией смолы и оставляли в термостате при 37 °С. Через 12 часов проводили полимеризацию смолы в термостате при температуре 60 °С в течение 24 час.

Образцы, заключенные в смолу, показаны на рис. 1.

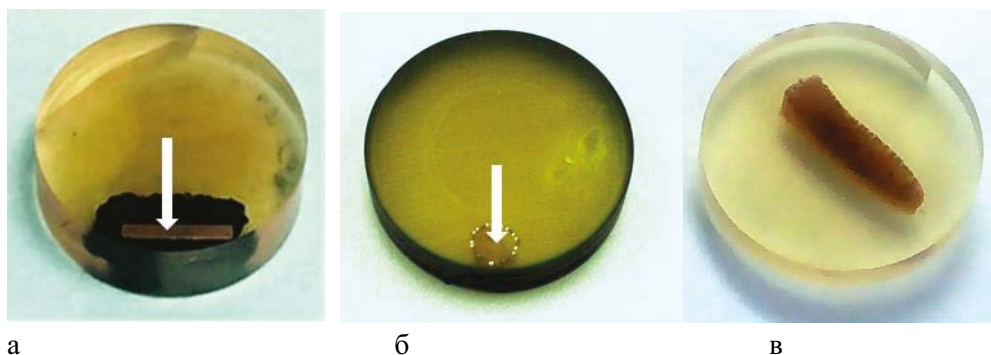


Рисунок 1. Образцы, заключенные в эпоксидную смолу, подготовленные для исследования методом SEM BSE: а – пластина из никелида титана (показана стрелкой) вместе с окружающими тканями после подкожной имплантации (фиксация параформальдегид-тетраокись осмия), б – сосудистый стент с тканями после эксплантации, стрелкой показан просвет сосуда, образованный стентом (фиксация в параформальдегиде), в – фрагмент печени крысы (фиксация в параформальдегиде)

Шлифовка и полировка образцов

Полученные образцы шлифовали до участка, исследование которого было необходимо произвести, и полировали поверхность с использованием шлифовально-полировального станка TegraPol-11 (Struers, Дания). Шлифовку осуществляли, используя абразивные диски MDRondo (Struers) с различным размером абразивных зерен в следующем порядке: 800, 1000 и 1200 грита. Для полировки последовательно использовали диски, покрытые сукном (Struers), с различной упругостью в комбинации с суспензиями, содержащими монокристаллические алмазы (DP-SprayM, Struers) в следующей последовательности:

- 1). MDMol с 9 мкм алмазной суспензией – 20 мин.;
- 2). MDPan с 6 мкм алмазной суспензией – 20 мин.;
- 3). MDDur 3 мкм алмазной суспензией – 20 мин.;
- 4). MDNup без алмазной суспензии – 20 мин.

На рис. 1 показан стент после заключения в эпон-аралдит после шлифовки.

Так как биологические ткани после пропитки смолой становятся прозрачными и трудно различимы в блоке, для контроля глубины шлифовки использовали бинокулярный микроскоп Olimpus SZ2-ILST, Japan.

Далее шлифовали обратную сторону блоков таким образом, чтобы их плоские поверхности были параллельны. Шлифовку обратной сто-

роны выполняли до образца, а также удаляли его неинформативные участки, чтобы добиться минимальной толщины блоков. Для защиты поверхности, противоположной шлифуемой, от царапин и вмятин ее закрывали резиновой или матерчатой накладкой.

Контрастирование образцов.

Перед исследованием в электронном микроскопе все образцы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата и цитрата свинца по Рейнольдсу.

Для контрастирования уранилацетатом каждый образец помещали в чашку Петри, на дне которой размещали смоченный водой бумажный фильтр. На поверхность образца наносили раствор уранилацетата и помещали в термостат при температуре 60°C на 60 мин. Затем образец промывали под струей дистиллированной воды, протирали мягкой тканью и высушивали на воздухе.

Для контрастирования цитратом свинца образцы также помещали в чашку Петри, на дне которой находилось несколько гранул гидроксида натрия для поглощения углекислого газа. На поверхность образца капали несколько капель цитрата свинца. Чашку Петри накрывали крышкой и оставляли на 10 мин. при комнатной температуре. После контрастирования образец отмывали в струе свежеприготовленной бидистиллированной воды.

Сканирующая электронная микроскопия

Для изучения методом SEM BSE все подготовленные образцы напыляли углеродом с использованием установки для вакуумного напыления

SC 7640 (Quorum Technologies, UK). Препараты исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа S 3400 N (Hitachi, Япония) в режиме регистрации обратно-рассеянных электронов.

Трансмиссионная электронная микроскопия.

Для исследований использовали те же сердца крыс, что для исследований методом SEM BSE. Выделенный фрагмент разрезали на кусочки объемом 1 мм³ и фиксировали в 3% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере в течение 1,5 ч при температуре 4°C с постфиксацией в 1% растворе O_sO₄ на том же буфере в течение 1 ч. 10 мин. при 25°C. После обезвоживания в восходящих концентрациях этанола пробы переносили в 100 % ацетон. Для заливки использовали эпоксидную смесь Аралдит (Fluka). Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-Nova (Швеция), далее их контрастировали раствором уранилацетата и цитратом свинца (по Рейнольдсу). Просмотр осуществляли в электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss) при ускоряющем напряжении 80 Кв в Центре коллективного пользования приборами и оборудованием «Высокие технологии и аналитика наносистем» НГУ.

Результаты

Образцы со стентами после эксплантации. На образце, представленном на рис. 3, материал стента окружен по периметру плотной соединительной тканью.

При исследовании методом световой микроскопии (рис. 2а) балки стента создавали препятствие лучу света от конденсора микроскопа, создавая затенение на изображении объекта. При исследовании методом композиционного контраста хорошо выявлялась внутренняя структура изучаемого образца (рис. 2б). Между тканью и балками стента наблюдали пространство, заполненное везикулярными структурами (рис. 2в). Пространство вокруг капсул заполнено рыхлой соединительной тканью, содержащей многочисленные сосуды различного диаметра. Фибробласты рыхлой соединительной ткани имели типичное строение с характерным внутриядерным распределением хроматина (рис. 2г). Кариолемма у этих клеток не визуализировалась. Коллагеновые волокна в рыхлой соединительной ткани располагались разнонаправленно.

В структуре капилляров (рис. 2д) наблюдали слой эндотелиальных клеток, имеющих многочисленные выросты внутрь сосуда. Эндотелий был отделен сплошной внутренней эластической мембраной, за которой располагались клетки интимы. К эластической мембране прилегал плотный слой ткани из клеток, морфологически сходными с фиброцитами. Над плотной соединительной тканью присутствовала рыхлая соединительная ткань, содержащая собственные сосуды, идущие параллельно эндотелиальному слою.

В просвете сосуда была видна его трехмерная структура. Вероятно, 3D – эффект обусловлен тем, что на данном снимке в просвете сосуда отсутствовали клеточные элементы, связывающие в процессе контрастирования тяжелые металлы. Благодаря этому электроны, участвующие в формировании изображения, проникали на большую глубину и отражались от клеток, лежащих глубже от поверхности образца.

Со стороны кровеносного русла, образованного стентом, была видна эндотелиальная выстилка (рис. 2е). На разных участках эндотелий имел отличия в строении по количеству слоев клеток, их форме и структуре ядер. Непосредственно к эндотелиальному слою примыкал плотный слой ткани из клеток, морфологически сходных с фиброцитами. Над плотной соединительной тканью наблюдали рыхлую соединительную ткань, содержащую собственные сосуды, идущие параллельно эндотелиальному слою.

Образцы с пластинками никелида титана. Изображения, полученные данным методом, были визуальными сходными с изображениями, полученными методами трансмиссионной электронной микроскопии, но имели относительно них негативный контраст. При инверсии цветов сходство между имиджами при TEM и SEM BSE значительно возрастало. Для удобства восприятия на рисунке 3 параллельно представлены имиджи в негативном и позитивном контрастах.

При увеличении x100 (рис. 3а, б) были хорошо различимы сама пластина, слой клеток, прилегающий к пластине, слой фиброзной ткани, содержащий многочисленные мелкие кровеносные сосуды и фиброзно-жировая ткань. При повышении увеличения возрастала детализация структуры объекта. При увеличении x2700 (рис. 3в, г) становился различимым монослой клеток, прилегающий непосредственно к боковой поверхности пластины. Это слой клеток был отде-

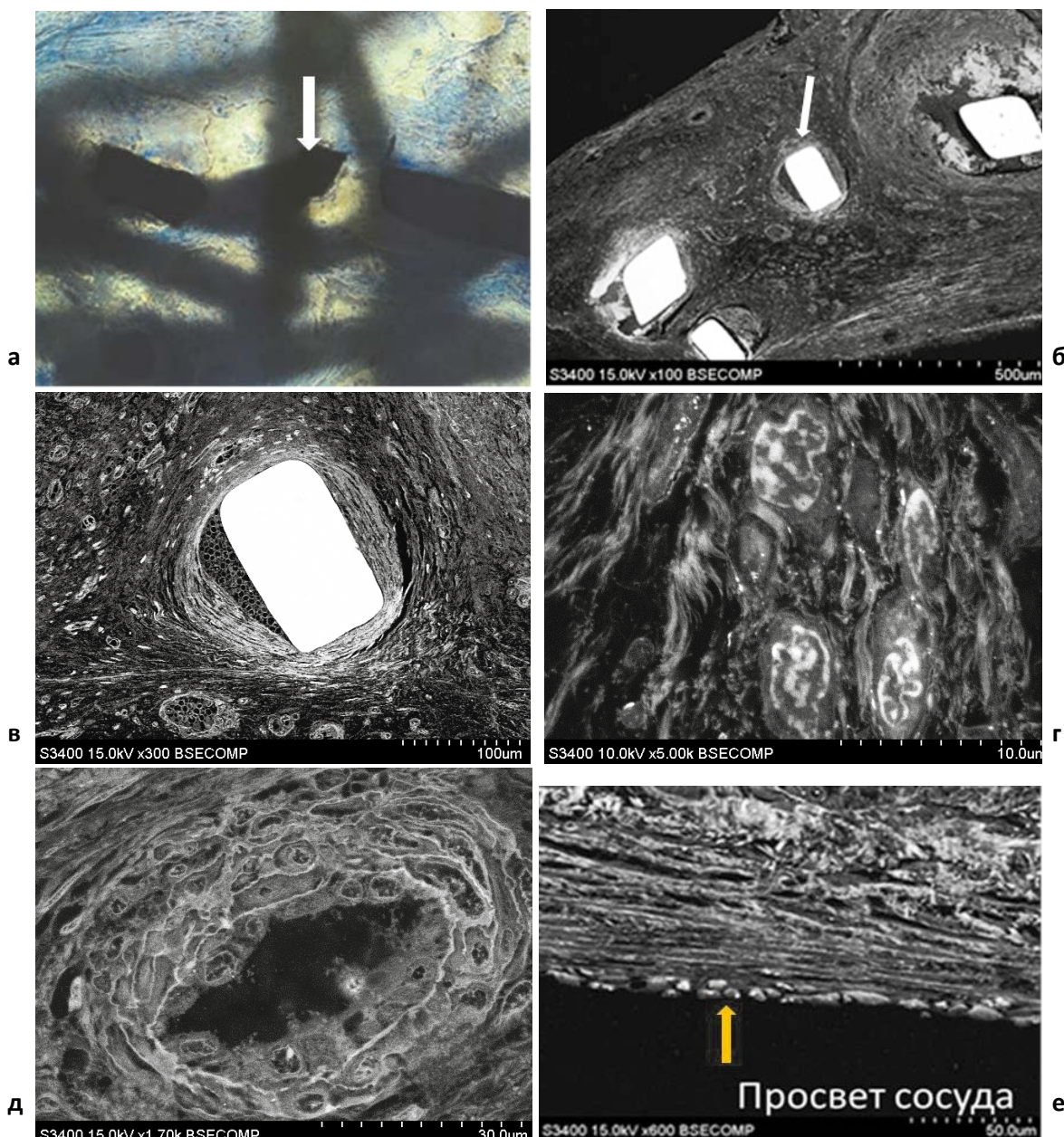


Рисунок 2. Стент из никелида титана после эксплантации: а – световая микроскопия общий вид (ув.: 100), б – SEM BSE общий вид, в – отдельная балка стента (SEM BSE), г – фибробласты (SEM BSE), д – капилляр (SEM BSE), е – эндотелий на границе с кровеносным руслом, сформированном при участии стента (SEM BSE). Белые стрелки – балки стента, желтая стрелка – эндотелий

лен от располагающихся дальше тканей тонким слоем уплотненных клеток, морфологически схожих с фиброцитами. Были хорошо видны ядра и цитоплазма клеток, везикулярные частицы между поверхностью никелида титана и клетками. В некоторых участках между металлом и тканями встречались отдельные свободные моноцитарные клетки.

Эксплантированные образцы кальцифицированных створок биопротезов. На рис. 4а представ-

лен участок биопротеза, содержащий крупный кальциевый депозит, имеющий плотные контакты с окружающими тканями. Внутренняя часть депозита была неоднородной и содержала включения из остатков биологического материала. С наружной стороны заметно отслоение поверхностного слоя створки биопротеза. Между этим слоем и внутренним слоем створки присутствовали многочисленные клетки, имеющие морфологическое сходство с моноцитами (рис 4б).

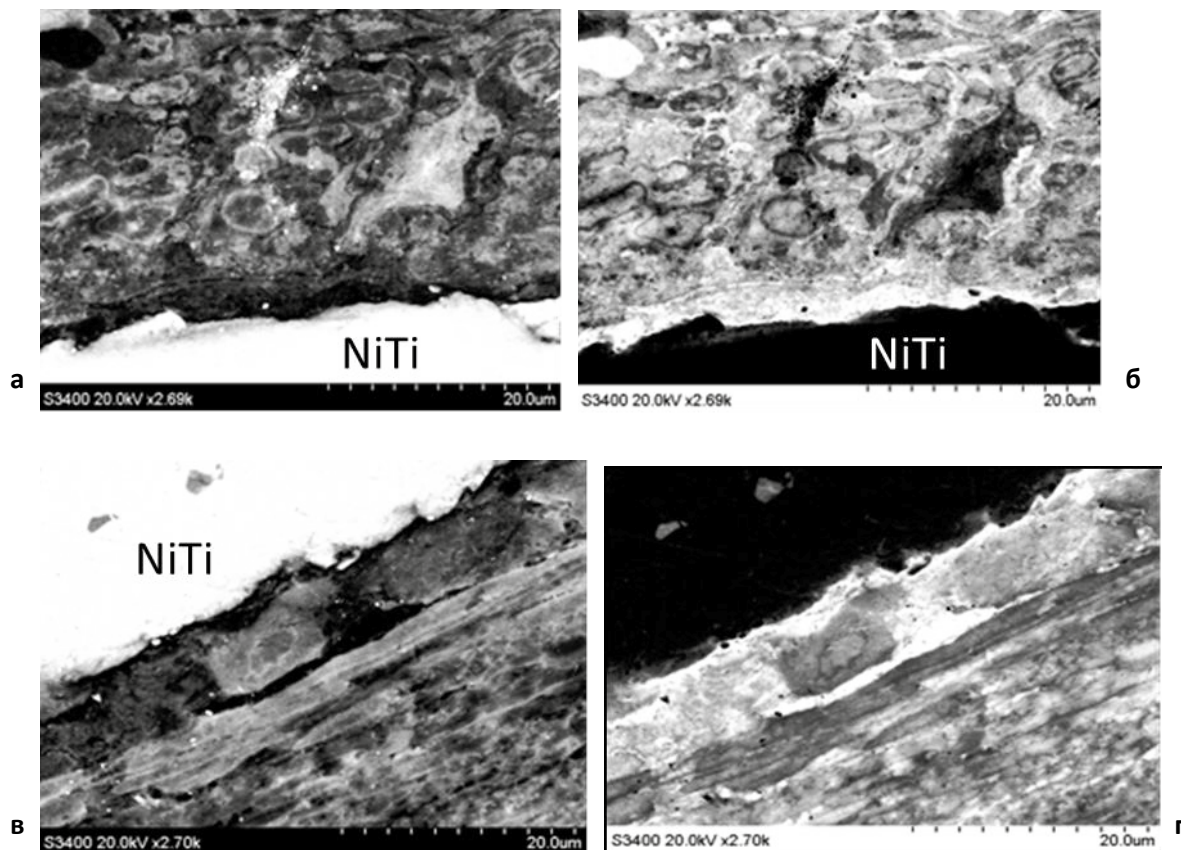


Рисунок 3. Пластины из никелида титана (NiTi) после 1 мес. подкожной имплантации. Слева исходные снимки, справа инвертированное изображение

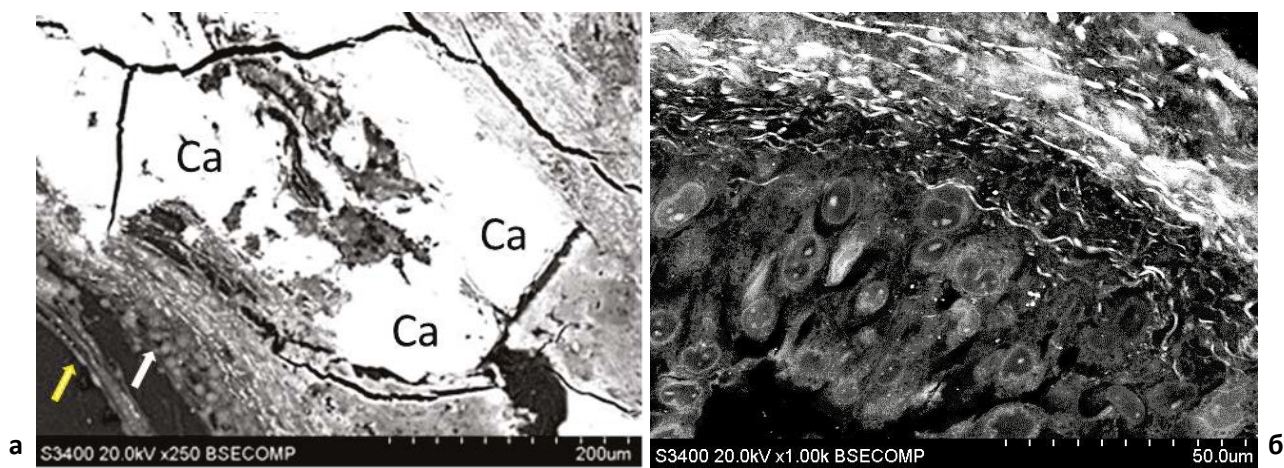


Рисунок 4. Кальцифицированная створка биопротеза: а – кальциевый депозит в структуре створки, б – клетки на поверхности створки, желтая стрелка. Желтая стрелка – эндотелий, белая стрелка – моноциты в месте расслоения створки биопротеза

Образцы, содержащие сосудистые графты малого диаметра из биодеградируемого полимера. В образцах графтов, стенка которых была сформирована из неориентированных волокон полимера, пространство между нитями было заполнено клеточным и неклеточным материалом,

образующим плотную структуру (рис. 5). Из-за того, что полимер при проводке растворяется в органических растворителях, на рисунке видны только пустые полости, ранее содержавшие волокна. Клетки имели различную форму и были морфологически схожи с фибробластами.

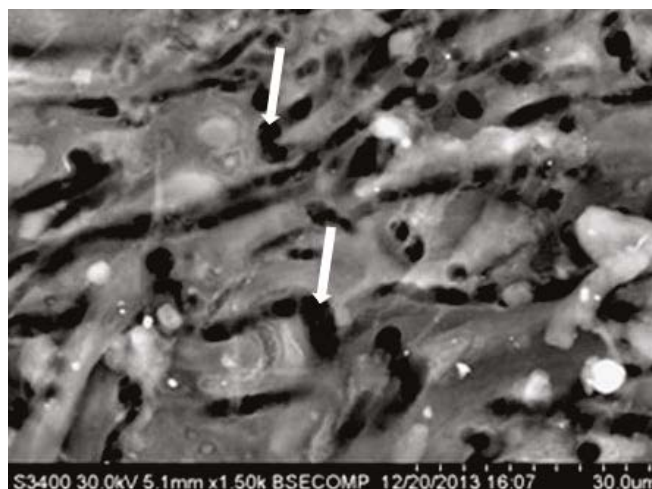


Рисунок 5. Сосудистый протез, сформированный из нитей полимера. Белые стрелки – остатки полимерных нитей

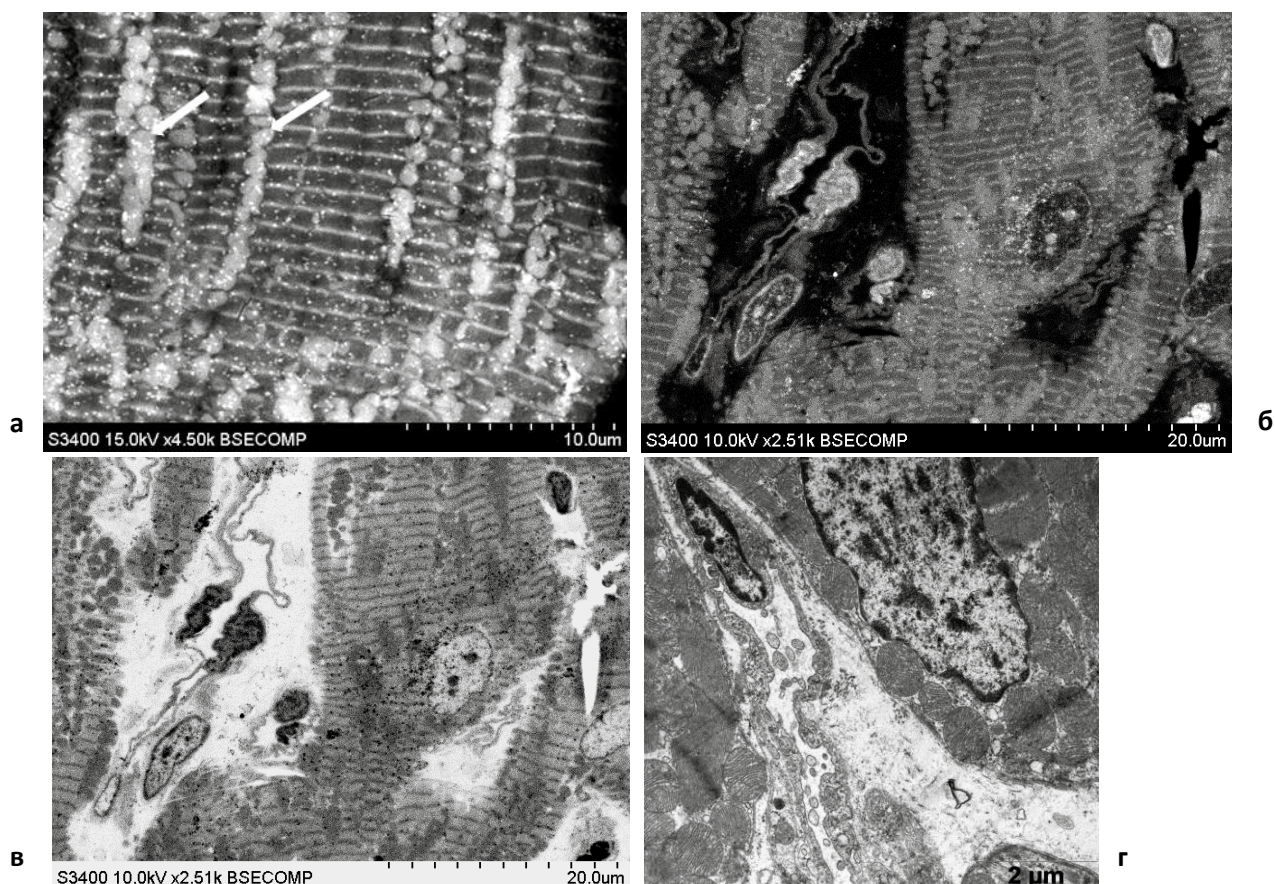


Рисунок 6. Визуализация структуры миокарда крысы, полученная методом SEM BSE (а-с) и TEM (д): а – поперечная исчерченность мышечных волокон; (стрелками указаны митохондрии) б – капилляры и кардиомиоциты; в – негативный вариант от бб; д – ультраструктура миокарда, полученная методом TEM

Миокард крысы.

На рисунке 6б показаны электронограммы препаратов миокарда крысы. При использовании метода SEM BSE наблюдали хорошую визуализацию поперечной испещренности мышечных волокон, между которыми находились митохондрии (рис.6). Митохондрии имели округлую форму, внутреннее мембранное строение митохондрий не визуализировалось. Ядра клеток эндотелия и кардиомиоцитов имели типичное строение (рис. 6б). На рис. 6а видна отечность перикапиллярного пространства, вызванная 30-минутной нормотер-

мической тотальной ишемией.

Для оценки эффективности визуализации образцов методом SEM BSE было выполнено сравнение изображений, полученных методами SEM BSE и TEM. Результаты TEM использовали в качестве стандарта. Так как эти методы дают изображения, являющиеся негативными относительно друг друга, для рис. 6б выполнили процедуру обращения цветов. На рисунке 6г показано изображение, полученное методом TEM с участка гистологически сходного с таковым на рис. 6б.

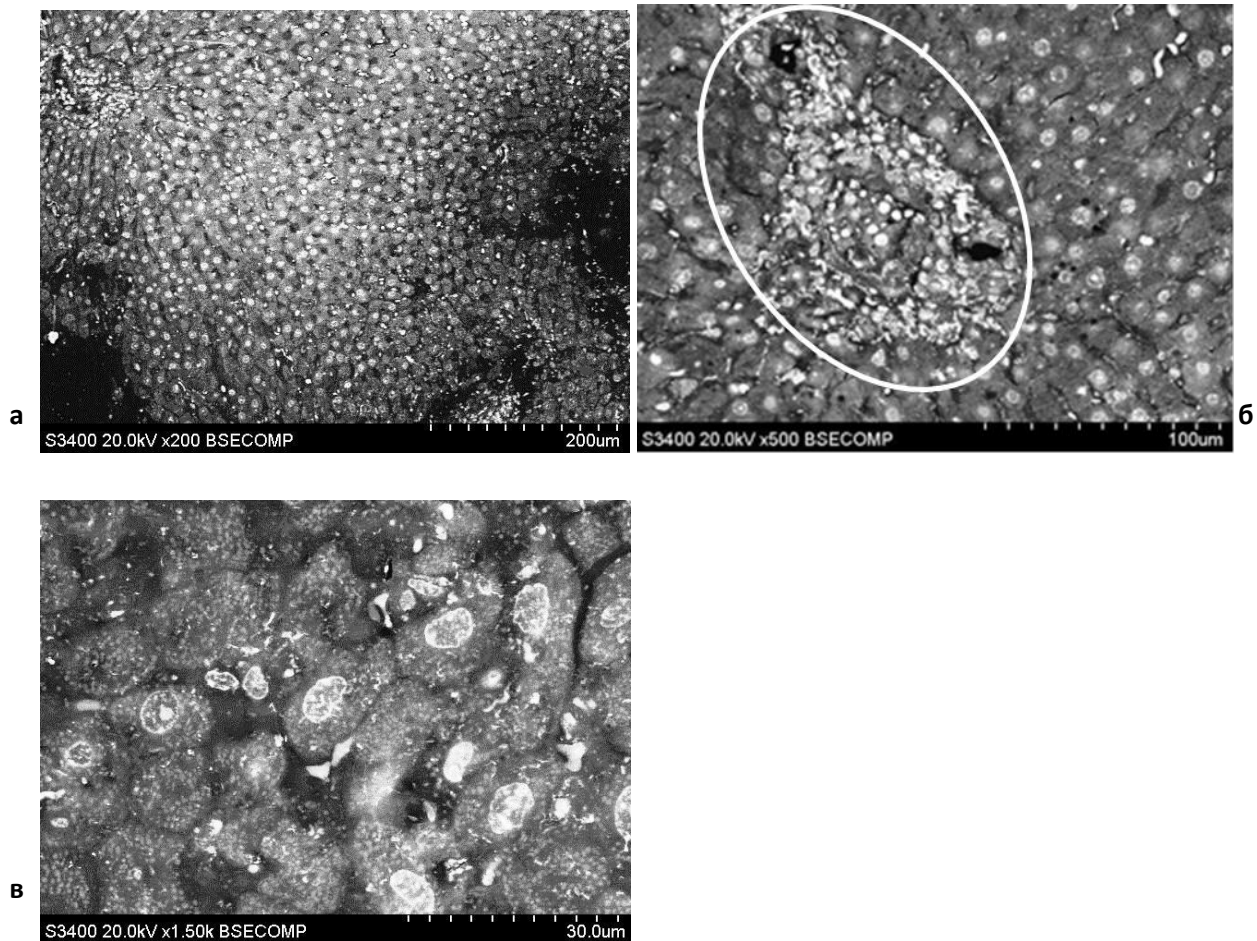


Рисунок 7. Визуализация строения печени крысы: а – печеночные балки, б – портальная триада (выделена белым овалом), в – гепатоциты и другие клетки печени

Печень крыс. С использованием данного метода хорошо визуализировалось строение печени крыс (рис. 7). При увеличении x200 были видны печеночные долилки и балки, центральные вены и другие структурные элементы. При увеличении x500 (рис. 7б) была видна детальная структура печени, особенности строения портальной триады, печеночные балки, печеночные синусы, особенности строения ядер. При повышении

увеличения до x1500 (рис. 7в) становилась видимой ультраструктура клеток, в частности ядра и митохондрии. Хорошо визуализировались структурные различия между клетками.

Обсуждение

Использование SEM BSE для исследования гистологического строения различных биологи-

ческих объектов сравнительно новое и развивающееся направление в морфологии. Различные авторы использовали этот метод для исследования различных объектов: клеточного и субклеточного строения влажных образцов [6, 7], тканей вблизи костных имплантов [8], полутонких срезов [9], монослоя клеток [10].

Результаты нашего исследования подтвердили, что SEM BSE в представленной модификации позволяет получить изображения высокого качества с различных объектов. В отличие от метода световой микроскопии, объекты, лежащие ниже поверхности образца, не создавали препятствий для исследований. Отсутствие необходимости приготовления срезов значительно упрощает процедуру пробоподготовки материала. Метод имеет преимущества в случае необходимости изучения образцов, имеющих в своем составе массивные металлические или минеральные включения. Заключение образца в твердые смолы с последующей шлифовкой-полировкой позволяет использовать стандартные методы контрастирования материала, принятые для TEM биологических объектов.

Вместе с тем, разрешение метода значительно ниже, чем при обычном TEM. Конечный результат зависит от сочетания ряда факторов. В их числе: качество пропитки объекта эпоксидной смолой, протокол контрастирования объекта, режимы работы микроскопа (ускоряющее напряжение и ток пучка) и особенности структуры самого объекта исследования. Причина в том, что при SEM BSE, результат зависит от глубины проникновения пучка электронов до их отражения. При большой глубине можно получить информацию о внутренней структуре объекта, но при этом снижается разрешение (качество изображения). Теоретически, чем меньше глубина проникновения пучка, тем выше качество. На этот параметр можно влиять путем разработки протокола контрастирования объекта, обеспечивающего большую концентрацию элементов с высокой молекулярной массой в поверхностном слое объекта. Большое значение имеет также выбор оптимального режима для электронного пучка микроскопа. Качество изображения зависит как от ускоряющего напряжения, так и от тока пучка. Нам не удалось подобрать универсальный режим, пригодный для всех объектов, поэтому для каждого образца его приходилось подбирать индивидуально. При варьировании условий про-

смотра возможно подобрать режимы, которые позволят получить удовлетворительную визуализацию не только поверхности, но и трёхмерной структуры поверхностного слоя объекта.

Рассматриваемый метод универсален и может быть использован для изучения различного материала. Особые преимущества он имеет при исследовании образцов с объемными металлическими и минеральными включениями, позволяет исследовать структурные особенности контактов между твердым материалом и биологическими тканями. Еще одним достоинством метода является возможность исследования образцов, имеющих большую площадь поверхности, что невозможно при использовании методом TEM. В частности, мы успешно применили его при площади поверхности превышающей 1 см².

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Сейфалиан А.М., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Сергеева Е.А. и др. Сравнительное тестирование *in vitro* биodeградируемых сосудистых имплантов для оценки перспективы использования в тканевой инженерии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015; 4: 34-41.
2. Michaelis S., Robelek R., Wegener J. Studying cell-surface interactions *in vitro*: a survey of experimental approaches and techniques. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 2012; 126: 33-66.
3. Attizzani, G.F., Bezerra, H.G., Chamié, D., Fujino, Y., Spognardi, A.M., Stanley et al. Serial evaluation of vascular response after implantation of a new sirolimus-eluting stent with bioabsorbable polymer (mistent): an optical coherence tomography and histopathological study. *J. Invasive Cardiol.* 2012; 24(11): 560-568.
4. Malik M., Gunn J., Holt C.M., Shepherd L., Francis S.E., Newman C.M.H et al. Intravascular stents: a new technique for tissue processing for histology, immunohistochemistry, and transmission electron microscopy. *Heart.* 1998; 80: 509-516.
5. Mukhamadiyarov R.A., Sevostyanova V.V., Shishkova D.K., Nokhrin A.V., Sidorova O.D., Kutikhin A.G. Grinding and polishing instead of sectioning for the tissue samples with a graft: Implications for light and electron microscopy. *Micron.* 2016; 85: 1-7. doi: 10.1016/j.micron.2016.03.005

6. Kamari Y., Cohen H., Shaish A., Bitzur R., Afek A., Shen S. et al. Characterisation of atherosclerotic lesions with scanning electron microscopy (SEM) of wet tissue. Diabetes and vascular disease research. 2008; 1: 44-47.

7. Thiberge S., Nechushtan A., Sprinzak D., Gileadi O., Behar V., Zik O. et al. Scanning electron microscopy of cells and tissues under fully hydrated conditions. PNAS . 2004; 101 (10): .3346–3351

8. Wierzchosa J., Falcionib T., Kiciakc A., Wolińskid J., Koczorowskie R., Chomickif P. et al. Advances in the ultrastructural study of the implant–bone interface by backscattered electron imaging. Micron. 2008; 39 (8): 1363–1370. doi:

10.1016/j.micron.2008.01.022.

9. Koga D., Kusumi S., Shodo R., Dan Y., Ushiki T.. High-resolution imaging by scanning electron microscopy of semithin sections in correlation with light microscopy. Microscopy. 2015; 64 (6): 387-394. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfv042>

10. Fernández-Segura E., Cañizares F. J., Cubero M. A., Revelles F., Campos A. Backscattered electron imaging of cultured cells: application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope. Journal of microscopy. 1997;188 (1): 72–78.

Статья поступила 27.10.2016

Для корреспонденции:

Мухамадияров Ринат Авхадиевич

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7 (3842) 64-45-56,

E-mail: rem57@rambler.ru

For correspondence:

Muhamadiarov Rinat

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,

650002, Russian Federation

Тел. +7 (3842) 64-45-56,

E-mail: rem57@rambler.ru

ФАКТОРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОЗДНИМ ОБРАЩЕНИЕМ ЗА МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩЬЮ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Д. Д. КОСЯГИНА², П. Н. ЗАВЫРЫЛИНА³, Д. Ю. СЕДЫХ¹, И. С. БЫКОВА¹,
В. В. КАШТАЛАП¹

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

² The Meadows School, Las Vegas, Nevada, USA

³ Муниципальное образовательное учреждение «Городской классический лицей Центра непрерывного образования Кемеровского государственного университета», Кемерово, Россия

Цель исследования. Оценка факторов, связанных с поздним обращением пациентов за медицинской помощью при инфаркте миокарда.

Материалы и методы. В оригинальном одноцентровом исследовании на основании анкетирования 51 пациента с инфарктом миокарда оценены различия временных характеристик обращения за медицинской помощью при развитии заболевания, а также факторы, вероятно связанные с поздним вызовом неотложной помощи.

Результаты. Выяснено, что большинство пациентов (>70%) с инфарктом миокарда, поступившие в Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер, обращаются за медицинской помощью до 6 часов от начала заболевания. Однако сохраняется группа пациентов, которые «затягивают» время до обращения за помощью, что может значимо влиять на эффективность лечения острого коронарного синдрома. Эти пациенты чаще мужского пола, более молодого возраста, с высшим образованием, работающие в городе.

Выводы. среди молодых работающих пациентов мужского пола, проживающих в крупных промышленных центрах, необходимо проводить больший объем разъяснительных информационных мероприятий, направленных на повышение знаний о значимости раннего обращения за медицинской помощью при появлении признаков инфаркта миокарда.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, время до обращения, факторы, связанные с задержкой обращения

Введение

В настоящее время известно, что максимальная эффективность лечения инфаркта миокарда (ИМ) обеспечивается проведением коронарной реваскуляризации в ранние сроки от начала заболевания. При этом основополагающим фактором успеха любой реперфузии (медикаментозной и эндоваскулярной) является максимальное уменьшение времени ожидания от начала заболевания до обращения пациента за медицинской помощью. Все клинические рекомендации исходят из того, что необходимо проводить широкие социальные информационные кампании, направленные на повышение информированности о симптомах начала ИМ и о необходимом алгоритме действий при этом всего населения и отдельных его групп, уязвимых в отношении получения своевременной медицинской помощи.

Цель исследования

Оценка факторов, связанных с поздним обращением пациентов за медицинской помощью при инфаркте миокарда.

Материал и методы

В одноцентровом одномоментном наблюдательном нерандомизированном исследовании проведено анкетирование 51 пациента с подтвержденным диагнозом ИМ (согласно рекомендациям Российского кардиологического общества от 2013 и 2015 гг.), которые были госпитализированы в ГБУЗ КО «Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер имени академика Л.С. Барбараша»; из них 34 (66,7%) пациента мужского пола. Средний возраст пациентов составил $63,7 \pm 9,8$ лет, из них 20 (39,2%) пациентов были в возрасте до 60 лет, 19 (37,3%) в возрасте от 61 до 70 лет, 12 (23,5%) - от 71 года и старше.

Всем пациентам при поступлении или в течение госпитального этапа была проведена коронарография и чрескожное коронарное вмешательство на инфаркт-ответственной коронарной артерии.

После получения информированного добровольного согласия всем пациентам на 5 сутки поступления в стационар было предложено заполнить оригинальную авторскую анкету, кото-

рая предполагала оценку семейного и социального статуса пациента, место его жительства, способа поступления в стационар, кроме того, анализу подверглись также показатели как факт наличия ранее перенесенных сердечно-сосудистых заболеваний и перечень принимаемых медикаментозных препаратов. Особое внимание было уделено характеристикам ведущего синдрома (чаще всего ишемического болевого в грудной клетке), являющегося поводом для индексной госпитализации, а также действиям пациента, в том числе по самостоятельному приему лекарственных препаратов, оценке времени обращения за медицинской помощью, а также (при наличии) причин позднего обращения за ней.

Результаты

Выяснено, что у большинства пациентов с ИМ ($n=43$, 84,3%) основным клиническим проявлением заболевания, послужившим поводом

для обращения за медицинской помощью был ангинозный болевой синдром в грудной клетке. Остальные пациенты указали на другие причины обращения за медицинской помощью, такие как одышка, слабость и головокружение. При этом 40 (78,4%) пациентов поступили в стационар по каналу скорой медицинской помощи. Остальные – из поликлиники с приема терапевта [8 (15,7%)] и по самообращению [3 (5,9%)].

На основании анализа анкет пациентов было выяснено, что большинство ($n=36$, 70,7%) пациентов обратилось за медицинской помощью в период от 30 минут до 6 часов от начала заболевания. Лишь 9 (17,6 %) пациентов обратились за помощью в период от 6 до 12 часов, еще 4 (7,8%) больных – в период до суток от начала развития симптомов заболевания, и 2 (3,9%) – более чем через 24 часа. Таким образом более 70% пациентов своевременно (в период до 6 часов от начала заболевания) обратились за медицинской помощью (рис.1).

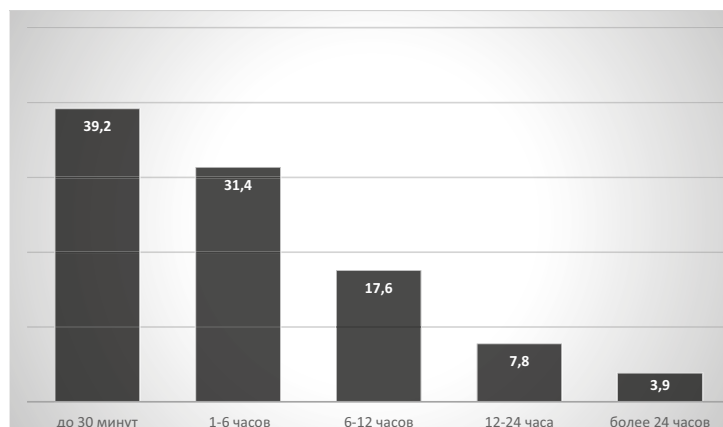


Рисунок 1. Распределение пациентов с инфарктом миокарда по времени обращения за медицинской помощью от начала развития заболевания

Тем не менее, достаточно много пациентов в исследовании обратились более чем через 6 часов от начала болезни. В качестве причины позднего обращения за медицинской помощью большинство пациентов указали на то, что «пройдет само» ($n=17$, 33,3%) или на сомнения по поводу кардиальных причин болевого синдрома ($n=10$, 19,6%), по одному пациенту указали, что не было возможности самостоятельно вызвать помощь и на ожидание эффекта от принятых медикаментозных препаратов. Два пациента (3,9%) самостоятельно подбирали препараты для обезболивания и, вероятно, увлеклись этим процессом.

На вопрос «Предпринимали ли вы какие-нибудь меры для снятия боли в груди?» 18 (35,3%)

пациентов ответили отрицательно, 13 (25,5%) пациентов назвали нитроглицерин, 10 (19,6%) пациентов обозначили ненаркотический анальгетик в качестве препарата, который они приняли для купирования боли и еще 10 пациентов принимали антигипертензивные препараты или валидол. При этом 21 (41,2%) пациент указал на наличие стенокардии в анамнезе, однако это не сказалось на качестве принимаемой самостоятельной догоспитальной терапии. Тем не менее, на наблюдение в поликлинике по поводу сердечно-сосудистых заболеваний до госпитализации указали лишь 16 (31,4%) пациентов.

Далее пациенты были разделены на две группы в зависимости от времени обращения за ме-

дицинской помощью от начала заболевания (до 6 часов [первая группа, $n=36$] и позже 6 часов [вторая группа, $n=15$]).

Было выяснено, что среди пациентов, обратившихся за медицинской помощью через 6 и более часов большинство, 12 (80%), – мужчины, тогда как среди пациентов, обратившихся за помощью до 6 часов, только 22 больных (61,1%) были мужского пола. Пациенты первой группы были более старшего возраста ($64,6 \pm 8,6$ лет), чем больные второй группы ($61,6 \pm 12,3$ года). Становится понятно, что пожилые женщины быстрее обращаются за медицинской помощью, имея уже анамнез сердечной-сосудистых заболеваний. Парадоксально, но во второй группе было больше пациентов с высшим образованием ($n=3$, 20%), чем в первой группе ($n=7$, 19,4%), больше работающих [$n=5$ (33,3%) vs $n=9$ (25%)], инвалидов [$n=3$ (20%) vs $n=3$ (8,3%)], во второй группе было меньше жителей сельской местности [$n=1$ (6,7%) vs $n=5$ (13,8%)] и больше пациентов с ежемесячным доходом до 10 тыс. рублей [$n=6$ (40%) vs $n=6$ (16,7%)], чем среди пациентов первой группы.

Таким образом, по результатам проведенного анкетирования, большинство пациентов с ИМ, поступившие в Кемеровский областной клинический кардиологический диспансер, обращаются за медицинской помощью до 6 часов от начала заболевания. Однако сохраняется группа пациентов, которые затягивают время до обращения за помощью, что может значимо влиять на эффективность лечения острого коронарного синдрома. Эти пациенты чаще мужского пола, более молодого возраста, с высшим образованием, работающие в городе. Именно среди этой группы необходимо проводить разъяснительные информационные мероприятия о значимости раннего обращения за медицинской помощью при появлении признаков ИМ.

Обсуждение

Не вызывает сомнений факт, что дальнейшее снижение показателей ранней летальности и отдаленной сердечно-сосудистой смертности при инфаркте миокарда может быть достигнуто за счет дальнейших усилий, направленных на улучшение существующих подходов, направленных на раннюю реперфузию при этом заболевании [1]. Наряду с необходимостью расширения сети доступных в течение круглых суток рентгеноперационных в нашей стране, имеется проблема нео-

боснованно продолжительного времени от начала развития заболевания до оказания специализированной реперфузионной помощи. В связи с этим, организаторы здравоохранения особое внимание уделяют учету и минимизации всех возможных временных задержек, включая время, которое требуется пациенту для оценки своего состояния и обращения за скорой медицинской помощью [2-7].

На сегодняшний день общее время от начала заболевания до восстановления кровотока в инфаркт-зависимой артерии, именуемое «симптом-баллон», представляется важным параметром, отражающим качество организации реперфузии для пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST (ИМпST). Данный временной промежуток непосредственно включает в себя время, связанное с реакцией больного на болезнь - «симптом-звонок в скорую медицинскую помощь», а также промежуток «звонок-баллон», затраченный на организацию медицинской помощи пациенту, формирующийся из трех временных интервалов: 1) «звонок-первый медицинский контакт»; 2) «первый медицинский контакт-дверь центра, с возможностью выполнения первичного чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ)»; 3) «дверь-баллон» [8].

Исходя из современных Европейских рекомендаций по реваскуляризации пациентов с ИМпST на сегодняшний день несколько сокращено время «первый медицинский контакт-баллон» до промежутка в 90 минут и «дверь-баллон» до 60 минут, таким образом, целевым значением показателя «симптом-баллон» можно считать время около 3 часов [9]. Однако достижение подобного временного результата требует колоссальных усилий по идентификации и ликвидации всевозможных причин «задержек» на всех этапах, путем оптимизации работы медицинских служб, параклинических подразделений и сферы организации здравоохранения [10].

Эталонной подобной работы может стать организация медицинской помощи пациентам с ИМпST в Швеции, о чем можно судить на основании среднестатистических интервалов, составляющих время «симптом-баллон», представленных в Шведском регистре SwedenHeart от 2011 года. Общее время до восстановления коронарного кровотока от исходных симптомов - 170 минут, «симптом-звонок в скорую медицинскую помощь» - 70 минут, «звонок-первый медицинский контакт» - 15 минут, «первый медицинский контакт-дверь

ЧКВ центра» - 30 минут, «дверь-баллон» - 40 минут [11]. Тем не менее, только сокращение отдельно каждого временного интервала, имеющего вклад в «симптом-баллон», закономерно позволит снизить раннюю летальность при инфаркте миокарда.

Для примера, в 2014 году региональный сосудистый центр, сформированный в 2010 году на базе Кемеровского областного клинического кардиологического диспансера были достигнуты следующие основные временные параметры: общее время до реперфузии от начала боли у пациентов с ИМпST составило 290 минут, время «симптом-звонок в скорую медицинскую помощь» - 135 минут, время «звонок-первый медицинский контакт» - 27 минут, временной отрезок «первый медицинский контакт-дверь ЧКВ- центра» - 54 минут, время «дверь-баллон» - 46 минут. Эти же интервалы для первичного ЧКВ при инфаркте миокарда на муниципальном уровне работы клиники составляли в 2008г. соответственно 410:142, 32, 40 и 196 минут. Безусловно, в сравнении со Шведскими данными, где стратегия реваскуляризации у пациентов с ИМпST разрабатывалась и усовершенствовалась более продолжительное время, в Кемеровской области сохраняется временная «задержка» на всех этапах, что требует дальнейших усилий по оптимизации тайм-менеджмента ведения больных с ИМпST, но, тем не менее, уже сейчас в динамике наметился явный позитивный тренд по ее нивелированию [2].

В исследовании Steg H. с соавторами показана классификация возможных временных «задержек» и их причины: задержки, обусловленные пациентом, не имеют регламента; задержки на постановку диагноза - не более 10 минут; задержки на восстановление коронарного кровотока - до 60-90 минут. При этом показатель интервала «симптом-звонок в скорую медицинскую помощь» и факторы, детерминирующие эту задержку четко не определены, что представляет высокий научно-практический интерес [12].

13 сентября 2008 г. стартовала международная инициатива «Stent for life», базирующаяся на принципе приверженности к активному использованию ЧКВ при реперфузии ИМпST. Создателями движения стали Европейская ассоциация ЧКВ и рабочая группа Европейских кардиологов по лечению острых заболеваний сердца. И если первичная цель движения 10 ведущих Европейских стран – увеличение числа ЧКВ была достиг-

нута достаточно быстро, о чем свидетельствуют ежегодные отчеты ассоциации интервенционных хирургов, то «качественная сторона» вопроса, направленная на оптимизацию оказания помощи больным с острыми коронарными синдромами и сокращение тех самых временных «задержек», продолжает изучаться.

Сегодня не вызывает сомнений, что своевременное оказание медицинской помощи зависит от способности пациентов распознавать симптомы сердечной катастрофы и повсеместной доступности неотложной помощи. Однако, согласно волонтерским публичным опросам движения «Stent for life», малое количество населения знает о критической важности раннего оповещения служб неотложной помощи о приступе боли в груди, что снижает эффективность и своевременность реперфузионной терапии в любом ее виде [13]. В связи с этим, для улучшения информированности больных о признаках инфаркта миокарда создаются большие образовательные компании: разрабатываются программы и рекомендации для больных, имеющие внедрение в средства массовой информации и повсеместное распространение. Примером такой компании может служить акция «Действуй быстро. Спаси жизнь», подразумевающая создания единого для территории страны, легкоузнаваемого перечня «телефонов спасения», что позволяет снижать временные затраты на поиск номеров неотложных служб в каждом конкретном регионе, например, национальные унифицированные номера СМП «03» и «112» [14-16].

Еще одной важной проблемой стратегии скорой реперфузии во всем мире является высокая частота обращений пациентов за медицинской помощью в санпропускники первичных сосудистых отделений, минуя этап скорой медицинской помощи. Так, по данным Kristensen S.D с коллегами, значительно увеличивается время задержки первичного ЧКВ, составляя в среднем дополнительные 30-60 минут. Самообращение зачастую ассоциируется с высоким риском осложнений «в пути», но несмотря на это продолжает оставаться ведущим способом поступления в 70% госпитализаций Португалии, 50% - Франции [17,18].

Таким образом, существует целый комплекс проблем, затрудняющих оказание своевременной высокотехнологичной помощи у пациентов с острым коронарным синдромом. Основные из них – высокие временные затраты на всех этапах до поступления пациента на стол рентгенопера-

ционной, либо до введения иглы шприца в вену пациента с тромболитическим препаратом. Все они требуют систематического выявления, мониторинга и скоординированных усилий по их минимизации.

В этой связи наиболее перспективными представляются усилия, направленные на: повышение

информированности населения о симптомах начинающегося ИМ и необходимости раннего обращения за медицинской помощью, повышение доступности службы скорой медицинской помощи в отдаленных территориях нашей страны и дальнейшее расширение сети сосудистых центров, работающих в режиме 24/7/365 [19,20].

FACTORS ASSOCIATED WITH DELAYS IN SEEKING MEDICAL CARE IN MYOCARDIAL INFARCTION

D.O. KOSYAGIN², P.N. ZAVYRILINA³, D.YU. SEDIH,¹ I.S. BYKOVA,¹
V.V. KASHTALAP¹

¹ *Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia*

² *The Meadows School, Las Vegas, Nevada, USA*

³ *Municipal Education Institution "State Classic Lyceum", Kemerovo, Russia*

Purpose. To assess factors associated with pre-hospital delay in seeking medical care in patients with myocardial infarction.

Materials and Methods: 51 patients with myocardial infarction, included in the original single-center research trial, were surveyed to assess the differences in the time intervals from the onset of symptoms to the decision to seek medical care, as well as the factors, associated with delay in calling emergency medical service.

Results. We found that the majority of patients (> 70%) with myocardial infarction, admitted to the Kemerovo Regional Clinical Cardiology Dispensary, applied for medical care within 6 hours from the onset of symptoms. However, there was a group of patients with increased pre-hospital delay time. Patient delay may affect the effectiveness of treatment for acute coronary syndrome. These patients were commonly of younger age and males, with higher education working in the urban areas. Information campaigns targeted at this group of patients should be launched to raise their awareness and highlight the crucial role of prompt and timely calling EMS after the onset of myocardial infarction.

Conclusion. It seems to be a rationale to launch informational campaigns targeting this group of patients (young working men living in large industrial cities) to highlight the importance of early and prompt seeking of medical care after the onset of MI symptoms.

Keywords: myocardial infarction, time to treatment, pre-hospital delay, patient delay

Background

Prompt coronary revascularization is associated with the efficient treatment of myocardial infarction (MI). Thus, the need to minimize the elapsed time between the onset of symptoms and medical treatment remains a crucial issue of concern affecting successful reperfusion therapy (either pharmacologic or catheter-based). Current clinical guidelines state the necessity to launch wide-ranging information campaigns aimed at raising awareness of MI symptoms and providing the detailed algorithm for the entire population to receive timely medical care.

Purpose

To assess factors associated with pre-hospital delay in seeking medical care in patients with myocardial infarction.

Materials and Methods

A total of 51 patients (of them 34 males (66.7%) with myocardial infarction admitted to the Kemerovo Regional Cardiovascular Center were included in a single-center, cross-sectional clinical trial. MI was diagnosed using the criteria of the Russian Society of Cardiology. The mean age of patients was 63.7±9.8 years, of whom 20 (39.2%) patients were under the age of 60, 19 (37.3%) aged 61 to 70 years, and 12 (23.5%) - ≥ 71 years. All patients underwent coronary angiography and percutaneous coronary intervention on the infarct-related coronary artery at admission or during the in-hospital period. All patients provided written informed consent. On day 5 of the in-hospital period, patients were surveyed using the original questionnaire, including 5 parts: marital and social status, place of residence, hospital admission method, history of cardiovascular disease and current medications. Particular attention was

devoted to the characteristics of chest pain requiring patient hospitalization, the decision of patients to take medications, and time from deciding to seek medical help to arriving at the hospital, and the causes for pre-hospital delay.

Results

Anginal chest pain syndrome was the main clinical manifestation of the disease ($n = 43$, 84.3%), which compelled the study subjects to seek medical help. The other patients presented with shortness of breath, weakness, and dizziness. 40 (78.4%) patients were admitted to the hospital through the ambulance. 8 patients (15.7%) were transferred from the outpatient department after the first medical contact. 3 patients (5.9%) self referred to the emergency department.

According to the obtained results, the time from symptom onset to the decision to seek medical treatment in the majority ($n = 36$, 70.7%) of patients was from 30 minutes to 6 hours. 9 (17.6%) patients arrived at the hospital within 6-12 hours of the onset of symptoms, 4 (7.8%) patients - within 24 hours, and 2 (3.9%) patients - ≥ 24 hours. Thus, over 70% of patients made treatment contact in a timely manner (≤ 6 hours from the onset of symptoms) (fig. 1).

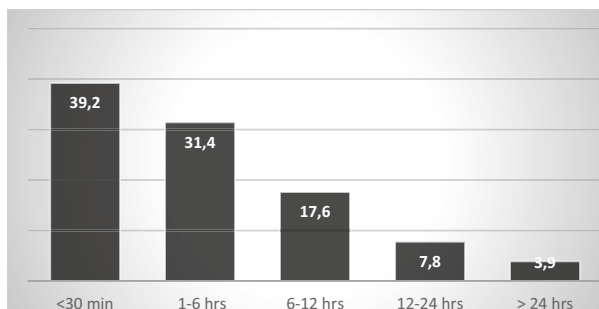


Figure 1. Distribution of MI patients by the time of seeking medical help from the onset of symptoms.

Nevertheless, a large proportion of patients sought medical attention > 6 hours after the onset of symptoms. 17 patients (33.3%) hindered early seeking of medical care, because they did not feel ill enough to call the emergency medical services (EMS). 10 patients (19.6%) doubted about heart-related causes of chest pain. One patient reported the absence of the opportunity to call the emergency medical services until the drugs would provide temporary relief. Two patients (3.9%) tried various home remedies to relieve their symptoms as they continued to collect clues about the meaning of the symptoms.

On the question "Have you taken any remedies to

relieve chest pain?", 18 patients (35.3%) responded negatively. 13 (25.5%) patients named nitroglycerin. 10 (19.6%) patients took non-opioid analgesics to relieve chest pain. Another 10 patients took antihypertensive drugs or validol. Importantly, 21 (41.2%) patients reported a positive history of angina pectoris. But, the presence of positive history did not improve the quality of self-administered pre-hospital therapy. However, only 16 (31.4%) patients reported that they regularly visited a cardiologist to monitor cardiovascular disease.

After baseline survey, all the patients were enrolled into two groups depending on the time from symptom onset to the decision to seek medical treatment: Group 1 ($n=36$) included patients who arrived at the hospital within 6 hours and Group 2 ($n=15$) patients who arrived after 6 hours.

Male patients ($n=12$, 80%) prevailed in both study groups (12 (80%) patients in Group 1 vs. 22 (61.1%) patients in Group 2). Group 1 patients were older (64.6 ± 8.6 years), than Group 2 patients (61.6 ± 12.3 years). The analysis reported that older women, who had a positive history of cardiovascular disease, were more likely to seek prompt medical treatment. It should be noted that there were more patients with higher education ($n = 3$, 20%) in Group 2, compared to Group 1 ($n = 7$, 19.4%). The number of employed and disabled subjects were higher in Group 2, compared to Group 1 ($n = 5$ (33.3%) vs. $n = 9$ (25%), and $n = 3$ (20%) vs. $n = 3$ (8.3%), respectively). There were more rural residents in Group 1, compared to Group 2 ($n = 5$ (13.8%) vs. $n = 1$ (6.7%), respectively). However, there were more patients with monthly income $< 10,000$ RUB in Group 2, than in Group 1 ($n = 6$ (40%) vs. $n = 6$ (16.7%), respectively).

Thus, the survey results allowed us to conclude that a large proportion of MI patients admitted to the Kemerovo Regional Cardiovascular Center started seeking medical help within 6 hours from the onset of symptoms. However, there were patients who hindered early seeking of medical care. The pre-hospital delay is known to affect significantly the effectiveness of treatment for acute coronary syndrome. These patients were commonly younger, males, with higher education and currently employed in the urban areas. Therefore, it seems to be a rationale to launch informational campaigns targeting this group of patients to highlight the importance of early and prompt seeking of medical care after the onset of MI symptoms.

Discussion

No doubt, further reduction in early mortality and long-term cardiovascular mortality from MI may be achieved through further efforts aimed at improving existing approaches, risk stratification and initiation of early reperfusion therapy [1]. Along with the need to expand the national network of available PCI centers, there is a crucial problem of increased pre-hospital time from the onset of symptoms to reperfusion therapy. In this regard, the health authorities pay special attention to minimize the time of pre-hospital delay, including the time for symptom recognition and interpretation and the time from decision to seeking medical attention [2-7].

To date, the total time from the onset of symptoms to the recovery of blood flow in the infarct-related artery, referred to as the “symptom-to-balloon time”, is an important parameter reflecting the quality of reperfusion therapy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). This time interval includes the time from symptom onset to the decision to seek medical treatment (commonly referred as “symptoms-to-EMS call”) and the time from EMS call to balloon. The last consists of three phases: (1) EMS call-to-the first medical contact; 2) the first medical contact-to-arrival to the door of PCI center, and 3) the door-to-balloon time [8].

According to the current European guidelines on revascularization of patients with STEMI, the first medical contact-to-balloon time should not exceed 90 minutes and the door-to-balloon time should be less than 60 minutes, resulting in the target value of the symptom-to-balloon time up to 3 hours [9]. However, the achievement of the target time intervals requires serious efforts to identify and minimize the possible causes of pre-hospital and in-hospital delay at all stages (emergency, diagnostic and imaging departments, etc.) [10].

The model of care for STEMI in Sweden provides the effective framework for the management of this group of patients. The effectiveness of their model is confirmed by the mean pre-hospital time reported in the SwedenHeart Swedish Registry (2011). The total time from the onset of symptoms to the recovery of coronary blood flow was 170 minutes, symptoms-to-EMS call - 70 minutes, EMS call-to-the first medical contact - 15 minutes, the first medical contact-to-the door of PCI center - 30 minutes, and the door-to-balloon time - 40 minutes [11]. Therefore, the reduction of each time interval, constituting the

symptoms-to-balloon time, will naturally reduce the early mortality in myocardial infarction.

Steg H. et al. developed a classification of pre-hospital delays and determined their causes: (1) patient-related delay; (2) diagnosis-related delay, which should not exceed 10 minutes; (3) reperfusion delay (i.e. delay in recovery of coronary blood flow) can be up to 60-90 minutes. Thus, the factors associated with prolonged time of symptoms-to-EMS call are of high scientific and practical relevance and require further investigation [12].

The Stent for Life Initiative, an EAPCI and EuroPCR alliance, was established on September 13, 2008, as the international network to implement the active use of PCI as a main reperfusion strategy in STEMI. While the primary goal of this initiative (to increase the number of PCIs in the top 10 European countries) was achieved quite quickly, as evidenced by the annual reports of the Association of Interventional Cardiology, the quality of care, i.e. optimization of medical care for patients with acute coronary syndromes and the reduction of pre-hospital and in-hospital delays, requires further investigation.

There is no doubt that the timely provision of medical care depends on the ability of patients to recognize and interpret the symptoms of heart attack and the availability of EMS. However, the volunteer public surveys of the Stent for Life Initiative reported a small number of people to be aware of the critical importance of early seeking of medical treatment for chest pain. The resultant pre-hospital delay may affect the effectiveness and timeliness of reperfusion therapy [13]. In this regard, the awareness of patients about the symptoms of MI may be raised by launching large educational programs, developing patient guidelines for further distribution via mass media. “Act quickly. Save the Life” Initiative is a vivid example highlighting the development and introduction of regional and national emergency telephone numbers, which allows reducing the time spent on searching for emergency service numbers in each specific region, for example, the national service numbers (03 or 112) [14-16].

In 2014, the specialists of the Regional Cardiovascular Center in Kemerovo, established in 2010, demonstrated the following main time intervals while providing urgent care for ACS: the time from the onset of chest pain to reperfusion in patients with STEMI was 290 minutes, symptoms-to-EMS call was 135 minutes, EMS call-to-the first medical contact - 27 minutes, the first medical contact-to the door of

PCI center - 54 minutes, the door-to-balloon time - 46 minutes [15] versus 410 minutes (142, 32, 40 and 196 minutes) in 2008, respectively. Undoubtedly, in comparison with the Swedish Registry data, where the revascularization strategy in patients with STEMI has been established for a longer time, there is a significant time delay at all stages, pre-hospital and in-hospital. Therefore, further efforts are required to optimize the time management in STEMI patients. Nevertheless, a trend towards significant improvements is evident [2].

Another issue of concern affecting prompt reperfusion worldwide is the high rate of patients' self-referrals to the Emergency Room. Kristensen S.D. et al. stated that significant increase in PCI delay (up to 30-60 minutes) is caused by a high rate of patients' self-referrals. Self-referral is often associated with a high risk of complications while driving. But despite this, self-referral continues to be the leading method of admission in 70% of hospitalizations in Portugal, and 50% in France [17, 18].

There is a wide range of problems that limit timely and adequate provision of medical care in patients with acute coronary syndrome. The main ones are pre-hospital and in-hospital delays at all stages before the patient enters the cath lab, or before inserting the needle into the vein of the patient for thrombolysis. All these issues require systematic identification, monitoring and application of coordinated efforts to minimize delays.

In this regard, the most promising approach is to focus the efforts aimed at raising awareness of the symptoms of myocardial infarction and the need for early access to medical care, increasing the availability of emergency medical services in remote areas of the country and further expanding the network of vascular centers providing 24/7/365 medical care [19, 20].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kashtalap V.V., Zavyrilina I.N., Barbarash O.L. Endovascular revascularization in acute coronary syndrome with ST segment elevation in Russia: problems and prospects for further development. *Creative cardiology*; (3): 5-15. [in Russian]. Кашталап В.В., Завырылина И.Н., Барбараш О.Л. Эндоваскулярная реваскуляризация при остром коронарном синдроме с подъемом сегмента ST в России: проблемы и перспективы дальнейшего развития. *Креативная кардиология*. 2015; (3): 5-15.
2. Ганюков В.И., Протопопов А.В. «Stent for life» Siberia. История. Задачи. План действий на 2013 год. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2013; 1: 35-9.
3. Ganyukov VI, Protopopov AV «Stent for life» Siberia. History. Tasks. Action plans for 2013. Complex issues of cardiovascular diseases. 2013; 1: 35-39. [in Russ].
3. Барбараш О.Л., Кашталап В.В. Роль фармакоинвазивной тактики ведения пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST в России. *Кардиология*. 2014; 54 (9):79-85.
4. Barbarash OL, Kashtalap V.V. Role of pharmacoinvasive management tactics for patients with acute coronary syndrome with ST segment elevation in Russia. *Kardilogiya*. 2014; 54 (9): 79-85. [in Russ].
4. Armstrong P.W., Gershlick A.H., Goldstein P. et al. Fibrinolysis or primary PCI in ST-segment elevation. *N. Engl. J. Med*. 2013; 368: 1379-87.
5. Бокерия Л.А., Алекян Б.Г. Состояние эндоваскулярной диагностики и лечения заболеваний сердца и сосудов в Российской Федерации (2004-2013 гг.). *Эндоваскулярная хирургия*. 2014;1 (1): 6-19.
5. Bokeriya LA, Alekyan BG The state of endovascular diagnostics and treatment of heart and vascular diseases in the Russian Federation (2004-2013) *Endovascular surgery*. 2014; 1 (1): 6-19. [in Russ].
6. Van de Werf F. The history of coronary reperfusion. *Eur. Heart J*. 2014; 35, 2510-5.DOI: 10.1093 / eurheartj / ehu268.
7. Скрыпник Д.В., Резцов Р.Ю., Макарычева О.В., Коновалова Е.В., Васильева Е.Ю., Шпектор А.В. Современные подходы к лечению острого инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST. *Креативная кардиология*. 2014; 2: 5-14.
7. Skrypnik DV, Reztsov R.Yu., Makarycheva OV, Konovalova EV, Vasilyeva E.Yu., Shpektor A.V. Modern approaches to the treatment of acute cardiac infarction with the elevation of the ST segment. *Creative cardiology*. 2014; 2: 5-14. [in Russ].
8. Boersma E., The Primary Coronary Angioplasty vs. Thrombolysis (PCAT)-2 Trialists' Collaborative Group; Does time matter? A pooled analysis of randomized clinical trials comparing primary percutaneous coronary intervention and inhospital fibrinolysis in acute myocardial infarction patients. *Eur Heart J*. 2006; 27 (7): 779-788. doi:10.1093/eurheartj/ehi810.

9. Европейское общество кардиологов (ESC), Европейская ассоциация кардиоторакальных хирургов (EACTS). Рекомендации по реваскуляризации миокарда 2014. Российский кардиологический журнал. 2015; 2 (118): 5–81.

European Society of Cardiology (ESC), European Association of Cardiothoracic Surgeons (EACTS). Recommendations for revascularization of the cardiovascular system 2014. Russian cardiological journal. 2015; 2 (118): 5-81. [in Russ].

10. Ганюков В.И., Тарасов Р.С., Коваленко О.В., Херасков В.Ю., Артамонова Г.В., Моисеенков Г.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Организация реперфузионной терапии больным острым инфарктом миокарда с elevацией сегмента ST в Кемерово. Сибирский медицинский журнал. 2010; 25(2), выпуск 1: 106.

Ganyukov V.I., Tarasov R.S., Kovalenko O.V., Kheraskov V.Yu., Artamonova G.V., Moiseenkov G.V., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Organization of reperfusion therapy for patients with acute myocardial infarction with ST segment elevation in Kemerovo. Siberian Medical Journal. 2010; 25(2), issue 1: 106. [in Russ].

11. Kristensen S. D., Fajadet J., Di Mario C., Kaifoszova Z., Laut K. G., Deleanu D., Gilard M., Guagliumi G., Goktekin O., Jorgova J., Kanakakis J., Ostojic M., Pereira H., Sabate M., Sobhy M., Vrints C., Wijns W., Widimsky P. Implementation of primary angioplasty in Europe: stent for life initiative progress report. EuroIntervention. 2012 May15; 8 (1): 35-42. Doi: 10.4244 / EIJV8I1A7.

12. Steg P., James S.K. , Atar D., Badano L. P., Lundqvist C. B., Borger M.A. Ducrocq G.ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force on the Management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2012; 33 (20): 2569-2619.DOI: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs215>.

13. Барбараш О.Л. Европейская программа «Stent for life»: предпосылки, история создания, основные цели и задачи. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2013;(1):10-18.

Barbarash O.L. European program «Stent for

life»: prerequisites, history of creation, main goals and objectives. Complex issues of cardiovascular diseases. 2013; 1: 10-18. DOI: 10.17802 / 2306-1278-2013-1-10-18. [in Russ].

14. Kaifoszova Z. Stent for Life Initiative: Leading Example in Building STEMI Systems of Care in Emerging Countries. EuroIntervention. 2014; 8 (10) Suppl T: T87-T95.

15. Ганюков В.И., Шилов А.А. К вопросу о выполнении рекомендованных лечебных мероприятий у больных острым коронарным синдромом в кардиологических учреждениях на территории Российской Федерации. Кардио-ИТ. 2015; 2(2): e0201.

Ganyukov V.I., Shilov A.A. To the question of the implementation of recommended therapeutic measures in patients with acute coronary syndrome in cardiological institutions on the territory of the Russian Federation. Cardio-IT. 2015; 2 (2): e0201. [in Russ].

16. Kanakakis J., Ntalianis A., Papaioannou G., Hourdaki S., Parharidis G. Stent for Life Initiative - the Greek experience. EUROINTERVENTION. 2012 Aug; 8 Suppl :P116-20. doi: 10.4244/EIJV8SPA20.

17. Hélder Pereira, Fausto J. Pinto, Rita Calé, Ernesto Pereira, Jorge Marques, Manuel Almeida et al. Stent for Life in Portugal: This initiative is here to stay. Revista Portuguesa de Cardiologia. 2014; 33 (6): 363-370.

18. Kristensen S.D., Laut K.G., Kaifoszova Z., Widimsky P. Variable Penetration of Primary Angioplasty in Europe-What Determines the Implementation Rate? EuroIntervention. 2012; 8 (1): 18-26.

19. Keeley C., Boura J.A., Grines C.L. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomized trials. Lancet. 2003; 361: 13-20.

20. Zijlstra F., Hoorntje J.C., de Boer M.J., Reijfers S., Miedema K. Long-term benefit of primary angioplasty as compared with thrombolytic therapy

for acute myocardial infarction. N. Engl. J. Med. 1999; 341: 1413-9.

Статья поступила 18.07.2017

Для корреспонденции:

Кашталап Василий Васильевич

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел: +7 (3842) 64-31-53,

E-mail: kashvv@kemcardio.ru

For correspondence:

Kashtalap Vasily

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,

650002, Russian Federation

Тел: +7 (3842) 64-31-53,

E-mail: kashvv@kemcardio.ru

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ВИСЦЕРАЛЬНОГО ЖИРОВОГО ДЕПО У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ ТОМОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДИК

А. Н. КОКОВ¹, Н. К. БРЕЛЬ¹, В. Л. МАСЕНКО¹, О. В. ГРУЗДЕВА¹, В. Н. КАРЕТНИКОВА²,
В. В. КАШТАЛАП¹, О. Л. БАРБАРАШ¹

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

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Кемерово, Россия

Цель исследования. Количественная оценка абдоминального и эпикардального депо висцеральной жировой ткани с использованием современных томографических методик у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца.

Материалы и методы. 88 пациентов обследованы с использованием мультиспиральной компьютерной и магнитно-резонансной томографии.

Результаты. По данным обследования, абдоминальное висцеральное ожирение отмечено у 70,4% пациентов выборки, тогда как по ИМТ выявлены лишь 35,2%. У пациентов с ИБС степень выраженности абдоминального и эпикардального висцерального ожирения не зависит от пола. Разделение пациентов на основании нормативных значений площади висцерального жира (130см²) позволило выявить достоверные различия по толщине слоя эпикардального жира как левого ($p=0,00015$), так и правого желудочка ($p=0,00126$).

Заключение. Подходы к определению ожирения, используемые в настоящее время, недооценивают истинную распространенность данной патологии. Морфометрическая оценка висцерального жирового депо с использованием томографических методик позволяет достоверно и неинвазивно верифицировать жировую ткань и выделить категорию пациентов с висцеральным ожирением.

Ключевые слова: эпикардальный жир, висцеральное ожирение, мультиспиральная компьютерная томография, магнитно-резонансная томография.

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF VISCERAL ADIPOSE DEPOT IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE BY USING OF MODERN TOMOGRAPHIC METHODS

A. N. KOKOV¹, N. K. BREL¹, V. L. MASENKO¹, O. V. GRUZDEVA¹, V. N. KARETNIKOVA²,
V. V. KASHTALAP¹, O. L. BARBARASH¹

¹Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia

²State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education Kemerovo State Medical University Ministries of Health of the Russian Federation, Kemerovo, Russia

Abstract. The aim of the study was a quantitative assessment of abdominal and epicardial depot visceral adipose tissue with the use of modern methods of tomography in patients with stable coronary heart disease (CHD).

Material and methods. 88 patients were examined with multislice computed and magnetic resonance tomography.

Results. According to a survey of abdominal visceral obesity was observed in 70.4% of the sample of patients and only 35.2% identified BMI. In patients with CHD severity of abdominal and epicardial visceral obesity is not dependent on sex. Separating patients under standard boundary values of visceral fat area (130cm²) revealed significant differences in the layer thickness of both the left epicardial fat ($p = 0.00015$) and right ventricle ($p = 0.00126$).

Conclusion. Approaches to the definition of obesity, currently used underestimate the true prevalence of this pathology. Morphometric evaluation of visceral fat depot using tomographic techniques can reliably and noninvasively verify adipose tissue and highlight the category of patients with visceral obesity.

Keywords: epicardial fat, visceral obesity, multislice computed tomography, magnetic resonance imaging.

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) стоит на первом месте среди причин сердечно-сосудистой смертности в Российской Федерации. Среди факторов риска коронарного атеросклероза и ИБС, таких, как мужской пол, пожилой возраст, дислипидемия, артериальная гипертензия (АГ), курение, сахарный диабет, низкая физическая активность, злоупотребление алкоголем, одну из ведущих ролей играет ожирение. В России 60 % женщин и 50% мужчин старше 30 лет страдают от избыточного веса [1]. Однако индекс массы тела (ИМТ) в качестве критерия ожирения не в полной мере позволяет верифицировать как сам факт ожирения, так и его тип. Непосредственное влияние на развитие атеросклероза, метаболического синдрома и других патологических состояний, ассоциированных с ожирением, оказывает висцеральная жировая ткань (ВЖТ) [2, 3]. Роль висцерального жира как метаболически активной ткани заключается в выработке противовоспалительных цитокинов и адипокинов, проатерогенный эффект которых реализуется через воздействие на клетки эндотелия сосудов [4]. Наряду с наиболее объемным висцеральным абдоминальным депо эпикардальная жировая ткань, обладая теми же пара-, эндокринными функциями, оказывает непосредственное влияние на коронарные артерии. Эпикардальная жировая ткань (ЭЖТ) достоверно ассоциируется с коронарным атеросклерозом и связана с будущими сердечно-сосудистыми событиями без связи с традиционными факторами риска

[5, 6]. Однако в настоящее время в литературе нет однозначных данных о корреляции объемов ВЖТ и ЭЖТ как с позиции морфометрии, так и с позиции влияния этих объемов на течение и прогноз ИБС. В большей мере это обусловлено разрозненностью подходов к оценке объема висцеральной жировой ткани.

Цель исследования

Количественная оценка абдоминального и эпикардального депо висцеральной жировой ткани с использованием современных томографических методик у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 88 пациентов в возрасте 57 (52; 63) лет, находившихся на стационарном лечении в клинике Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний по поводу ИБС перед плановым коронарным шунтированием. Критериями включения явились наличие верифицированной ИБС, стабильная стенокардия ФК I-III, заполненное информированное согласие пациента. Не были включены в исследование больные с нестабильной стенокардией, массой тела более 130 кг, а также пациенты, отказавшиеся от обследования. Характеристика выборки пациентов представлена в таблице 1. Критерием ожирения, согласно рекомендациям ВОЗ, считали ИМТ ≥ 30 кг/м².

Таблица 1.

Клинико-анамнестическая характеристика пациентов

Показатель	Количество, n	%
Мужчины	68	77,3
Стенокардия ФК I	31	35,2
Стенокардия ФК II	29	32,9
Стенокардия ФК III	28	31,8
Артериальная гипертензия	70	79,5
Курение	45	51,2
Сахарный диабет	11	12,5
Дислипидемия	72	82,0
ИМТ > 30	31	35,2

После предоставления информированного согласия на включение в исследование всем

пациентам была выполнена нативная магнитно-резонансная томография (МРТ) сердца на

МР-томографе Exelart Atlas 1.5 (Toshiba, Япония) с напряженностью магнитного поля 1,5 Тесла. Были использованы стандартные быстрые T1-взвешенные импульсные последовательности из кардиологического пакета с ЭКГ-синхронизацией. Параметры сканирования: время эхо (TE) – 24 мс, время повтора (TR) – 1000 мс, угол наклона – 90°, матрица – 256x256, толщина среза – 7 мм. Ориентация срезов осуществлялась по короткой оси левого желудочка (ЛЖ). Полученные изображения использовали для оценки толщины эпикардиальной жировой ткани. С помощью стандартных инструментов выполняли измерение слоя жировой ткани от наружного края миокарда до висцерального листка перикарда по передней стенке правого желудочка (ЭЖП, мм) и по задней стенке левого желудочка (ЭЖЛ, мм).

Кроме того, всем пациентам выполняли мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) на 64-срезовом компьютерном томографе Siemens Somatom 64 (Siemens, ФРГ) со следующими параметрами: толщина среза – 1 мм, матрица изображения – 512x512, напряжение на трубке – 120 кВ, сила тока – 100 мАс. Сканирование осуществляли на уровне L₄-L₅ позвонков в краниокаудальном направлении. Постпроцессинговую обработку полученного пакета DICOM изображений осуществляли на мультимодальной рабочей станции «Leonardo» (Siemens, ФРГ).

Количественная оценка абдоминального депо висцерального жира включала в себя измерение общей площади абдоминальной жировой ткани (АЖТ), висцерального и подкожного компонентов, а также индекс отношения площадей висцерального и подкожного жира (ВЖТ/ПЖТs). Измерение площади осуществляли на поперечном изображении на уровне середины межпозвонкового диска L4-5. В зоне интереса жировая ткань определялась в окне плотностью от -160 НУ до -50 НУ. Признаками висцерального ожирения считали площадь ВЖТ более 130 см², а также значения индекса ВЖТ/ПЖТs более 0,4 [7].

Объем абдоминальной жировой ткани оценивали в поперечном срезе толщиной 20 мм, центрированным на уровне диска L₄-L₅. Расчет объема ВЖТ осуществляли полуавтоматическим методом с использованием программного продукта, входящего в пакет рабочей станции, путем ограничения зоны интереса внутренним контуром мышечной стенки брюшной полости и

забрюшинного пространства. Объем подкожной жировой клетчатки определяли вычислением разности общего объема АЖТ в зоне интереса и объема ВЖТ. В качестве индексированной величины, характеризующей степень преобладания ВЖТ, использовали отношение висцерального и подкожного абдоминального жира, отношение их объема (ВЖТ/ПЖТv).

Статистический анализ проводился при помощи программного пакета Statistica 6.0. Для количественных признаков результаты представлены в виде медианы (Me) с межквартильным интервалом (Q25; Q75). Количественные и порядковые переменные сравнивали с помощью критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился по критерию Спирмана. Для всех видов анализа статистически значимыми считали значения $p < 0,05$.

Результаты

Проведенный сравнительный анализ показателей абдоминального висцерального жирового депо у лиц мужского и женского пола из числа включенных в исследование пациентов продемонстрировал у женщин достоверно более высокие значения ИМТ, показателей площади и объема как общей АЖТ, так и ПЖТ (таблица 2). Различия по выраженности ожирения в зависимости от пола были обусловлены более развитым подкожным компонентом абдоминального жира у женщин при сравнительно равных значениях ВЖТ.

В нашем исследовании обращали на себя внимание существенные различия результатов оценки распространенности ожирения в общей выборке в зависимости от критерия, использованного для определения наличия у пациентов ожирения. С учетом ИМТ ожирение отмечали лишь у 31 пациента (35,2%), тогда как, по данным измерения площади ВЖТ, ожирение имело у 62 больных (70,4%). При дополнении морфометрии индексом ВЖТ/ПЖТs > 0,4 количество больных с ожирением увеличивалось до 74 (84,1%). В связи с этим был выполнен сравнительный анализ данных количественной оценки висцерального жира у больных с ожирением, верифицированным по ИМТ, и пациентов с ожирением по данным МСКТ. Во вторую подгруппу вошли лица с признаками висцерального ожирения по площади, по индексу ВЖТ/ПЖТ, а также с сочетанием обоих показателей (таблица 3).

Таблица 2.

Показатели абдоминальной и эпикардиальной жировой ткани у мужчин и женщин, Me (Q25;Q75)

Показатель	Мужчины, n=68	Женщины, n=20	p
ИМТ, кг/м ²	27,6 (25,2; 30,5)	30,8 (25,7; 34,9)	0,0177
V АЖТ, см ³	840,9 (701,8; 1039,0)	1062,5 (902,9; 1271,7)	0,0018
V ВЖТ, см ³	342,9 (243,0; 425,9)	284,1 (230,3; 487,5)	0,8783
V ПЖТ, см ³	486,7 (386,4; 599,0)	720,33 (615,4; 906,2)	0,000011
ВЖТ/ПЖТ _v	0,67 (0,52; 0,87)	0,47 (0,33; 0,62)	0,0002
S АЖТ, см ²	439,9 (367,4; 568,5)	572,3 (493,3; 651,2)	0,0033
S ВЖТ, см ²	176,8 (118,2; 216,8)	175,3 (121,3; 260,4)	0,8783
S ПЖТ, см ²	260,6 (215,4; 331,3)	386,7 (330,2; 456,4)	0,00003
ВЖТ/ПЖТ _s	0,65 (0,46; 0,78)	0,47 (0,3; 0,69)	0,0058
ЭЖТ _л , мм	4,6 (3,3; 7,1)	3,9 (2,9; 4,9)	0,0877
ЭЖТ _п , мм	5,2 (3,9; 8,2)	5,3 (4,0; 6,12)	0,3244

Отмечены достоверные различия как по площади, так и по объему подкожного и висцерального компартментов АЖТ за счет более высоких показателей у больных с ожирением по ИМТ. Индексированный показатель ВЖТ/ПЖТ отражает соотношение висцерального и подкожного депо жировой ткани и в исследуемой выборке при различных подходах к оценке ожирения достоверно не различался. Также не было выявлено достоверных различий при сравнительном анализе показателей толщины эпикардиального жира у больных с ожирением.

Безусловно, общие патогенетические механизмы развития ожирения и метаболического

синдрома предполагают параллельное прогрессирование жировых депо различных локализаций. Однако способ использования ИМТ в качестве достоверного выявления эпикардиального ожирения не нашел подтверждения в ходе нашего исследования. Было отмечено, что при разделении пациентов на подгруппы с ожирением и без него с использованием ИМТ показатели ЭЖТ как левого, так и правого желудочков существенно не различались. Напротив, разделение пациентов на основании нормативных значений площади ВЖТ позволило выявить достоверные различия по толщине ЭЖТ как левого (p=0,00015), так и правого желудочков (p=0,00126).

Таблица 3.

Сравнительный анализ показателей абдоминальной и эпикардиальной жировой ткани у больных с ожирением, верифицированным по данным ИМТ и по данным МСКТ, Me (Q25;Q75)

Показатель	ИМТ, n=31	МСКТ, n=74	p
ИМТ, кг/м ²	32,3 (31,1; 34,6)	27,8 (25,1; 31,1)	p=,000000
V АЖТ, см ³	1144,4 (872,5; 1281,3)	917,1 (755,2; 1074,8)	p=,000973
V ВЖТ, см ³	405,2 (312,6; 523,2)	342,1 (246,3; 427,3)	p=,012267
V ПЖТ, см ³	691,7 (547,2; 902,2)	562,1 (436,4; 682,3)	p=,005892
ВЖТ/ПЖТ _v	0,65 (0,51; 0,79)	0,64 (0,44; 0,81)	p=,924445
S АЖТ, см ²	583,1 (449,2; 690,3)	477,6 (389,3; 579,7)	p=,001232
S ВЖТ, см ²	196,5 (167,8; 297,9)	178,1 (125,4; 211,1)	p=,012389
S ПЖТ, см ²	377,7 (283,0; 498,5)	295,7 (238,8; 377,7)	p=,009061
ВЖТ/ПЖТ _s	0,64 (0,46; 0,78)	0,63 (0,44; 0,78)	p=,866113
ЭЖТ _л , мм	5,5 (3,8; 7,7)	4,4 (3,0; 6,9)	p=,089789
ЭЖТ _п , мм	5,4 (4,6; 9,2)	5,3 (3,9; 7,6)	p=,235145

Обсуждение

Висцеральный жир, обладая провоспалительной активностью, играет важную роль в развитии атеросклероза. Выраженность именно висцерального жирового депо напрямую влияет на исходы ИБС [8]. Это обуславливает необходимость количественной оценки висцерального жира для определения критериев сосудистого риска, связанных с ожирением. Полученные результаты настоящего исследования указывают на слабые стороны методики выявления избыточной массы тела с использованием принятой градации по ИМТ.

Полученные достоверные различия морфометрических показателей при определении ожирения методом ИМТ и с использованием количественных значений площади жировой ткани на поясничном уровне позволяют объяснить «диагностические ножницы» в оценке распространенности ожирения в исследуемой выборке – 35,2% по ИМТ и 70,4% по площади ВЖТ. Как видно из результатов сравнительного анализа, ИМТ в сравнении с МСКТ-критериями позволяет отнести к группе ожирения только пациентов с крайне высокими количественными показателями абдоминальной жировой ткани. Тогда как именно верификация по площади ВЖТ на поясничном уровне позволяет дополнительно выявить пациентов с признаками ожирения из числа тех, кто имеет нормальные показатели ИМТ. Аналогичные данные, указывающие на низкую диагностическую ценность ИМТ в сравнении с площадью ВЖТ, были получены нами ранее у пациентов, перенесших инфаркт миокарда [3].

Влияние типа ожирения на прогноз у больных с ИБС отмечен в ряде исследований. Доказана прямая связь между абдоминальным (андроидным) типом ожирения и развитием таких заболеваний, как сахарный диабет, артериальная гипертензия, инфаркты миокарда и инсульты [9, 10]. Но ИМТ не позволяет достоверно оценить распределение жира в подкожном слое и висцеральном депо. Это видно из результатов сравнительного анализа исследуемых параметров у лиц мужского и женского пола. При достоверно больших значениях ИМТ у женщин висцеральный объем жировой ткани не отличается от ВЖТ мужчин.

Эпикардиальный жир играет важную роль в развитии атеросклероза коронарных артерий не только в силу своей вазо- и паракринной активности, но и благодаря своей анатомической бли-

зости к адвентиции основных эпикардиальных коронарных артерий [11]. Адипокины и провоспалительные цитокины напрямую секретируются в коронарные артерии, провоцируя стремительное развитие атеросклероза, а также вызывают сосудистое воспаление, что приводит к нестабильности атеросклеротических бляшек [3]. Кроме того, эпикардиальный жир оказывает механическое воздействие на сердце и коронарные артерии, что ведет к нарушению сократительной способности. Сердце оказывается заключенным в жировой «панцирь». Но, вместе с тем, медиаторы воспаления, вырабатываемые ЭЖТ, стимулируют развитие коллатеральной циркуляции у пациентов с ИБС [12]. Учитывая эти данные, можно говорить о разнонаправленности эффектов ЭЖТ, обусловленных отклонением объема жирового депо от физиологической нормы [13]. Эффективность оценки толщины ЭЖТ по данным эхокардиографии ограничена операторозависимостью метода, акустическим окном эхокардиографии и отсутствием возможности полного измерения количества жира вокруг сердца. Морфометрия ЭЖТ на основании данных МРТ, безусловно, является менее доступным способом оценки, но при этом она лишена недостатков и ограничений эхокардиографии [14, 15].

Отсутствие достоверных различий по толщине ЭЖТ у мужчин и женщин в нашем исследовании объясняется однородностью выборки по основной коронарной патологии. Это соответствует данным популяционных исследований Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis и the Framingham Heart Study, которые определили расширение жировых депо вокруг сердца как независимый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний [16]. В согласии с этими данными полученные нами данные еще раз подчеркивают важность оценки эпикардиального жира. Достоверные различия выраженности слоя жировой ткани вокруг эпикарда у пациентов с наличием и отсутствием абдоминального ожирения подтверждают целесообразность определения сердечно-сосудистого риска с использованием не ИМТ, а морфометрических критериев на основании томографических методик.

Заключение

Подходы к определению ожирения, используемые в настоящее время, недооценивают ис-

тинную распространенность данной патологии. Морфометрическая оценка висцерального жирового депо с использованием мультиспиральной компьютерной томографии позволяет достоверно и неинвазивно верифицировать жировую ткань и выделить категорию пациентов с абдоминальным висцеральным ожирением. По данным проведенного исследования, у пациентов с ИБС степень выраженности абдоминального висцерального ожирения не зависит от пола. Отмеченные различия толщины жировой клетчатки вокруг сердца по данным магнитно-резонансной томографии требуют уточнения в аспекте определения нормативных показателей, взаимосвязи с выраженностью абдоминального депо, влияния на течение, прогноз ИБС и, таким образом, являются основанием для проведения дальнейших исследований в этом направлении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ожирение в России: статистические данные [Электронный ресурс]. 2013; Режим доступа: <http://health.passion.ru/novosti-zdorovya/lishnii-ves/ozhirenie-v-rossii-statisticheskie-dannye.htm>.
2. Ozhirenie v Rossii: statisticheskie dannye [Elektronnyj resurs]. 2013; Rezhim dostupa: <http://health.passion.ru/novosti-zdorovya/lishnii-ves/ozhirenie-v-rossii-statisticheskie-dannye.htm>. [In Russ].
3. Бондаренко В.М., Марчук В.П., Пиманов С.И., Михайлова Н.А., Макаренко Е.В. Корреляция содержания висцеральной жировой ткани по данным компьютерной томографии с антропометрическими показателями и результатами ультразвукового исследования. Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2013; 1: 31-38.
4. Bondarenko V.M., Marchuk V.P., Pimanov S.I., Mikhaylova N.A., Makarenko E.V. Korrelyatsiya sodержaniya vistseral'noy zhirovoy tkani po dannym komp'yuternoy tomografii s antropometricheskimi pokazatelyami i rezul'tatami ul'trazvukovogo issledovaniya. Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2013; 1: 31-38. [In Russ].
5. Груздева О.В., Акбашева О.Е., Бородкина Д.А., Каретникова В.Н., Дылева Ю.А., Коков А.Н. и др. Взаимосвязь показателей ожирения и адипокинов с риском развития сахарного диабета 2-го типа через год после перенесенного инфаркта миокарда. Российский кардиологический журнал. 2015; 4: 59-67. DOI:10.15829/1560-4071-2015-4-59-67.
6. Gruzdeva O.V., Akbasheva O.E., Borodkina D.A., Karetnikova V.N., Dyleva Y.A., Kokov A.N. et al. Relationship of obesity parameters and adipokines with the risk of 2nd type diabetes development in a year after myocardial infarction. Russian Journal of Cardiology. 2015; 4: 59-67. DOI:10.15829/1560-4071-2015-4-59-67. [In Russ.].
7. Дедов И.И., Мельниченко Г.А. Ожирение: этиология, патогенез, клинические аспекты. М.; 2004.
8. Dedov I.I., Mel'nichenko G.A. Ozhirenie: etiologiya, patogenez, klinicheskie aspekty. Moscow; 2004.
9. Mahabadi A.A., Berg M.H., Lehmann N., Kalsch H., Bauer M., Kara K. et al. Association of epicardial fat with cardiovascular risk factors and incident myocardial infarction in the general population: the Heinz Nixdorf Recall Study. J. Am. Coll. Cardiol. 2013; 61 (13): 1388-1395. DOI:10.1016/j.jacc.2012.11.062.
10. Sacks H.S., Fain J.N. Human epicardial adipose tissue: a review. Am. Heart. J. 2007; 153: 907-917. DOI:10.1016/j.ahj.2007.03.019.
11. Sjoestrom L.A. Computed tomography based multicompartiment body composition technique and anthropometric predictions of lean body mass, total and subcutaneous adipose tissue. Int. J. Obes. 1991; 15: 19-30.
12. Barbarash O., Gruzdeva O., Uchasova E., Dyleva Y., Belik E., Akbasheva O. et al. The role of adipose tissue and adipokines in the manifestation of type 2 diabetes in the long-term period following myocardial infarction. Diabetol. Metab. Syndr. 2016; 17: 8-24. DOI:10.1186/s13098-016-0136-6.
13. Николаев Д.В., Смирнов А.В., Бобринская И.Г., Руднев С.Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. М.; 2009.
14. Nikolaev D.V., Smirnov A.V., Bobrinskaya I.G., Rudnev S.G. Bioelectric impedance analysis of human body composition. Moscow; 2009.
15. Чугунова Ю.В., Чумакова Г.А., Веселовская Н.Г. Нейрокогнитивные нарушения у пациентов с висцеральным ожирением в периоперационном периоде коронарного шунтирования. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2016; 3: 59-65. DOI:10.17802/2306-1278-2016-3-59-65.
16. Chugunova Y.V., Chumakova G.A., Veselovskaya

N.G. Neurocognitive disorders among patients with visceral obesity in perioperative period of coronary bypass surgery. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2016; 3: 59-65. DOI:10.17802/2306-1278-2016-3-59-65. [In Russ.].

11. Aydın A.M., Kayalı A., Poyraz A.K., Aydın K. The relationship between coronary artery disease and pericoronary epicardial adipose tissue thickness. J. Int. Med. Res. 2015; 43 (1): 17-25. DOI:10.1177/0300060514558323.

12. Nalson M.R., Mookadam F., Thota V. Epicardial Fat: An Additional Measurement for Subclinical Atherosclerosis and cardiovascular risk stratification. J. Am. Soc. Echocardiography. 2011; 24 (3): 339-345. DOI:10.1016/j.echo.2010.11.008.

13. Драпкина О.М., Корнеева О.Н., Драпкина Ю.С. Эпикардальный жир: нападающий или запасной? Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2013; 9 (3): 287-291.

Drapkina O.M., Korneeva O.N., Drapkina

Для корреспонденции:
Брель Наталья Кирилловна

Адрес: 650002, г. Кемерово,
Сосновый бульвар, д. 6
Тел. +7 (3842) 64-35-19,
E-mail: brelnk@kemcardio.ru

Ju.S. Epicardial fat: a striker or a spare? Ration Pharmacother Cardiol 2013; 9 (3): 287-291 [In Russ].

14. Saura D., Oliva M.J., Rodriguez D., Pascual-Figal D.A., Hurtado J.A., Pinar E. et al. Reproducibility of echocardiographic measurements of epicardial fat thickness. Int. J. Cardiol. 2010; 141: 311-313. DOI:10.1016/j.ijcard.2008.11.127.

15. Sicari R., Sironi A.M., Petz R., Frassi F., Chubuchny V., Daniele de Marchi. et al. Pericardial rather than epicardial fat is a cardiometabolic risk marker: an MRI vs echo study. J. Am. Soc. Echocardiogr. 2011; 24 (10): 1156-1162. DOI:10.1016/j.echo.2011.06.013.

16. Monti M., Monti A., Murlodo G., Renzi P., Pirro M.R., Borgognoni F. et al. Correlation between epicardial fat and cigarette smoking: CT imaging in patients with metabolic syndrome. Scand. Cardiovasc. J. 2014; 48 (5): 317-322.

Статья поступила 21.03.2017

For correspondence:

Brel Natalia

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,
650002, Russian Federation
Тел. +7 (3842) 64-35-19,
E-mail: brelnk@kemcardio.ru

УДК: 616-0156.52;616.34;616.48/45

DOI: 10.17802/2306-1278-2017-6-3-120-130

ОЖИРЕНИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ: ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ТЕРАПИИ

К. А. АЙТБАЕВ¹, И. Т. МУРКАМИЛОВ²

*¹НИИ молекулярной биологии и медицины при Национальном центре кардиологии и терапии
Минздрава Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика*

*²Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева Минздрава Кыргызской
Республики, Бишкек, Кыргызская Республика*

В обзоре представлены данные, характеризующие современное состояние знаний о связи между кишечной микробиотой, ожирением и метаболическим синдромом. Обсуждается патофизиологическая роль кишечной микробиоты в развитии ожирения и метаболического синдрома. Рассматриваются потенциальные возможности альтернативной терапии для контроля потребления энергии и снижения распространённости ожирения и метаболического синдрома.

Ключевые слова: ожирение, метаболический синдром, кишечная микробиота, субклиническое воспаление, транслокация фекальной микробиоты, пробиотики, пребиотики.

OBESITY AND METABOLIC SYNDROME: PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF GUT MICROBIOTA AND POTENTIAL OF THE ALTERNATIVE THERAPY

K. A. AITBAEV¹, I. T. MURKAMILOV²

*¹ Research Institute of Molecular Biology and Medicine under the National Center of Cardiology and
Therapy of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic*

*² I.K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy under the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic,
Bishkek, Kyrgyz Republic*

The review presents data describing the current state of knowledge about the link between gut microbiota, obesity and metabolic syndrome. Pathophysiological role of gut microbiota in the development of obesity and metabolic syndrome is discussed. Potential of alternative therapy in controlling energy consumption and reducing the prevalence of obesity and metabolic syndrome is considered.

Key words: obesity, metabolic syndrome, gut microbiota, low-grade inflammation, fecal microbiota transplantation, probiotics, prebiotics.

Введение

В последние два десятилетия распространённость ожирения растёт в мире угрожающими темпами. Например, в США ожирением страдает более чем 1/3 взрослого населения страны, а затраты на борьбу с ожирением и связанными с ним заболеваниями составили в 2008 году 147 млрд американских долларов [1]. Ожирение характеризуется избытком жировой ткани и развивается тогда, когда возникает дисбаланс между

потреблением и расходом энергии [2]. Ожирение обычно ассоциируется с развитием ряда хронических осложнений, таких как высокий уровень глюкозы в крови натошак, повышенный уровень триглицеридов, низкий уровень холестерина липопротеинов высокой плотности и высокое артериальное давление [3]. Лицам, у которых имеется, по крайней мере, три из этих перечисленных критериев, можно поставить клинический диагноз метаболического синдрома (МС) [3]. И, тем не менее, роль в развитии МС у этих перечис-

ленных компонентов не равнозначна – ключевое значение всё же имеет избыток жировой ткани [4]. МС, в свою очередь, увеличивает риск развития таких метаболических заболеваний как сахарный диабет 2-го типа и сердечно-сосудистые заболевания.

Накопленные в последние годы результаты научных исследований свидетельствуют, что ключевую роль в патогенезе ожирения и МС играет кишечная микробиота (КМ), которая участвует в регуляции обмена веществ хозяина через симбиотические взаимодействия с ним. В то же время, изменение микробной экосистемы кишечника, по данным исследований, способствует существенным метаболическим и иммунным нарушениям у животных и человека. В данном обзоре мы рассмотрим патофизиологическую роль КМ в развитии ожирения и МС, а также обсудим возможность использования для их терапии альтернативных подходов, направленных на нормализацию конфигурации микробной экосистемы кишечника.

Кишечная микробиота и здоровье человека

Кишечник человека содержит в себе более 100 триллионов микробных клеток, которые в совокупности обозначаются как «кишечная микробиота». Процесс колонизации этими микробами начинается внутриутробно, через передачу микробов от матери к плоду. Колонизация кишечника человека продолжается после рождения и модулируется различными факторами, включающими, в том числе, гестационный возраст, способ рождения (естественным образом или через кесарево сечение) и питания (грудное вскармливание или искусственное), гигиену и воздействие антибиотиков. Окружающая среда и диета в течение первых 3 лет жизни имеют решающее значение для приобретения взрослого типа микробиоты и формирования симбиоза «микробиота-хозяин», который существенно влияет на развитие иммунной и нервной систем. Хотя микробиота по своему составу весьма разнообразна, и в кишечнике, например, обитают представители примерно 70 типов бактерий, тем не менее, основная масса их представлена двумя типами: *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [5]. По мнению некоторых авторов, КМ оказывает глубокое влияние на состояние здоровья человека, так как обладает метаболической активностью, которая

эквивалентна виртуальному органу [6]. КМ участвует в выполнении ряда важных функций у человека, в том числе таких, как переваривание неперевариваемых компонентов пищи, развитие и стимуляция иммунной системы и желудочно-кишечного тракта хозяина, продукция фармакологически активных сигнальных молекул и короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), синтез витаминов (биотин, фолат), влияние на моторику кишечника, кишечно-печёночный круговорот жирных кислот и метаболизм холестерина [7,8].

Частичные переходные изменения в кишечной экосистеме происходят в течение всей жизни и в некоторых случаях могут привести к нарушению микробного симбиоза с хозяином [9]. Благодаря существенной роли кишечной экосистемы в поддержании нормальной физиологии хозяина, её изменение может вызвать широкий спектр физиологических расстройств, в том числе субклиническое системное воспаление, нарушение обмена веществ, накопление избытка липидов и потерю чувствительности к инсулину, что увеличивает риск развития метаболических заболеваний.

Связь между нарушенным действием инсулина, системным субклиническим воспалением и ожирением

У здоровых людей инсулин способствует поглощению глюкозы в периферических органах, а секреция этого гормона активируется повышением постпрандиальной концентрации глюкозы в плазме. Инсулин позволяет использовать внеклеточную глюкозу в организме, что приводит к увеличению гликолиза и дыхания, но в то же время он даёт возможность и запастись глюкозой и липидами путём стимуляции гликогенеза и липогенеза. Инсулин также уменьшает деградацию и рециркуляцию углеводов и липидов путём ингибирования глюконеогенеза и липолиза [10,11]. Нарушенное действие инсулина в периферических органах приводит к потере чувствительности к инсулину, которая также называется резистентностью к инсулину. Потеря чувствительности к инсулину вызывает гипергликемию натощак и увеличивает печёночный синтез липидов, дислипидемию, гипертензию и накопление жира в жировых тканях. Таким образом, резистентность к инсулину является важным фактором, который инициирует развитие некоторых признаков, ха-

раактерных для метаболического синдрома. Кроме того, длительная резистентность к инсулину приводит к постоянно повышенным уровням системной концентрации глюкозы, что является основной движущей силой развития диабета 2 типа.

Нарушения обмена веществ, характерные для метаболического синдрома (гипергликемия, гипертриглицеридемия, дислипидемия, артериальная гипертензия) связаны также с активацией иммунной системы [12]. Чрезмерное потребление калорий, повышенное накопление жира и липотоксичность активируют выработку эффекторных молекул (цитокинов) и клеток, которые, в первую очередь, включены в реакции врождённого иммунитета [13,14]. Всё это в совокупности способствует развитию системного хронического воспалительного состояния, вызывает рекрутинг и активацию многих зрелых клеток иммунной системы (в том числе тучных клеток, макрофагов и дендритных клеток) в метаболических тканях и особенно – в жировой ткани, а также индуцирует рекрутинг и активацию других клеток, таких как адипоциты, которые изменяют тканевую среду и усиливают воспалительный процесс [15,16]. Cai и его коллеги [14] показали, что активация эффекторных молекул воспаления способствует десенсибилизации инсулиновых сигнальных путей.

Роль кишечной микробиоты в развитии ожирения КМ повышает эффективность извлечения энергии из пищи

Совокупность накопленных данных свидетельствует, что микрофлора кишечника повышает эффективность извлечения энергии из пищи и тем самым увеличивает жировые запасы хозяина. Так, экспериментальные исследования показали, что стерильные мыши имеют на 40% меньше общего жира в организме, чем их обычные сородичи, хотя и потребляют на 29% больше калорий [17]. Свободные от бактерий мыши не только набирают меньше веса, чем обычные мыши, но и устойчивы к диете, способствующей нарушению толерантности к глюкозе и развитию резистентности к инсулину [18]. Кроме того, Vached et al. [19] продемонстрировали, что пересадка кишечной микробиоты от обычных мышей их стерильным собратьям вызывало у

последних 60%-ное увеличение жировой массы тела и инсулиновую резистентность в течение 2-х недель несмотря на снижение потребления корма на 29% и повышенную двигательную активность на 27% по сравнению с контрольными протобионтными мышами. В последующем было показано, что трансплантация микробиоты из кишечника генетически предрасположенных к ожирению (ож/ож) мышей в кишечник их стерильных собратьев приводила и к переносу фенотипа ожирения [17]. Эти данные дают основание полагать, что кишечная микробиота может быть одним из главных факторов, способствующих развитию ожирения.

Потенциальные механизмы, посредством которых КМ повышает эффективность извлечения энергии из пищи

Исследования, выполненные на стерильных и обычных мышах, позволили предположить несколько механизмов, посредством которых КМ способствует формированию положительного энергетического баланса хозяина.

Известно, что полисахариды не перевариваются в проксимальном отделе кишечника человека и грызунов, а, продвигаясь в дистальный отдел кишечника, превращаются с помощью КМ в усваиваемые соединения, такие как сахара или КЦЖК. Эти дополнительные энергетические субстраты используются как колоноцитами, так и хозяином [20]. Роль кишечных бактерий в продукции КЦЖК чётко продемонстрирована в наблюдениях, где стерильные крысы и мыши характеризовались весьма низкими уровнями кишечных КЦЖК с сопутствующим повышением непереваренных углеводов в фекальных выделениях [21]. Другой путь повышения извлечения калорий из рациона – это стимулирование кишечной флорой развития эпителия кишечника хозяина за счёт увеличения плотности мелких капилляров кишечных ворсинок [22].

С производством КЦЖК связан ещё один механизм, посредством которого КМ увеличивает поступление калорий в организм хозяина. Так, КЦЖК являются лигандами для рецепторов, сопряжённых с G-белком (G-protein-coupled receptors, GPCR) таких как GPR41, GPR43 и GPR109A, которые экспрессированы в нейроэндокринных клетках кишечника. Эти специализированные клетки имеют важные эндокринные

функции в кишечнике или поджелудочной железе. При продукции КЦЖК, GPCR стимулируют пептид YY, что замедляет моторику кишечника и тем самым облегчается усвоение питательных веществ. Samuel et al. [23] показали, что GPR41-дефицитные мыши имеют больше мышечной массы и меньше жира, чем их сородичи дикого типа.

Изменённая кишечная флора формирует фенотип ожирения у хозяина и с помощью других механизмов. Один из них связан с подавлением кишечной флорой экспрессии индуцируемого голоданием адипозного фактора (FIAF), который ингибирует липопротеинлипазу в жировой ткани. В результате активируется расщепление триацилглицерин-содержащих липопротеинов на свободные жирные кислоты и последующее отложение триглицеридов в жировой ткани [19]. Кроме того, КМ подавляет высвобождение аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (AMPK), экспрессированной, главным образом, в скелетных мышцах, головном мозге и печени в ответ на метаболический стресс (например, гипоксия, физические упражнения). AMPK-ингибция, вызванная кишечными бактериями, приводит, с одной стороны, к торможению митохондриального окисления жирных кислот, кетогенеза, поглощения глюкозы и секреции инсулина, а с другой – к повышению липогенеза, синтеза холестерина и триглицеридов [23].

Второй механизм, установленный совсем недавно, заключается в том, что усиленное производство ацетата посредством изменённой КМ приводит к активации парасимпатической нервной системы, которая, в свою очередь, способствует увеличению стимулируемой глюкозой секреции инсулина, повышенной секреции грелина, гиперфагии и ожирению [24].

Дисбиоз кишечника как главный фактор, определяющий развитие ожирения и МС

Совокупность перечисленных выше данных, безусловно, является лишь частью доказательной базы, которая косвенно свидетельствует о том, что КМ может играть ключевую роль в развитии ожирения. Для подтверждения данной гипотезы необходимо, как минимум, привести ещё доказательства того, что у пациентов с ожирением имеется дисбаланс КМ, т.е. количественные или качественные нарушения в составе КМ, которые и определяют широкий спектр наблюдаемых при ожирении физиологических расстройств.

В этой связи следует отметить, что исследования в данном направлении, выполненные как на животных моделях, так и на людях, чётко продемонстрировали не только факт наличия сдвигов в составе КМ при ожирении, но и показали, что именно изменения в экологии кишечной микрофлоры являются причиной развития ожирения, а не наоборот.

Так, сравнение состава КМ у тощих мышей и мышей с ожирением (лептин-дефицитных ож/ож мышей, у которых ожирение вызывалось дефицитом лептина, гормона, контролирующего чувство насыщения) показало различия в численности Bacteroidetes и Firmicutes. В частности, отношение Firmicutes/Bacteroidetes, положительно коррелировало с фенотипом ожирения и не зависело от диеты [25]. Turnbaugh et al. [17], сравнив кишечную флору тощих мышей и их сородичей с диетиндуцированным ожирением, также обнаружили у последних увеличение числа Firmicutes, что было связано с диетой, вызывающей ожирение. Однако эти композиционные изменения состава микробиоты полностью восстанавливались после возвращения к нормальной диете. Данное наблюдение дало основание полагать, что диета является основным способствующим фактором изменений микрофлоры кишечника, ассоциированных с ожирением. Приведенные факты были подтверждены впоследствии исследованиями Murphy et al. [26], которые определили увеличение отношения Firmicutes/Bacteroidetes у ож/ож мышей и у мышей, вскармливаемых диетой с высоким содержанием жиров по сравнению с их тощими собратьями. Последняя точка в установлении причинно-следственной связи между кишечной флорой и ожирением была поставлена в недавнем исследовании Ridaura et al. [27]. Осуществив трансплантацию образцов фекалий от дискордантных по ожирению близнецов отдельным группам стерильных мышей, они обнаружили, что мыши, которым пересадили фекальную микробиоту от одного из близнецов с фенотипом ожирения, имели значительно большее увеличение массы тела и количество жировой ткани, чем мыши, колонизированные фекальной микробиотой от другого близнеца с тощим фенотипом.

Исследования на людях также указывают на сдвиги в составе кишечной микробной экосистемы у лиц с ожирением. Так, Turnbaugh et al. [17]

наблюдали различия в микрофлоре дистальной части кишечника у лиц с ожирением по сравнению с худыми индивидами и относительное обилие Bacteroidetes, когда люди теряли вес, находясь на низкокалорийной диете с ограничением либо жиров, либо углеводов. Сниженное Bacteroidetes/Firmicutes отношение, найденное у людей, страдающих ожирением, приводит, как полагают, к более эффективному гидролизу неперевариваемых полисахаридов в просвете кишечника, что может способствовать более значительному, чем у худых особей, извлечению калорий и жира из пищи [19].

В целом эти результаты показывают, что именно сдвиги в составе микрофлоры кишечника, обусловленные характером питания, вызывают развитие ожирения, а не ожирение способствует сдвигам в микробной экосистеме кишечника.

Хроническое субклиническое воспаление (ХСВ): влияние метаболитов дисбиотической и нормобиотической микрофлоры. Влияние метаболитов дисбиотической микрофлоры.

Одним из признаков ожирения и связанной с ожирением патологии является возникновение ХСВ [28], вызванное резким возрастанием в циркуляции уровня липополисахаридов (ЛПС), называемых также эндотоксинами. В норме концентрация ЛПС в циркулирующей крови очень низка и колеблется от 1 до 200 пг/мл [29]. У лиц с ожирением или нарушением толерантности к углеводам уровень циркулирующих эндотоксинов возрастает на 20%, а у больных сахарным диабетом – на 125% по сравнению со здоровыми стройными индивидами [30]. Повышение уровня ЛПС связано с потреблением высокожировой диеты, так как показано, что: 1) жир вызывает гибель грамотрицательных микроорганизмов, способствуя повышенной продукции ЛПС в кишечнике [31]; 2) в ответ на приём пищи с высоким содержанием жира уровень ЛПС в крови возрастает в 2-3 раза [29]. У лиц с ожирением концентрация ЛПС достигает высоких значений, приводя к развитию состояния, называемого метаболической эндотоксемией [32].

ЛПС являются производными наружной клеточной мембраны грамотрицательных бактерий, которые, по предположениям, инициируют процессы, связанные с воспалением, способствуя началу развития ожирения и резистентности к инсулину [32]. При гибели грамотрицательных бактерий ЛПС, являющиеся компонентами их мем-

браны, абсорбируются из кишечника в общую циркуляцию. Возможны два механизма абсорбции: 1) транспорт с помощью хиломикронов; 2) фильтрация через негерметичные межклеточные стыки в эпителиальной выстилке кишечника.

После попадания в системный кровоток, ЛПС инфильтрируют ткани, такие как печень или жировая ткань, вызывая реакции врождённого иммунного ответа [32]. В частности, ЛПС связываются с плазматическим белком (LBP), который активирует белок-рецептор CD14, находящийся в плазматической мембране макрофагов [33]. Генерированный таким образом комплекс связывается с Toll-подобным рецептором 4 (TLR4) на поверхности макрофагов, который вызывает трансдукцию сигналов, активирующих экспрессию таких воспалительных эффекторных молекул как ядерный фактор κB (NF- κB) и активатор протеина 1 (AP-1) [34].

ЛПС регулируют также NOD-подобные рецепторы, присутствующие в макрофагах и дендритные клетки, которые кооперируясь с TLR, индуцируют активность транскрипционного фактора NF- κB . Кроме того, ЛПС участвуют в рекрутировании других эффекторных молекул, таких как нуклеотид-связывающий домен, богатый лейцин-содержащими повторами белок, цитозольный адаптерный белок ASC и каспаза-1. Эти молекулы являются компонентами инфламасомы – белкового олигомера, активирующего врождённую иммунную систему [35].

Было предложено несколько механизмов, связывающих ожирение и метаболическую эндотоксемию. Первый – потребление диеты с высоким содержанием жиров изменяет кишечную флору (жир вызывает гибель грамотрицательных микроорганизмов), что приводит к повышению проницаемости кишечника и системного уровня бактериальных продуктов, в частности ЛПС [32]. Второй механизм – избыточное потребление жиров вызывает увеличение количества хиломикронов в кишечнике в постпрандиальный (после еды) период, что способствует повышению ЛПС-инфильтрации в кровоток [36]. Нарушенный метаболизм липопротеинов у больных сахарным диабетом 2 типа, как было установлено, уменьшает ЛПС-катаболизм и может увеличить эндотоксемию, связанную с воспалением [37].

О важности метаболической эндотоксемии в патофизиологии развития резистентности к

инсулину и ожирения свидетельствуют также данные Shiet et al. [38], в которых установлено, что мыши, лишённые TLR4, защищены от резистентности к инсулину, индуцированной диетой с высоким содержанием жиров. Результаты другого исследования показали, что введение ЛПС генетически идентичным мышам-самцам в течение 4-х недель индуцирует у них увеличение веса, сопоставимое с увеличением веса, которое наблюдается у мышей, потребляющих диету с высоким содержанием жиров [32]. Кроме того, иммуноглобулин СД14-нокаутированные ож/ож мыши, которые не обладают способностью вызывать ЛПС-опосредованные активации воспалительных путей, были устойчивы к увеличению веса и не теряли инсулиновую гиперчувствительность, несмотря на вскармливание той же диетой, которая использовалась и у лептин-дефицитных об/об мышей [39].

Высокие уровни циркулирующего эндотоксина коррелировали также с повышенными концентрациями TNF-альфа и IL-6 в адипоцитах [40], а высокожировая или высокоуглеводная диета активировала экспрессию TLR4, NF-kB и супрессор цитокина (SOC) 3, которые также являются факторами, участвующими в регуляции метаболических путей секреции инсулина [40]. В совокупности эти результаты свидетельствуют о важной роли ЛПС-воспалительных путей в развитии ожирения и связанных с ожирением патологий.

Влияние метаболитов нормобиотической микрофлоры. Другие метаболиты микробного происхождения, полученные, например, из ароматических аминокислот (тирозин, триптофан и фенилаланин), напротив, позитивно влияют на иммунитет хозяина. Так, индол был идентифицирован как один из основных микробных метаболитов [41], полученных из триптофана под действием бактериальной триптофаназы [42]. При поглощении, индол может быть сульфатирован в печени с образованием 3-индоксилсульфата, или может подвергаться дальнейшему метаболизму бактериями, что приводит к производству целого ряда родственных соединений, в том числе индол-3-пирувата, индол-3-лактата и индол-3-ацетата [43]. Эти метаболиты взаимодействуют с процессами, связанными с воспалением в организме человека [44]. В частности, 3-индоксилсульфат активирует арилуглеводородный рецептор (AHR), регулируя транскрипцию ИЛ-6

и нескольких ферментов из P450 суперсемейного комплекса (например, CYP1A1, CYP1A2 и CYP2S1) [45], а индол-3-пропионат активирует прегнан X рецептор (PXR), в результате чего улучшается функция кишечного барьера [44]. Уменьшая проницаемость кишечного барьера, индол-3-пропионат ограничивает транслокацию антигенов и патогенов, а также ЛПС-инфильтрацию в кровоток и, следовательно, способствует уменьшению метаболической эндотоксемии и воспаления у хозяина [46].

Таким образом, дисбиотическая и нормобиотическая микрофлора диаметрально противоположно влияют на метаболизм хозяина, направляя его вектор либо в сторону развития широкого спектра физиологических расстройств (ЛПС-инфильтрация, повышение извлечения калорий из рациона, накопление жира, изменение действия инсулина), либо в сторону, защищающую от их развития (укрепление кишечного барьера, ограничение транслокации антигенов и патогенов в циркуляцию, уменьшение метаболической эндотоксемии и воспаления).

Терапевтический потенциал манипулирования кишечной микробиотой в целях терапии и профилактики ожирения и МС

Оздоровление дисбиотической кишечной микрофлоры представляет перспективный терапевтический подход для контроля потребления энергии и, тем самым, снижения распространённости ожирения и метаболического синдрома. С этой целью могут быть использованы различные средства, в том числе и такие, наиболее изученные, как трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ), пробиотики и пребиотики.

Ранее было показано, что ТФМ является эффективным способом для восстановления нарушенного состава кишечной микробной экосистемы после лечения антибиотиками или в борьбе с кишечной инфекцией *Clostridium difficile* и может быть использована для терапии воспалительных заболеваний кишечника [47]. Использование ТФМ при метаболическом синдроме также дало хорошие результаты. Так, девять мужчин с метаболическим синдромом, которые подверглись ТФМ от здоровых худых индивидов, имели notably более низкие уровни триглицеридов и более выраженную печёночную и периферическую чувствительность к инсулину после трансплан-

тации, чем девять человек, получивших ТФМ из собственного стула [48].

Применение пробиотиков и пребиотиков для улучшения взаимодействия между кишечными микроорганизмами и обменом веществ хозяина при ожирении и других метаболических заболеваниях широко исследовано [49].

Пробиотики – живые микроорганизмы, которые при использовании в качестве пищевых добавок благотворно влияют на организм хозяина путём улучшения кишечного микробного баланса и изменения состава кишечной микрофлоры [50]. Было показано, что конкретные виды бактерий, такие как *Bifidobacterium* SPP., улучшают гомеостаз глюкозы, снижают вес и жировую массу, а также восстанавливают глюкозо-опосредованную секрецию инсулина у мышей, вскармливаемых диетой с высоким содержанием жиров [50].

Пребиотики являются пищевыми ингредиентами, которые благотворно влияют на хозяина, выборочно стимулируя рост и/или активность одного или ограниченного числа бактерий, присутствующих в толстой кишке. Пребиотики состоят из олигосахаридов или короткоцепочечных полисахаридов. Они встречаются в обычных пищевых продуктах, таких как овощи и цельные зёрна злаков, а также могут быть добавлены в йогурт. Наиболее известными пребиотиками являются фруктозил-олигосахариды (ФОС), в том числе инулин (с длинной цепью фруктозильных-олигосахаридов), галактозил-олигосахариды (ГОС) и другие олигосахариды, присутствующие в молоке, которые трансформированы микрофлорой кишечника в КЦЖК и одновременно способствуют размножению избранных симбионтных бактерий в толстой кишке [51]. Например, инулин стимулирует рост бифидобактерий и может уменьшить потребление калорий и жировую массу у животных [51]. Стимуляция пребиотиками роста бифидобактерий коррелирует с повышением толерантности к глюкозе, улучшением секреции инсулина, индуцированного глюкозой и нормализацией воспаления у грызунов [52]. ГОС также модулируют поглощение моносахаридов из кишечника путём изменения активности моносахаридных транспортёров хозяина, которые, в свою очередь, способствуют активации гликолитического пути [53]. Потребление пребиотиков было связано также со снижением уровня липидов в печени, почках и плазме кро-

ви у грызунов [54]. В частности, ГОС-добавки у здоровых мышей снижали уровень печёночных триглицеридов посредством подавления активности липогенных ферментов, синтазы жирных кислот, и микросомальных белков-переносчиков триглицеридов, которые участвуют в синтезе липопротеинов очень низкой плотности [51]. Таким образом, приём внутрь пребиотиков может снизить липогенную активность и увеличить липолитическую активность.

Благотворные эффекты пребиотиков и пробиотиков на противовоспалительные пути, прирост веса, и метаболизм глюкозы у грызунов были в значительной степени связаны с производством КЦЖК [20]. Эти молекулы взаимодействуют с GPCR (например, с GPR41 и GPR43) в иммунных клетках толстой кишки человека и способствуют экспрессии специфических хемокинов в кишечном эпителии [55]. КЦЖК подавляют NF- κ B и влияют на продукцию в лейкоцитах таких провоспалительных маркеров как IL-2 и IL-10 [56]. Другие исследования показали, что воздействие пробиотиков на кишечное здоровье и воспаление также опосредовано секрецией глюкагон-подобных белков (GLP-1 и GLP-2) в энтероэндокринных L-клетках [57]. Cani et al. [46] показали, что вскармливание ож/ож мышей высокоуглеводной диетой с добавлением олигофруктозы увеличивает представительство в КМ бифидо- и лактобактерий, уплотняет межклеточные стыки, в большей степени снижая проницаемость кишечника, системную эндотоксемию и воспаление, чем у ож/ож мышей, которых кормили только одной высокоуглеводной диетой. Эти физиологические изменения коррелировали с GLP-уровнями и исчезали, когда мышей лечили антагонистом GLP-2 [40]. В другом исследовании также указывается, что симбиотическое лечение *Bifidobacterium lactis* B420 в сочетании с полидекстрозой снижает обилие *Porphyromonadaceae* у мышей, вскармливаемых диетой с высоким содержанием жиров [58]. Эта биологически активная добавка, как полагают, ингибирует инфильтрацию клеток тонкого кишечника Т-хелперами 17 (Th17), предотвращая метаболическое воспаление и развитие сахарного диабета 2-го типа.

Исследования по пробиотическим вмешательствам у человека выявили положительное влияние этих подходов на метаболизм глюкозы [59]. Например, в течение 6-недельного рандо-

мизированного плацебо-контролируемого исследования среди 60 здоровых с избыточным весом жителей Индии смесь пробиотика VSL#3 снижала системные уровни глюкозы и инсулина в крови [60]. Тем не менее, антижировая эффективность пребиотиков нуждается в получении дополнительных доказательств, так как результаты многих исследований на людях демонстрируют либо умеренное снижение веса, либо его отсутствие после пребиотических вмешательств [61].

Заключение

Таким образом, свидетельства о значительном вкладе микрофлоры кишечника в развитие ожирения и метаболических заболеваний растут из года в год. Особенно впечатляют результаты исследований по использованию моделей стерильных грызунов, которые позволили установить молекулярные основы взаимодействия между кишечными микробами и физиологией хозяина. Сдвиги в составе КМ у грызунов и человека при использовании диетических факторов, антибиотиков, пробиотиков или пребиотиков, ещё больше убедили нас в управляющей роли кишечной микрофлоры в развитии ожирения и метаболических заболеваний. Однако многие стороны взаимодействия между КМ и хозяином ещё остаются неизученными, а терапевтические подходы к оздоровлению КМ – до конца не разработанными. В этой связи необходимы дальнейшие исследования, которые позволят раскрыть недостающие звенья внутри метаболической оси, связывающей кишечные микробы с хозяином, а также оптимизировать терапевтические стратегии, направленные на оздоровление кишечной микробиоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Overweight & Obesity. [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention Available from: <http://www.cdc.gov/obesity/data/adult.htm>.
2. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. January 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Accessed 2 April 2016.
3. Alberti K.G., Zimmet P., Shaw J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; 366: 1059-1062. doi:10.1016/S0140-6736(05)67402-8.
4. Despres J.P., Lemieux I., Bergeron J., Pibarot P., Mathieu P., Larose E. et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28:1039-1049. doi:10.1161/ATVBAHA.107.159228.
5. Ramezani A., Raj D.S. The Gut Microbiome, Kidney Disease, and Targeted Interventions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 25: 657-670.
6. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006; 312 (5778):1355-1359.
7. Steer T., Carpenter H., Tuohy K., Gibson G.R. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 2000; 13:229-254. doi: 10.1079/095442200108729089.
8. O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006; 7:688-693.
9. Nazli A., Yang P.C., Jury J., Howe K., Watson J.L., Soderholm J.D. et al. Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat. *Am. J. Pathol.* 2004; 164:947-957.
10. Perry R.J., Samuel V.T., Petersen K.F., Shulman G.I. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2014; 510:84-91. doi:10.1038/nature13478.
11. Saltiel A.R., Kahn C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414:799-806. doi:10.1038/414799a.
12. Gregor M.F., Hotamisligil G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011; 29:415-445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
13. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., Poggi M., Knauf C., Bastelica D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56:1761-1772. doi:10.2337/db06-1491.
14. Cai D., Yuan M., Frantz D.F., Melendez P.A., Hansen L., Lee J. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2005; 11:183-190. doi:10.1038/nm1166.
15. Sell H., Habich C., Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8:709-716. doi:10.1038/nrendo.2012.114.
16. Lumeng C.N., Saltiel A.R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.*

2011;121:2111–2117. doi:10.1172/JCI57132.

17. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006; 444:1027-1031. doi:10.1038/nature05414.

18. Piya M.K., McTernan P.G., Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J. Endocrinol*. 2013; 216:11-15. doi:10.1530/JOE-12-0498.

19. Backhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A. et al. The gut microbiota as an environmental factor regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101:15718-15723. doi:10.1073/pnas.0407076101.

20. Gibson G.R., Probert H.M., Loo J.V., Rastall R.A., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 2004; 17:259-275. doi:10.1079/NRR200479.

21. Tremaroli V., Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012; 489: 242-249. doi: 10.1038/nature11552.

22. Musso G., Gambino R., Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu. Rev. Med.* 2011; 62:361-380. doi:10.1146/annurev-med-012510-175505.

23. Samuel B.S., Shaito A., Motoike T., Rey F.E., Backhed F., Manchester J.K. et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein coupled receptor, GPR41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105:16767-16772. doi:10.1073/pnas.0808567105.

24. Perry R.J., Peng L., Barry N.A., Cline G.W., Zhang D., Cardone R.L. et al. Acetate mediate a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*. 2016; 534:213-217. doi: 10.1038/nature18309.

25. Ley R.E., Backhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102:11070-11075. doi:10.1073/pnas.0504978102.

26. Murphy E.F., Cotter P.D., Healy S., Marques T.M., O'Sullivan O., Fouhy F. et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*. 2010; 59:1635-1642. doi:10.1136/gut.2010.215665.

27. Ridaura V.K., Faith J.J., Rey F.E., Cheng J., Duncan A.E., Kau A.L. et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013; 341:1241214. doi:10.1126/science.1241214.

28. Gregor M.F., Hotamisligil G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011; 29:415-445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322.

29. Erridge C., Attina T., Spickett C.M., Webb D.J. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 86:1286-1292.

30. Harte A.L., Varma M.C., Tripathi G., McGee K.C., Al-Daghri N.M., Al-Attas O.S. et al. High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2012; 35:375-382. doi:10.2337/dc11-1593.

31. Neal M.D., Leapheart C., Levy R., Prince J., Billiar T.R., Watkins S. et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J. Immunol.* 2006; 176: 3070-3079.

32. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., Poggi M., Knauf C., Bastelica D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56:1761-1762. doi:10.2337/db06-1491.

33. Neal M.D., Leafart C., Levy R., Prince J., Billiar T.R., Watkins S. et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J. Immunol.* 2006; 176:3070-3079.

34. Vijay-Kumar M., Aitken J.D., Carvalho F.A., Cullender T.C., Mwangi S., Srinivasan S. et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010; 328:228-231. doi:10.1126/science.1179721.

35. Tanty J.F., Ceppo F., Jager J., Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2012; 3:181. doi:10.3389/fendo.2012.00181.

36. Ghoshal S., Witta J., Zhong J., de Villiers W., Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lip. Res.* 2009; 50:90-97. doi:10.1194/jlr.M800156-JLR200.

37. Verges B., Duvillard L., Lagrost L., Vachoux C., Garret C., Bouyer K. et al. Changes in lipoprotein kinetics associated with type 2 diabetes

affect the distribution of lipopolysaccharides among lipoproteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99:E1245-E1253. doi:10.1210/jc.2013-3463.

38. Shi H., Kokoeva M.V., Inouye K., Tzamelis I., Yin H., Flier J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006; 116:3015-3025. doi:10.1172/JCI28898.

39. Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57:1470-1481. doi:10.2337/db07-1403.

40. Ghanim H., Abuaysheh S., Sia C.L., Korzeniewski K., Chaudhuri A., Fernandez-Real J.M. et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care* 2009; 32:2281-2287. doi:10.2337/dc09-0979.

41. Russel W.R., Hoyle L., Flint H.J., Dumas M.E. Colonic bacterial metabolites and human health. *Curr. Opin. Microbiol.* 2013; 16:246-254. doi:10.1016/j.mib.2013.07.002.

42. DeMoss R.D., Moser K. Tryptophanase in diverse bacterial species. *J. Bacteriol.* 1969; 98:167-171.

43. Russel W.R., Duncan S.H., Scobbie L., Duncan G., Cantlay L., Calder A.G. et al. Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013; 57:523-535. doi:10.1002/mnfr.201200594.

44. Venkatesh M., Mukherjee S., Wang H., Li H., Sun K., Benechet A.P. et al. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity*. 2014; 41:296-310. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.014.

45. Ramadoss P., Marcus C., Perdew G.H. Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2005; 1: 9-21. doi:10.1517/17425255.1.1.9.

46. Cani P.D., Ostro M., Geurts L., Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 2012; 3:279-288. doi:10.4161/gmic.19625.

47. Colman R.J., Rubin D.T. Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel

disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Crohn's Colitis*. 2014; 8:1569-1581. doi:10.1016/j.crohns.2014.08.006.

48. Vrieze A., Van Nood E., Holleman F., Salojarvi J., Kootte R.S., Bartelsman J.F. et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012; 143: 913-916. doi:10.1053/j.gastro.2012.06.031.

49. Kobayashi N., Conte C., Cammarota G., Haley A.P., Styriak I., Gaspar L. et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2016; 13:14. doi:10.1186/s12986-016-0067-0.

50. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 11:506-514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.

51. Delzenne N.M., Kok N. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73 (2 Suppl):456S-458S.

52. Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F., Knauf C., Burcelin R.G., Tuohy K.M. et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007; 50:2374-2383. doi:10.1007/s00125-007-0791-0.

53. van Hoffen E., Ruiter B., Faber J., M'Rabet L., Knol E.F., Stahl B. et al. A specific mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy. *Allergy*. 2009; 64:484-487. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01765.x.

54. Cani P.D., Knauf C., Iglesias M.A., Drucker D.J., Delzenne N.M., Burcelin R. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*. 2006; 55: 1484-1490.

55. Tazoe H., Otomo Y., Karaki S., Kato I., Fukami Y., Terasaki M. et al. Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed. Res.* 2009; 30:149-156.

56. Zhou J., Hegsted M., McCutcheon K.L., Keenan M.J., Xi X., Raggio A.M. et al. Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; 14: 683-689. doi:10.1038/oby.2006.77.

57. Delzenne N.M., Cani P.D., Neyrinck A.M. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. J. Nutr. 2007; 137(11 Suppl): 2547S–2551S.

58. Garidou L., Pomie C., Klopp P., Waget A., Charpentier J., Aloulou M. et al. The gut microbiota regulates intestinal CD4 T cells expressing ROR gamma and controls metabolic disease. Cell Metab. 2015; 22: 100–112. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.001.

59. Ivey K.L., Hodgson J.M., Kerr D.A., Lewis J.R., Thompson P.L., Prince R.L. The effects of probiotic bacteria on glycaemic control in overweight men and women: a randomised controlled trial. Eur J. Clin. Nutr. 2014; 68:447–452. doi:10.1038/ejcn.2013.294.

60. Rajkumar H., Mahmood N., Kumar M., Varikuti S.R., Challa H.R., Myakala S.P. Effect of probiotic (VSL#3) and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: a randomized, controlled trial. Mediators Inflamm. 2014; 2014: 348959. doi:10.1155/2014/348959.

61. Sanchez M., Darimont C., Drapeau V., Emady-Azar S., Lepage M., Rezzonico E. et al. Effect of Lactobacillus rhamnosus CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. Br. J. Nutr. 2014; 111: 1507–1519. doi:10.1017/S0007114513003875.

Статья поступила 04.08.2016

Для корреспонденции:

Муркамилов Илхом Торбекович

Адрес: 720040, г. Бишкек, ул. Тоголок-Молдо, 3.

Тел. +9(9655)7221983,

E-mail: murkamilov.i@mail.ru

For correspondence:

Murkamilov Ilkhom

Address: 3, Togolok-Moldo st., Bishkek

720040, Kyrgyz Republic.

Тел. +9(9655)7221983,

E-mail: murkamilov.i@mail.ru

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ЭНДОВАСКУЛЯРНЫХ СТЕНТОВ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМЫ РЕСТЕНОЗОВ (ОБЗОР, 2 ЧАСТЬ)

А. И. ЛОТКОВ ^{1,3}, В. Г. МАТВЕЕВА ², Л. В. АНТОНОВА ², О. А. КАШИН ¹,
А. Н. КУДРЯШОВ ⁴

¹*Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия*

²*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия*

³*Томский государственный университет, Томск, Россия*

⁴*ООО «Ангиолайн», Новосибирск, Россия*

модификации эндоваскулярных стентов

Резюме. Вторая часть обзора посвящена вариантам модификации металлических стентов для ускорения эндотелизации *in situ*. Представлены разработки, направленные на захват эндотелиальных прогениторных клеток из кровотока с помощью специфических антител. Описаны возможности улучшения адгезии и интеграции эндотелиальных клеток на поверхности за счет формирования сайтов клеточного распознавания и имитация структур внеклеточного матрикса. Проанализированы различные способы физической и химической модификации, способствующие созданию условий для скорейшего формирования функционально состоятельного эндотелиального слоя на искусственных поверхностях. Определен круг проблем и ограничений в использовании каждого из методов.

Ключевые слова: металлические стенты, рестеноз, модификация поверхности, эндотелизация.

SURFACE MODIFICATION OF BARE-METAL STENTS FOR PREVENTING RESTENOSIS (PART 2)

A. I. LOTKOV ^{1,3}, V. G. MATVEEVA ², L. V. ANTONOVA ², O. A. KASHIN ¹,
A. N. KUDRYASHOV ⁴

¹*Institute of Strength Physics and Materials Science of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*

²*Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia*

³*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

⁴*LLC «Angiolyayn», Novosibirsk, Russia*

endovascular stents modification

Here we review the modifications of the metal stents to enhance *in situ* endothelialization, particularly antibody-mediated adhesion of endothelial progenitor cells. We focus on the strategies employing cell adhesion molecules and extracellular matrix proteins. We also encompass other physical and chemical approaches for surface biofunctionalization with their advantages and shortcomings.

Keywords: bare-metal stents, restenosis, surface modification, endothelialization

В предыдущей части были рассмотрены варианты антипролиферативных и антитромботических покрытий, связанных с нанесением лекарственных веществ на поверхность металла, а также ее эндотелизации *in vitro*. Эндотелизация стентов *in situ* не имеет ряда недостатков, характерных для предыдущих направлений, представляет собой наиболее приемлемый вариант для

экстренных сосудистых вмешательств и вызывает активный коммерческий интерес, поскольку такие стенты всегда готовы к использованию и не требуют проведения культуральных работ. В данном случае успешность процедуры имплантации напрямую связана со скоростью эндотелизации поверхности, и все методы модификации связаны с ускорением этого процесса.

Эндотелизация поверхности материала *in situ*

Индукция эндотелизации *in situ* может осуществляться несколькими способами:

- а) захват эндотелиальных прогениторных клеток из кровотока посредством поверхностной модификации материала с помощью специфических антител;
- в) имитация структур внеклеточного матрикса на поверхности металлических материалов;
- с) создание условий, способствующих скорейшему формированию функционально состоятельного эндотелиального слоя на искусственных поверхностях с использованием физической, химической модификации.

Эндотелизация *in situ* с помощью захвата эндотелиальных прогениторных клеток (EPCs)

Перспективным направлением в эндотелизации сосудистых стентов является захват из крови циркулирующих EPCs для ускорения эндотелиализации аутологичными клетками. Успех во многом зависит от правильного выбора иммобилизованных на поверхности материала молекул для захвата EPCs, которые должны обладать высокой специфичностью. Неспецифическое связывание с другими типами клеток или белками плазмы будет конкурировать за сайты связывания с EPCs, что в конечном итоге приведет к задержке эндотелизации [1].

В настоящее время для захвата из кровотока циркулирующих EPCs на поверхность стента с помощью спейсера (прокладки) иммобилизуют различные виды молекул, в том числе моноклональные антитела CD34, KDR/Flk-1 и CD133 [2-4]. Показано, что иммобилизация на внутренней поверхности имплантата CD34 антител заметно усиливает захват из кровотока EPCs. Так, на стентах из нержавеющей стали с иммобилизованными CD34- антителами полная эндотелизация наступала через 48 часов после имплантации, при этом значительно ингибировалась гиперплазия неоинтимы [2]. Однако в более длительном периоде наблюдения получены менее обнадеживающие результаты [5] ввиду формирования гиперплазии неоинтимы. Возможной причиной такой неудачи может являться неспецифическое связывание спейсера (прокладки) с белками плазмы. Использование полиэтилен-

гликоля в качестве спейсера при поверхностной иммобилизации биомолекул с целью снижения неспецифического взаимодействия дало положительные результаты. Был разработан метод ковалентного связывания полиэтиленгликоля с поверхностью титана и последующей иммобилизацией CD34 на поверхности [6]. Такая модификация поверхности способствовала адгезии EPCs и подавляла адгезию гладкомышечных клеток.

Способ иммобилизации CD34-антител на поверхности материала оказывает влияние на их биоактивность. Иммобилизованные антитела могут располагаться на поверхности материала либо случайным образом, либо иметь определенную пространственную ориентацию. Большинство иммобилизованных случайным образом антител, как правило, теряют свою активность и денатурируются [7, 8]. Причина данного феномена заключается в том, что возникают стерические препятствия для связывания рецепторов клеток с неправильно ориентированными на поверхности материала антителами, а также создаются помехи от смежно иммобилизованных антител. Поэтому для повышения биологической активности иммобилизованные антитела должны быть ориентированы таким образом, чтобы их антиген-связывающие участки направлялись в сторону просвета сосуда [8]. Li и коллегами выполнена иммобилизация CD34- антител к поверхности титана с помощью системы авидин-биотин и дополнительной адсорбцией протеина-A, имеющего пространственно ориентированный Fab-фрагмент для связывания Fc-фрагмента анти-CD34 антител [9]. Данный способ иммобилизации антител способствовал хорошей адгезии EPC *in vitro*, а также почти полной эндотелизации поверхности через 2 часа после имплантации стентов животным.

Негативный момент использования CD34 для захвата EPCs из кровотока связан с тем, что этот рецептор не является специфичным для EPCs и представлен на поверхности ряда клеток-предшественников, в том числе гладкомышечных [10]. Упомянулось, что гладкомышечные клетки – главные участники процесса гиперплазии неоинтимы [11], поэтому неселективное связывание CD34 может являться основным фактором, способствующим одновременному захвату из крови предшественников гладкомышечных клеток и формированию рестеноза.

CD133 – более специфичный маркер, характеризующий зрелый фенотипа EPC [12]. Работа Хуе Ву с соавторами демонстрирует, что иммобилизация на стентах из нержавеющей стали анти-CD34 и анти-CD133 антител в условиях *in vivo* дает различные результаты [4]. На стентах, покрытых анти-CD133, происходила более ранняя адгезия эндотелиальных клеток и более эффективное ингибирование рестеноза в отдаленные сроки имплантации (12 недель) по сравнению со стентами с анти-CD34 антителами [4].

Для повышения селективности связывания EPCs и снижения гиперплазии неоинтимы предлагается использовать рецептор KDR/Flk-1 (kinase insert domain receptor/fetal liver kinase-1), который экспрессируется на клетках с эндотелиальным потенциалом [13, 14]. В экспериментах *in vitro* показано, что иммобилизованные на твердой поверхности (стекло) рекомбинантные анти-KDR антитела позволяют с высокой селективностью связываться с KDR⁺ клетками. При этом пространственно ориентированные антитела демонстрируют значительно более эффективный захват клеток по сравнению с хаотично ориентированными [3]. Данный подход находится в стадии разработки, и в настоящее время отсутствие исследований *in vivo* не позволяет сделать однозначные выводы о его преимуществах. Кроме того, низкое содержание в периферической крови KDR⁺ клеток и их неоднородность также вызывают вопросы. Известно, что в периферической крови только 1% CD34⁺ клеток экспрессируют KDR рецептор, при этом только часть KDR⁺ клеток экспрессирует CD34⁺ [13, 15].

Неоднородность популяции EPCs значительно затрудняет выбор специфического маркера. Первоначально термин EPCs был предложен для обозначения циркулирующих в крови клеток костно-мозгового происхождения, обладающих способностью дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки [16]. В настоящее время предложено два метода идентификации EPCs, которые стали универсальными:

1) с помощью специфических поверхностных маркеров,

2) идентификация клеток, которые дифференцируются в зрелые ECs при специфических условиях культивирования.

По функциональным и фенотипическим признакам EPCs можно разделить на ранние и поздние. Ранние EPCs экспрессируют на своей

поверхности CD14, CD45, CD34, CD133 и рецептор к VEGF (VEGFR). Поздние EPCs имеют все характеристики эндотелиальных клеток, экспрессируют CD34 и VEGFR, но на их поверхности не представлены рецепторы CD14, CD45 и CD133 [15, 17-20]. Эти два типа клеток обладают различным пролиферативным потенциалом. Для ранних EPCs характерна низкая пролиферативная активность, тогда как поздние EPCs способны к быстрому делению [21]. Ранние EPCs являются основными участниками репарации сосудистой стенки в случаях незначительных сосудистых повреждений [21]. Эти клетки способны усилить ангиогенез путем секреции проангиогенных цитокинов и, таким образом, обеспечить выживание резидентных эндотелиальных клеток и пролиферацию поздних EPCs. Поздние EPCs с высокой пролиферативной активностью, напротив, играют решающую роль в репарации обширных сосудистых повреждений [22]. Ввиду столь выраженных различий в функциональных и фенотипических характеристиках различных видов EPCs успех быстрой эндотелизации сосудистых имплантатов с помощью привлечения EPCs из кровотока напрямую зависит от понимания биологии этих клеток.

В отличие от ранних EPCs, поздние EPCs напрямую дифференцируются в эндотелиальные клетки и никогда не дифференцируются в гладкомышечные клетки, что дает основания для активного поиска новых методов с использованием аптамеров, полученных от поздних EPCs [1]. Аптамер представляет собой короткую олигонуклеотидную последовательность, которая связывается с соответствующими лигандами с высоким сродством и специфичностью [23]. Аптамеры могут специфически связываться с пептидами, белками, лекарственными препаратами, органическими и неорганическими молекулами и даже целыми клетками [24-27]. С помощью технологии систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) получены аптамеры с высоким сродством к EPCs, которые после иммобилизации на полимерных дисках в экспериментах *in vitro* продемонстрировали эффективный захват EPCs, дифференцирующиеся в эндотелий-подобные клетки в течение 10 дней [28]. Однако эндотелиальные предшественники *in vitro* обладают различными паттернами экспрессии на клеточной поверх-

ности по сравнению с подобными клетками *in vivo*, что усложняет работу, поскольку аптамеры должны иметь нуклеотидную последовательность, идентичную паттернам поверхностных рецепторов клеток интереса [1]. Кроме того, *in vivo* аптамеры под действием ДНК-эндонуклеазы подвергаются деградации и быстро теряют свою активность [29]. Поэтому использование данной технологии находится в стадии изучения и еще далеко от клинического использования. Крайне низкое содержание поздних EPCs в циркулирующей крови ограничивает использование методов их связывания на поверхности имплантатов [19].

Таким образом, циркулирующие EPCs с высокой пролиферативной активностью являются идеальным источником аутологических клеток для эндотелизации сосудистых имплантатов *in vivo*. Большие перспективы использования специфических моноклональных антител в ускорении эндотелизации сосудистых стентов осложняются различными техническими проблемами, а также опасностью применения антител в силу недостаточности имеющихся знаний биологии EPCs. Использование факторов роста и агрессивных антипролиферативных препаратов в DES вызывает ряд осложнений, связанных с плеотропностью действия данных веществ. Поэтому исследования, направленные на ускорение эндотелизации без использования агрессивных биологически активных молекул, вызывают особый интерес. Одним из таких направлений является имитация структур внеклеточного матрикса на поверхности металлических материалов.

Имитация структур внеклеточного матрикса на поверхности металлических материалов

Исследования показали, что большинство металлических материалов не поддерживают клеточный рост в связи с отсутствием биораспознавания и специфического взаимодействия [30, 31]. Эндотелиальные клетки, культивируемые на нативном металле, меняют свой нормальный фенотип, снижают свои антитромботические свойства, что создает предпосылки для формирования тромбоза [31]. Эффективным методом, способствующим интеграции и адгезии клеток на металлических конструкциях, является использование на поверхности материала иммобилизирующих субстанций, таких как белки

внеклеточного матрикса или интегрин-связывающих сайтов, которые будут являться посредниками адгезии и миграции ECs.

Внеклеточный матрикс (ВМ), окружающий зрелые EC, составляют два различных компартмента – базальная мембрана и интерстициальный матрикс. Базальная мембрана состоит из сети молекул, включающих коллаген IV типа, ламинин, гепарансульфат и протеогликан, в то время как типичными компонентами интерстициального матрикса являются фибриллярные коллагены и гликопротеины (фибронектин и витронектин). Многочисленные исследования были проведены с иммобилизацией адгезивных молекул, имитирующих ВМ, например, фибронектин, коллаген и ламинин [32-35]. Однако эти молекулы усиливали адгезию не только эндотелиальных клеток, но и тромбоцитов, а также стимулировали пролиферацию гладкомышечных клеток [36, 37]. Кроме того, оголенные белки ВМ активируют XII фактор и запускают каскад внутренней системы свертывания крови. С целью создания условий хорошей адгезии клеток и одновременного снижения прокоагулянтной активности проводится совместная иммобилизация белков ВМ и антикоагулянта гепарина.

Существует проблема снижения активности иммобилизованных на поверхности белков вследствие конформационных изменений и потери пространственной структуры [29]. В естественных условиях благодаря электростатическому взаимодействию белки образуют супрамолекулярные структуры, позволяющие поддерживать или сохранять конформацию «ключ-замок». Предложена методика, объединяющая электростатическое взаимодействие и ковалентную иммобилизацию, для того чтобы сформировать пленки гепарина и фибронектина (Hep/Fn) на аminosилизированной поверхности Ti [38]. В этом методе гепарин и фибронектин сначала смешивались для образования супрамолекулярного комплекса, дальнейшую ковалентную иммобилизацию комплекса проводили на основе силана. Первоначальные исследования такой совместной иммобилизации показали сохранение активности как гепарина (связывание с антитромбином-III), так и фибронектина. Помимо этого, пленки Hep/Fn сохраняли биоактивность после пребывания в фосфатно-солевом буфере течение 5 дней. Однако необходимы дальнейшие, более длительные исследования адгезии тромбоцитов

и гемосовместимости таких покрытий.

Альтернативным вариантом создания супрамолекулярной пленки коллагена и гепарина на поверхности Ti является метод самоорганизующегося монослоя SAMs. Chen J и коллеги инициировали образование коллаген/гепаринового покрытия путем осаждения слоя поли-L-лизина на поверхности предварительно обработанного раствором NaOH отрицательно заряженного титана [39]. Затем с помощью электростатического взаимодействия отрицательно заряженного гепарина и положительно заряженного коллагена формировалась многослойная пленка. В результате коллаген проникал в слой гепарина и являлся преобладающим на поверхности Ti, что создавало условия для прикрепления и пролиферации EPC и снижения адгезии тромбоцитов. Через 3 суток культивирования EPCs на поверхности титана, покрытого коллаген/гепариновой пленкой, формировался монослой клеток, чего не наблюдалось в контрольных образцах без покрытия. Результаты исследования свидетельствуют о том, что создание на поверхности титана коллаген/гепариновой пленки способствует поддержанию жизнеспособности EPCs и повышает гемосовместимость [39].

Недостатком имитации внеклеточного матрикса является его упрощенный состав, который не обладает всеми свойствами естественного матрикса. Кроме того, искусственно сформированный слой внеклеточного матрикса является достаточно нежной структурой, которая может повреждаться и отслаиваться от поверхности при имплантации стента [40].

В структуре большинства белков внеклеточного матрикса (ECM) (фибронектина, витронектина, фибриногена, фактор фон Виллебранда, коллагена, ламинина, остеопонтина, тенасцина и костного сиалопротеина) присутствуют RGD-пептиды, содержащие в себе последовательность Аргинин – Глицин – Аспарагиновая кислота. Данная последовательность определяет адгезионные свойства белков и представляет собой сайты для связывания с интегриновыми рецепторами клеток. В эксперименте *in vitro* показано, что биомиметическое покрытие поверхности титана RGD-пептидами улучшает адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток аорты человека [41]. Пространственная конфигурация иммобилизованных RGD-пептидов оказывает существенное влияние на эффективность адгезии

эндотелиальных клеток. При этом циклическая форма олигонуклеотида более благоприятна по сравнению с линейной, поскольку более полно имитирует конформацию нативного лиганда [41]. Экспериментальные данные *in vivo* подтверждают положительный эффект использования циклической формы RGD-пептидов для покрытия сосудистых стентов. Результаты длительной имплантации (12 недель) в коронарную артерию стентов, имеющих полимерное покрытие с иммобилизованными циклическими RGD-пептидами, показывают, что толщина сформированной неоинтимы и площадь стеноза достоверно ниже, а площадь эндотелизации выше по сравнению с аналогичными полимерными и металлическими стентами без обработки [42]. Таким образом, биофункционализация поверхности металлических стентов с помощью RGD-пептидов является перспективным направлением, позволяющим уменьшить процессы гиперплазии неоинтимы и ускорить эндотелизацию.

Повышение биосовместимости металлических поверхностей с помощью физической и химической модификации

За последние несколько десятилетий сделаны большие успехи в разработке биоматериалов, позволяющих достигать специфического клеточного ответа на молекулярном уровне [43]. Поколение биоматериалов, которые также называют биоматериалами третьего поколения, позволяют формировать прямые клеточные ответы в предсказуемом формате путем регулирования характеристик материала [43-45]. Известно, что большинство основных поверхностных свойств биоматериалов, в том числе химический состав, рельеф поверхности, смачиваемость, оказывают влияние на клеточные ответы [46, 47].

Различные плазменные покрытия, в том числе алмазоподобное карбоновое, углеродное, фторуглеродное, покрытие кристаллическим и аморфным оксидом титана, плазменными полимерными пленками способны улучшить механические и биологические свойства поверхности биоматериалов [48, 49]. Показана эффективность использования низкотемпературного метода радиочастотного магнетронного распыления для создания плазменного покрытия на поверхностях из NiTi с целью регулирования гидрофильных свойств, повышения клеточной адгезии и

улучшения биосовместимости [50, 51]. Важным преимуществом модификации поверхности методом плазменно-иммерсионной ионной имплантации и осаждения металлов (PPI&D) по сравнению с другими методами (механической, физической, химической) является способность избирательного изменения свойств поверхности в районе несколько сотен нанометров, в то время как характеристики основной площади материала остаются неизменными [52, 53]. Использование различных ионов в методе PPI&D позволяет регулировать свойства поверхности для создания благоприятных условий интеграции с теми или иными видами клеток.

В литературе имеются редкие разрозненные данные, касающиеся изучения влияния поверхностных характеристик металла на адгезионные, миграционные и пролиферативные свойства эндотелиальных клеток. Ранее упоминалось о неоднородности EPCs, функциональных и фенотипических различиях прогениторных и зрелых эндотелиальных клеток. Немногочисленные исследовательские работы проведены на разных типах клеток (EPC, HUVEC, EA.hy 926) [54-56], поэтому результаты не поддаются сравнению. Однако, при всех равных условиях, физические свойства поверхности металла, такие как гидрофильность и шероховатость, оказывают большее влияние на адгезию и функциональные характеристики культивируемых на поверхности металла эндотелиальных клеток [54]. Показано, что одни и те же поверхностные характеристики металла (рельеф поверхности, смачиваемость) по-разному влияют на функциональные свойства различных типов эндотелиальных клеток.

Работа Shen Y. и соавторов посвящена влиянию гидрофобных/гидрофильных свойств поверхности на адгезию и миграцию ECs [56]. С помощью плазменного нанопокртия SiOx:H, позволяющего хорошо контролировать уровень смачиваемости, выполнена обработка металлической поверхности образцов (краевой угол смачивания составил диапазон от 98.5+2.38° до 26.3+4.08°). В качестве ECs использовали культуру EA.hy926, являющуюся гибридомой HUVEC и клеток карциномы легкого человека. EA.hy926 лучше адгезировались к гидрофильной поверхности (краевой угол смачивания 29,3+2,58° и 26,3+4,08°), в то же время миграция происходила активнее на гидрофобной (краевой угол 82,3+3,58°). Это позволило сделать важный

вывод о том, что сильная адгезия клеток к подложке удерживает клетки от дальнейшей миграции.

В других работах было проведено сравнительное изучение комбинированного влияния структуры (гладкая и шероховатая) и гидрофильных свойств поверхности титана на адгезионные и пролиферативные свойства зрелых эндотелиальных клеток HUVEC и прогениторных эндотелиальных клеток *in vitro* [54, 55]. На гладких поверхностях клетки HUVEC быстро формировали большое количество кластеров и хорошо мигрировали, при этом наиболее раннее формирование кластеров происходило на гладкой и гидрофильной поверхности. На шероховатых поверхностях клетки имели округлую форму, медленно мигрировали и редко образовывали кластеры [55]. Результаты свидетельствуют об ингибирующем эффекте грубой шероховатой топографии поверхности на активность и силу межклеточных контактов HUVEC. Считается, что сформированные межклеточные контакты могут служить индикатором биосовместимости имплантата [57, 58], в то время как формирование клеточных кластеров является функциональным показателем межклеточных и молекулярных взаимодействий [55]. Поэтому грубая шероховатая поверхность имплантатов будет иметь более низкую биосовместимость по сравнению с гладкой.

Ziebart с коллегами показали, что поведение EPCs на поверхностях титана с различной степенью шероховатости и смачиваемости имеет свои особенности [54]. Подобно зрелым эндотелиальным клеткам пролиферация EPCs выше на гладкой поверхности по сравнению с шероховатой. Однако, при всех равных условиях, количество EPCs, прикрепившихся к гидрофобной поверхности, оказалось больше. Данные противоречат результатам исследований, полученным на культуре зрелых эндотелиальных клеток HUVEC [55] и гибридоме EA.hy 926 [56], которые лучше адгезировались на гидрофильной поверхности, и демонстрируют различные предпочтения клеток одной линии, но различной степени зрелости. Морфологический анализ показал, что грубые поверхности титана способствовали образованию у клеток псевдоподий, тогда как на гладких поверхностях EPC псевдоподий не формировали. Кроме того, различные поверхности оказывали существенное влияние на фенотип EPC. На гладкой поверхности формировался более диффе-

ренцированный фенотип с высокой экспрессией eNOS/iNOS и постоянной стабильной скоростью пролиферации. Грубые титановые поверхности способствовали формированию недифференцированного фенотипа с низким уровнем пролиферации и экспрессии eNOS/iNOS [59].

Проведен сравнительный анализ уровня пролиферации и скорости миграции сосудистых ECs человека и гладкомышечных клеток на аморфных и кристаллических поверхностях тонких пленок из NiTi [60]. Кристаллические поверхности способствовали лучшей миграционной активности гладкомышечных клеток и ECs по сравнению с аморфным состоянием. При этом уровень пролиферации ECs был выше, а скорость миграции ниже, чем у гладкомышечных клеток.

Современные технические возможности позволяют изменять рельеф поверхности на наноразмерном уровне. Представляется перспективным подход, связанный с созданием наноразмерной конфигурации поверхности металлического стента, имитирующей естественную структуру здоровой стенки сосуда. Choudhary S. и соавторы показали, что на металлической поверхности со случайным наноструктурным рисунком адгезируется большее количество эндотелиальных клеток [61].

Учитывая, что в структуре сосудистой стенки ЕС имеют правильную пространственную ориентацию и удлиненную форму, было выполнено создание рельефа поверхности с помощью параллельных дорожек. Проведено изучение адгезии, пролиферации и морфологии ЕС на узорчатой титановой поверхности с параллельными дорожками шириной от 750 нм до 100 мкм и таким же расстоянием между ними [62]. На этих поверхностях ECs адгезировались в углублениях дорожек и имели правильную вытянутую форму и ориентацию. Кроме того, уменьшение размеров рисунка до нанометрового размера улучшало адгезию, увеличивало скорость пролиферации и приводило к формированию более правильной пространственной ориентации эндотелиальных клеток.

Схожие результаты получены на поверхностях из NiTi, имеющих параллельные микродорожки размером 1, 3, 15 и 22 мкм. Формирование микродорожек позволило повысить скорость миграции эндотелиальных клеток на 64,6% по сравнению с гладкой поверхностью [63].

Стальные поверхности (сталь 316L) продемонстрировали примерно двукратное усиление миграционной активности эндотелиальных клеток при формировании микродорожек шириной 7, 10, 15 и 20 мкм. Через неделю инкубации обработанные поверхности были эндотелизированы на 69%, в то время как эндотелизация на контрольных образцах составила 36%. При этом поверхности с микродорожками шириной 15 мкм демонстрировали лучшие показатели [64]. С учетом этих положительных результатов в дальнейших экспериментах *in vivo* для обработки стентов из стали 316L использовали дорожки шириной 15 мкм. Это позволило увеличить скорость миграции ECs аорты человека *in vitro* примерно в 2 раза по сравнению с гладкими поверхностями [65]. Кроме того, мигрирующие на рифленой поверхности ECs артерий имели лучшие функциональные показатели (высокие темпы пролиферации и синтеза NO, низкие уровни апоптоза) по сравнению с клетками на гладких поверхностях и поддерживали противовоспалительный фенотип (низкая VCAM-1 и TNF- α). После имплантации стентов в коронарную артерию свиней выявлено, что через 3 дня имплантации эндотелизация обработанных стентов составила 81,3%, тогда как гладкие поверхности стентов оставались эндотелизированными только на 67,5%. При этом увеличение скорости восстановления интактного эндотелия на рифленых поверхностях стентов *in vivo* ассоциировалось со снижением гиперплазии неоинтимы [65].

Исследуются различные формы наноструктурного рельефа поверхности (островки, ямки, столбики), в том числе без определенной геометрической формы. В настоящее время активно изучается влияние наноразмерной шероховатости поверхности металлов на поведение различных видов клеток, в том числе – эндотелиальных. Формирование мелкозернистой (<60 мкм) и грубозернистой (<100 мкм) наноразмерной шероховатости на поверхности никелида титана показало, что адгезия и пролиферация эндотелиальных клеток аорты крысы выше на мелкозернистой поверхности (по сравнению с крупнозернистым рельефом и контрольными образцами) [66]. В таблице 1 представлены сводные данные по влиянию топографии металлической поверхности на адгезию, ориентацию и пролиферацию ECs.

Таблица 1.

**Влияние топографии металлической поверхности на адгезию, ориентацию и пролиферацию
эндотелиальных клеток**

Особенности геометрии поверхности	Характеристики размеров	Техника изготовления	Материал	Ответ эндотелиальных клеток	Лучшие результаты
Дорожки	Ш: 1, 3, 15, 22 мкм [63]		Ni-Ti	Правильная ориентация, удлиненная форма и усиление миграции	1 мкм
	Ш: 750 нм-100 мкм; Г: 750 нм; Р: 750 нм, 2, 5, 75 и 100 мкм [62]	Сухое травление на плазменной основе	Ti	Усиление клеточной адгезии, удлиненная форма	750 нм
	Ш: 7, 10, 15 и 20 мкм [64, 65]	Химическое травление	SS 316L	Усиление миграции и эндотелизации поверхности	15 мкм
Шероховатость	Мелкозернистая (<60 мкм) и грубозернистая (<100 мкм) наноразмерная шероховатость [66]	Порошковая металлургия, компактный гидравлический пресс	Ni-Ti	Усиление клеточной адгезии и пролиферации на мелкозернистой поверхности	<60 мкм
	Наноразмерная Ti 11,9±2.2 нм CoCrMo 14,1±2,5 нм по сравнению с необработанной поверхностью [67]	Порошковая металлургия, компактный гидравлический пресс	Ti, CoCrMo	Усиление клеточной адгезии и распластывания	Наноструктурированная
	Наноразмерная и по сравнению с необработанной поверхностью [68]		Ti	Усиление эндотелизации	Наноразмерная
	Субмикронная (>100 нм) и нанометровая (<100 нм) [69]	Электронный лучевой испаритель	Ti	Усиление клеточной адгезии	Нанометровая более эффективна
	Нанотрубки TiO ₂ [70]	Анодное окисление	Ti	Усиление клеточной адгезии	Нанотрубки

В работе Shen Y. и коллег проведена сравнительная оценка влияния различных видов микроструктурированной поверхности NiTi (гладкая, микродорожки, микропоры, сочетание микродорожек и микропор) на скорость и качество эндотелизации поверхности *in vitro* [71]. В эксперименте использовали зрелые эндотелиальные клетки аорты быка, которые культивировали на различных поверхностях в течение 5 дней. Рельефные поверхности обладали лучшими адгезивными свойствами по сравнению с гладкими, а эндотелизация микропористых образцов происходила быстрее, чем микродорожек. Одна из причин лучшей адгезии ECs на поверхности

нитинола с наноразмерными рисунками, такими как микропоры и микродорожки, может быть связана с наличием большого количества контактных сайтов для адгезии [71]. Взаимодействие клеток с субстратом зависит от организации цитоскелета и возможности связывания с трансмембранными интегриновыми рецепторами. Микроструктурированные поры действуют как благоприятная окружающая среда, стимулирующая привлечение и прикрепление эндотелиальных клеток. Микродорожки способствуют активации контактных факторов, усилению миграции и направленной ориентации эндотелиальных клеток вдоль дорожек.

Таким образом, формирование поверхности с субмикронным и наномикронным рисунком, позволяет имитировать рельеф здоровой сосудистой стенки и способствовать скорейшей эндотелизации внутренней поверхности имплантированных сосудистых стентов. Сочетание микроструктурирования с плазменным нанопокрывтием металла (NiTi) значительно улучшает адгезию и пролиферацию ECs по сравнению с изолированным использованием каждого варианта обработки [71] и расширяет возможности комбинирования различных покрытий и микроструктур на одной поверхности.

Заключение

Продолжается поиск новых подходов в модификации поверхности металлических стентов с целью наделения конструкций антитромботическими и антипролиферативными свойствами с сохранением возможности полноценной эндотелизации поверхности стента после его имплантации в организм. Определены базовые характеристики топографии поверхности металлов, способствующие ускоренной эндотелизации. Показано, что наноразмерный рисунок на поверхности различных металлов, в том числе и никелида титана, способствует оптимальной адгезии, ориентации и пролиферации эндотелиальных клеток. Изучаются различные способы и режимы плазменной обработки металлов, их способность изменять свойства поверхности для лучшей интеграции с эндотелиальными клетками. Проводятся попытки биофункционализации поверхности металлов с помощью иммобилизации моноклональных антител, специфичных для определенного вида клеток, а также имитации структуры и функции внеклеточного матрикса.

Однако существуют определенные проблемы и ограничения в использовании различных методов, что стимулирует активный поиск новых и коррекцию имеющихся способов улучшения биосовместимости используемых металлов, создание более эффективных технологий с учетом новых знаний о биологии клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Luo C., Zheng Y., Diao Z., Qiu J. and Wang G. Research Progress and Future Prospects for Promoting Endothelialization on Endovascular Stents and Preventing Restenosis. *J. Med. and Biol. Engin.* 2011; 31(5): 307-316
2. Aoki J., Serruys P. W., Beusekom H. et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005; 45: 1575-1597.
3. Markway B.D., McCarty O.J., Marzec U.M., Courtman D.W., Hanson S.R., Hinds M.T. Capture of flowing endothelial cells using surface-immobilized anti-kinase insert domain receptor antibody. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008 Jun; 14(2):97-105. doi: 10.1089/ten.tec.2007.0300
4. Wu X., Yin T., Tian J., Tang C., Huang J., Zhao Y. et al. Distinctive effects of CD34- and CD133-specific antibody-coated stents on re-endothelialization and in-stent restenosis at the early phase of vascular injury. *Regen Biomater.* 2015; 2(2): 87–96. doi: 10.1093/rb/rbv007
5. Rotmans J.I., Heyligers J.M., Verhagen H.J., Velema E., Nagtegaal M.M., de Kleijn D.P. et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation.* 2005 Jul 5;112(1):12-8.
6. Chen J. L., Cao J. J., Wang J., Chen Z. Y., Zhao Y. C., Li Q. et al. Investigation on hemocompatibility and endothelialization of titanium vascular implants modified by PEG and CD34 antibody. *J. Colloid Interface Sci.* 2012; 368: 636–647. doi:10.1016/j.jcis.2011.11.039
7. Butler J.E., Ni L., Brown W.R., Joshi K.S., Chang J., Rosenberg B., Voss E.W. The immunochemistry of sandwich ELISAs-VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CAbs) are denatured by passive adsorption. *Mol. Immunol* 1993;30:1165–1175.
8. Lu B, Smyth MJ, Kennedy RO. Oriented immobilization of antibodies and its applications to immunoassays and immunosensors. *Analyst* 1996;121:29R–32R
9. Li Q.L., Huang N., Chen C., Chen J.L., Xiong K.Q., Chen J.Y. et al. Oriented immobilization of anti-CD34 antibody on titanium surface for self-endothelialization induction. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Sep 15; 94(4):1283-93. doi: 10.1002/jbm.a.32812
10. Simper D., Stalboerger P. G., Panetta C. J., Wang S. H. and Caplice N. M.. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002;

106: 1199-1204

11. Sata M., Saiura A., Kunisato A. et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat. Med.* 2002; 8: 403-409
12. Fadini G.P., Losordo D., Dimmeler S. Critical Reevaluation of Endothelial Progenitor Cell Phenotypes for Therapeutic and Diagnostic Use. *Circulation Research*. 2012; 110: 624-637 doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243386
13. Romagnani, P., Annunziato, F., Liotta, F., Lazzeri, E., Mazzeinghi, B., Frosali, F. et al. CD14+CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res.* 2005; 97: 314,
14. Friedrich E.B., Walenta K., Scharlau J., Nickenig G., and Werner N. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res.* 2006; 98: e20,
15. Peichev M., Naiyer A. J., Pereira D. et al. Expression of VEGFR-2 and CD133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000; 95: 952-958.
16. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* .1997; 275: 964-967
17. Gehling U. M., Ergün S., Schumacher U., et al. In vitro differentiation of endothelial cells from CD133 positive progenitor cells,” *Blood.* 2000; 95: 3106-3112.
18. Casamassimi A., Balestrieri M. L., Fiorito C. et al. Comparison between total endothelial progenitor cell isolation versus enriched CD133+ culture. *J. Biochem.* 2007; 141: 503-511.
19. Hristov M. and Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 8: 498-508.
20. Yang J., Li M., Kamei N. et al. CD34+ Cells Represent Highly Functional Endothelial Progenitor Cells in Murine Bone Marrow. *Plos one.* 2011; 6 (5): e20219
21. Zampetaki A., Kirton J. P. and Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res.* 2008; 78: 413-421
22. Schatteman G. C., Dunnwald M. and Jiao C. Biology of bone marrow derived endothelial cell precursors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292: H1-H18
23. Breaker R. R. Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology,” *Nature.* 2004; 432: 838-845
24. Guo K.T., Schafer R., Paul A., Gerber A., Ziemer G., Wendel H.P. A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells.* 2006; 24 (10): 2220-2231.
25. Ohuchi S. P., Ohtsu T. and Nakamura Y.. Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type III receptor displayed on cell surface. *Biochimie.* 2006; 88:897-904.
26. Mallikaratchy P., Tang Z., Kwame S., Meng L., Shangguan D. and Tan W. Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Cell Proteomics.* 2007; 6: 2230-2238.
27. Raddatz M. S., Dolf A., Endl E., Knolle P., Famulok M. and Mayer G. Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008; 47: 5190-5193
28. Hoffmann J., Paul A., Harwardt M.J. et al. Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008; 84: 614-621
29. Weng Y., Chen J., Tu Q. et al. Biomimetic modification of metallic cardiovascular biomaterials: from function mimicking to endothelialization in vivo. *Interface focus.* 2012; doi:10.1098/rsfs.2011.0126
30. Gupta A., Majumdar P., Amit J., Rajesh A., Singh S. B. Chakraborty M. Cell viability and growth on metallic surfaces: in vitro studies. *Trends Biomater. Artif. Organs.* 2006; 20: 84-89.
31. Prasad C. K. & Krishnan L. K. Regulation of endothelial cell phenotype by biomimetic matrix coated on biomaterials for cardiovascular tissue engineering. *Acta Biomater.* 2008; 4: 182-191
32. Volcker N., Klee D., Hocker H. & Langefeld S. Functionalization of silicone rubber for the covalent immobilization of fibronectin. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2001; 12: 111-119.
33. Zhang Y., Wang W., Feng Q., Cui F. & Xu Y. A novel method to immobilize collagen on polypropylene film as substrate for hepatocyte culture. *Mater. Sci. Eng.* 2006; 26: 657-663.

34. Ge S. N., Chen J. Y., Leng Y. X. & Huang N. Laminin immobilized on titanium oxide films for enhanced human umbilical vein endothelial cell adhesion and growth. *Key Eng. Mater.* 2007; 342–343: 305–308.
35. Zhang Y., Chai C., Jiang X. S., Teoh S. H. & Leong K. W. Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET. *Mater. Sci. Eng.* 2007; 27: 213–219.
36. Beumer S., Heijnen-Snyder G. J., IJsseldijk M. J., de Groot P. G. & Sixma J. J. Fibronectin in an extracellular matrix of cultured endothelial cells supports platelet adhesion via its ninth type III repeat: a comparison with platelet adhesion to isolated fibronectin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 16–25.
37. Hirst S. J., Twort C.H.C. & Lee T.H. Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2000; 23: 335–344
38. Li G. C., Yang P., Qin W., Maitz M. F., Zhou S. & Huang N. The effect of coimmobilizing heparin and fibronectin on titanium on hemocompatibility and endothelialization. *Biomaterials.* 2011; 32: 4691–4703. doi:10.1016/j.biomaterials
39. Chen, J. L., Chen, C., Chen, Z. Y., Chen, J. Y., Li, Q. L. & Huang, N. Collagen/heparin coating on titanium surface improves the biocompatibility of titanium applied as a blood-contacting biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2010; 95: 341–349. doi:10.1002/jbm.a.32847
40. Nagai N, Nakayama Y, Nishi S, Munekata M. Development of novel covered stents using salmon collagen. *J Artif Organs.* 2009; 12: 61–66
41. Kämmerer P.W., Heller M., Brieger J., Klein M.O., Al-Nawas B. and Gabriel M. Immobilisation of linear and cyclic RGD-peptides on titanium surfaces and their impact on endothelial cell adhesion and proliferation. *European cells and Materials.* 2011; 21: 364–372
42. Rüdiger Blindt, Felix Vogt, Irina Astafieva et al. A Novel Drug-Eluting Stent Coated With an Integrin-Binding Cyclic Arg-Gly-Asp Peptide Inhibits Neointimal Hyperplasia by Recruiting Endothelial Progenitor Cells. *J. American College of Cardiology.* 2006; 47 (9): 1786–1795.
43. Hench L. L. & Polak J. M. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002; 295: 1014–1017
44. Narayan R. J. The next generation of biomaterial development. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 2010; 368: 1831–1837.
45. Griffith L. G. & Naughton G. Tissue engineering: current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002; 295: 1009–1014.
46. Gittens R. A., McLachlan T., Olivares-Navarrete R., et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials.* 2011; 32: 3395–3403.
47. Lim J. Y., Shaughnessy M. C., Zhou Z., Noh H., Vogler E. A. & Donahue H. J. Surface energy effects on osteoblast spatial growth and mineralization. *Biomaterials.* 2008; 29: 1776–1784.
48. Ikenaga N., Sakudo N., Awazu K., Yasui H., Hasegawa Y. Study on hybrid nanodiamond films formed by plasma chemical vapor deposition (CVD). *Vacuum* 2006; 80: 810–3. Chu P.K. Enhancement of surface properties of biomaterials using plasma-based technologies. *Surf Coat Technol.* 2007; 201: 8076–82.
49. Haidopoulos M., Turgeon S., Laroche G., Mantovani D. Chemical and morphological characterization of ultra-thin fluorocarbon plasma polymer deposition on 316 stainless steel substrates: a first step toward the improvement of the long-term safety of coated-stents. *Plasma Process Polym.* 2005; 2: 424–40
50. Wang G.X., Shen Y., Zhang H., Quan X.J., Yu Q.S. Influence of surface micro-roughness induced by plasma deposition and chemical erosion plus TiO₂ coating on anticoagulation, hydrophilicity, and corrosion resistance of NiTi alloy stents. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 85(4): 1096–102.
51. Wang G.X., Shen Y., Cao Y., Yu Q.S., Guidoin R. Biocompatibility study of plasma coated nitinol (NiTi Alloy) stents. *IET Nanobiotechnol.* 2007; 1(6): 102–6
52. Chu P.K. Recent applications of plasma-based ion implantation and deposition to microelectronic, nanostructured, and biomedical materials. *Surf. Coat. Technol.* 2010; 204: 2853–2863.
53. Tian X. B., Chu P. K., Fu R. & Yang S. Q. Hybrid processes based on plasma immersion ion implantation: a brief review. *Surf. Coat. Technol.* 2004; 186: 190–19
54. Ziebart T., Schnell A., Walter C. et al. B. Interactions between endothelial progenitor cells (EPC) and titanium implant surfaces. *Clin Oral*

Investig. 2013; 17(1): 301-309,

55. An N., Schedle A., Wieland M., Andrukhov O., Matejka M., Rausch-Fan X. Proliferation, behavior, and cytokine gene expression of human umbilical vascular endothelial cells in response to different titanium surfaces. J Biomed Mater Res. 2010; 93: 364-372.

56. Shen Y., Wang G., Huang X. et al. Surface wettability of plasma SiOx:H nanocoating-induced endothelial cells' migration and the associated FAK-Rho GTPases signalling pathways. J. R. Soc. Interface. 2012; 9:, 313-327. doi:10.1098/rsif.2011.0278

57. Kirkpatrick C.J., Fuchs S., Iris Hermanns M., Peters K., Unger R.E. Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. Biomaterials. 2007; 28: 5193-5198.

58. Peters K., Unger R.E., Gatti A.M., Sabbioni E., Tsaryk R., Kirkpatrick C.J. Metallic nanoparticles exhibit paradoxical effects on oxidative stress and pro-inflammatory response in endothelial cells in vitro. Int J Immunopathol Pharmacol. 2007; 20: 685-695

59. Ruygrok P.N., Muller D.W., Serruys P.W. Rapamycin in cardiovascular medicine. Int. Med. J. 2003; 33(3): 103-109. Sehgal S.N. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. Transplant Proc. 2003; 35(3 Suppl): 7S-14S

60. Menchaka L., Lam H., Leong I., Li S., Johnson D. Endothelial and smooth muscle cell growth on titanium nickel thin film. In: Proceedings of international conference on shape memory and superelastic technologies. Germany: Baden-Baden; 2004. p. 381-6

61. Choudhary S., Berhe M., Haberstroh K.M., Webster T.J. Increased endothelial and vascular smooth muscle cell adhesion on nano-structured titanium and CoCrMo. Int J Nanomed. 2006; 1: 41-49.

62. Lu J., Rao M.P., MacDonald N.C., Khang D., Webster T.J. Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features. Acta Biomaterialia. 2008; 4: 192-201.

63. Palmaz J.C., Benson A., Eugene A.. Influence of surface topography on endothelialization of intravascular metallic material. J Vasc Interv Radiol. 1999; 10(4): 439-44

64. Bailey S.R., Fuss C., Palmaz J.C., Sprague E.A. Surface micro grooves (MG) improve endothelialization rate in vitro and in vivo. J Am Coll Cardiol. 2001; 37: 70A

65. Sprague E. A., F. Tio, Ahmed S. H., Granada J.F. and Bailey S.R.. Impact of Parallel Micro-Engineered Stent Grooves on Endothelial Cell Migration, Proliferation, and Function. An In Vivo Correlation Study of the Healing Response in the Coronary Swine Model. Circ Cardiovasc Interv. 2012; 5: 499-507

66. Harry D Samaroo, Jing Lu., and Thomas J. Webster. Enhanced endothelial cell density on NiTi surfaces with sub-micron to nanometer roughness. Int J Nanomedicine. 2008; 3(1): 75-82.

67. Choudhary S., Berhe M., Haberstroh K.M., Webster T.J. Increased endothelial and vascular smooth muscle cell adhesion on nano-structured titanium and CoCrMo. Int J Nanomed. 2006; 1: 41-49.

68. Choudhary S., Haberstroh K.M., Webster T.J. Enhanced functions of vascular cells on nanostructured Ti for improved stent applications. Tissue Eng. 2007; 13: 1421-1430.

69. Khang D., Lu J., Yao C., Haberstroh K.M., Webster T.J. The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. Biomaterials. 2008; 29: 970-983.

70. Peng L., Eltgroth M.L., LaTempa T.J., Grimes C.A., Desai T.A.. The effect of TiO2 nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation. Biomaterials. 2009; 30: 1268-1272.

71. Shen Y., Wang G., Chen L., Li H. et al. Investigation of surface endothelialization on biomedical nitinol (NiTi) alloy: Effects of surface micropatterning combined with plasma nanocoatings. Acta Biomaterialia. 2009; 5: 3593-3604.

Статья поступила 28.09.2016

Для корреспонденции:

Антонова Лариса Валерьевна

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел. 8 (3842) 64-42-38,

E-mail: antolv@kemcardio.ru

For correspondence:

Antonova Larisa

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,

650002, Russian Federation

Tel. +7 (3842) 64-42-38,

E-mail: antolv@kemcardio.ru

ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ И ПРОФИЛАКТИКА СПАЕЧНОГО ПРОЦЕССА

Д. К. ШИШКОВА, М. В. НАСОНОВА, Ю. А. КУДРЯВЦЕВА

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

В обзоре представлена актуальная тема, связанная с риском образования спаек в послеоперационном периоде. Рассмотрены и описаны аспекты патогенеза спаечного процесса, а также связанных с ним факторов риска, освещены методы профилактики. Отдельно отмечен метод электроспиннинга, позволяющий создавать противоспаечные барьеры на основе биodeградируемых полимеров с добавлением лекарственного вещества, что является перспективным направлением в создании мембран для предотвращения спаечного процесса.

Ключевые слова: повторные операции, спаечный процесс, противоспаечные мембраны.

ETIOLOGY, PATHOGENESIS AND PREVENTION OF ADHESIVE DISEASE

D. K. SHISHKOVA, M. V. NASONOVA, Y. A. KUDRYAVTSEVA

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia

Here we review the recent literature on adhesive disease, a common complication of surgery. In particular, we focus on drug-eluting electrospun adhesion barriers fabricated of biodegradable polymers. This can be a promising approach for the development of novel adhesion barriers.

Key words: reoperations, adhesive process, adhesion barriers.

В двадцатых годах прошлого столетия Рене Лериш называл спайки страшным бичом полостной хирургии. Это утверждение не утратило своей актуальности до нашего времени. Несмотря на значительные успехи эндоваскулярного лечения, открытые операции на сердце занимают значительную часть оперативного вмешательства [1], увеличивается число рестернотомий, и спаечный процесс играет такую же роковую роль, как и сто лет назад. По специфике кардиохирургического воздействия повторные вмешательства являются необходимыми и предсказуемыми. Они происходят в таких случаях, как репротезирование клапанов сердца вследствие их дисфункции, «старение» шунтов после реваскуляризации миокарда, осложнения первичных операций, таких как инфекционный эндокардит, несостоятельность вальвулопластики; экстренные операции по поводу нестабильной стенокардии, острого расслоения аорты. В детской кардиохирургии выполняются плановые отсроченные операции при сложных врожденных пороках сердца, требующих этапного подхода. Также могут встречаться осложнения, связанные с реканализацией

септальных дефектов, сохранение градиента после устранения стенозов и другие причины [2]. Повторный доступ вследствие спаечного процесса является травматичным, нарушается визуализация органов средостения, возникает риск массивного кровотечения вследствие выделения сердца и крупных сосудов от спаек [3,4,5,6,7].

Большая частота развития спаечных осложнений вызывает непрерывный поиск способов борьбы со спайкообразованием. До настоящего момента количество публикаций по этиологии и патогенезу спаечного процесса грудной полости было ограничено, но в последние годы появилось большое количество работ, посвященных этой проблеме [2,8]. Возможно, понимание особенностей сердечно-сосудистой хирургии (влияние искусственного кровообращения, наличие крови в грудной полости) станет основой для дальнейшего поиска новых патогенетических механизмов спайкообразования и, соответственно, базой для разработки средств и мер профилактики. В то же время общность реакций серозных оболочек различной локализации (плевры, перикарда, брюшины), обусловленная их единым мезодер-

мальным происхождением, делает этот поиск комплексным и многогранным [9,10]. Все исследователи склоняются в едином мнении, что формирование спаек является многоступенчатым локальным процессом, развивающимся вследствие хирургической травмы серозных поверхностей, включающих как мезотелиальные клетки, так и базальную мембрану, и субэндотелиальную соединительную ткань. Данные процессы приводят к воспалительной реакции, экссудации, отложению фибрина и росту капилляров в очагах повреждения, что, в свою очередь, влечет за собой каскад событий, которые при сбалансированных процессах заживления приводят к восстановлению поверхностей, а при нарушении баланса – к формированию спаек.

Концепция мезотелиальных стволовых клеток важна для понимания механизма заживления повреждения серозных оболочек и образования сращений [11, 12, 13]. К функциям мезотелиальных клеток (МК) относится поддержание анатомической и функциональной целостности серозной оболочки. МК продуцируют цитокины, такие как трансформирующий фактор роста, эпидермальный и тромбоцитарный факторы роста. Эти цитокины играют важную роль в развитии воспаления и формировании фиброза [13]. Многие исследователи на основании данных электронной микроскопии считают, что первыми на операционную травму реагируют МК, они теряют уплощенную форму, округляются и отделяются от базальной мембраны. Затем происходит накопление фибринового матрикса на оголенной поверхности [14,15]. В норме фибрин быстро удаляется в результате фибринолиза [16], одновременно начинаются процессы заживления [17].

Мало известно о механизмах, которые предопределяют формирование тонких или, наоборот, толстых васкуляризованных сращений [18,19,20]. Механизм регресса сращений также недостаточно изучен. Несмотря на общность серозных оболочек организма, все-таки риск формирования спаек после операций на сердце имеет свои особенности, в частности из-за применения искусственного кровообращения (ИК). В ходе кардиохирургических операций ИК изменяет концентрацию тканевого активатора плазминогена, который активизирует фибринолиз, и ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), отвечающего за угнетение фибринолитических

свойств мезотелия [21]. Кроме того, применение в послеоперационном периоде антикоагулянтных средств подавляет фибринолитическую активность мезотелия перикарда [22, 23]. Правильная и адекватная профилактика спаечного процесса невозможна без знания патогенетически обусловленных местных реакций и закономерностей течения патологического процесса. Исходя из специфики формирования спаечного процесса после кардиохирургических операций в экспериментальных моделях на животных, в клинике предложены различные способы профилактики спаечного процесса.

Изоляция сердца от задней поверхности грудины на конечных этапах операции перикардом является самым доступным методом профилактики образования спаек и защиты сердца при повторной стернотомии [24], но это не всегда выполнимо [25]. Известен способ профилактики спаечного процесса с использованием сосудистого протеза Gore-Tex [26]. При первичной операции под грудину на всю её длину проводится полая синтетическая трубка из биологически инертного материала (сосудистый протез Gore-Tex). Длина протеза зависит от длины грудины, а диаметр может варьировать от 8 до 12 мм, трубка крепится к грудине при помощи швов. При повторной операции, после рассечения кожи и подкожно-жировой клетчатки, выделяют нижний и верхний края синтетической трубки, проводят в неё инструмент и производят рестернотомию. Синтетическая трубка выделяется из спаек и удаляется.

В кардиохирургической практике нашли применение следующие виды противоспаечных адьювантов. В США разработали биорезорбируемый материал из подслизистого слоя тонкой кишки свиньи – CorMatrix (Cardiovascular, Atlanta, GA) [27]. Этот материал прошел клинические испытания в США и Европе и разрешен для применения при реконструктивных операциях на сердце и сонных артериях. Являясь бесклеточной матрицей, CorMatrix достаточно прочен для замещения перикарда во время периода заживления и не содержит провоспалительных клеточных компонентов, присутствующих в других ксенографтах, также обладает резистентностью к кальцификации. Размещенные на матрице аутологичные стволовые клетки, внедряясь в нее, впоследствии могут преобразовать матрицу в собственную ткань организма. Со времени раз-

решения использования этого материала (2006 г.) CorMatrix был имплантирован 50 тысячам пациентов. Ретроспективный анализ показал, что использование CorMatrix снижает относительный риск развития послеоперационной фибрилляции предсердий на 51% [28]. В настоящее время проводится многоцентровое проспективное рандомизированное исследование этого материала. [29, 30]. Данных о противоспаечной эффективности нет.

В кардиоцентрах Европы был апробирован в качестве противоспаечного средства Coseal – хирургический герметик (Baxter Healthcare (Fremont, CA), используемый в различных разделах хирургии. Это препарат на основе из двух растворов полиэтиленгликоля, которые перед применением смешиваются и полимеризуются, при этом происходит увеличение объема композиции в 4 раза. При значительном снижении интенсивности спаечного процесса были отмечены случаи тампонады сердца и окклюзии верхней поллой вены, которые в последующем были скорректированы с учетом дозировки геля [31, 32].

Другие герметики на основе полиэтиленгликоля были исследованы в противоспаечном направлении: Adhibit (Cohesion Technologies, Palo Alto CA) – отмечено стойкое снижение спаек [33]. В исследованиях Salminen в ходе выполнения операции Норвуда при использовании SprayGel (Confluent Inc, Waltham, MA) уменьшения спаек не наблюдали [34].

Рандомизированное, многоцентровое исследование проводилось в 15 центрах кардиоторакальной хирургии США с 2003 по 2006 гг. по применению мембраны REPEL-CV SyntheMed (Iselin, NJ) [35, 36, 37, 38]. Она состоит из полимолочной кислоты (52%) и полиэтиленгликоля (47%). Для оценки эффективности применения Repel-CV мембрану накладывали непосредственно под стернотомическим доступом таким образом, чтобы она заходила под края перикарда не более чем на сантиметр в ходе паллиативной операции на сердце. При повторной стернотомии, 2-13 месяцев спустя, оценивали протяженность и серьезность спаек на исследуемом операционном поле. Проведенные исследования показали, что защитная пленка значительно снизила степень серьезности спайкообразования в грудной клетке на момент повторной стернотомии. В 2007 году FDA рекомендовала использо-

вать REPEL-CV для молодых взрослых пациентов и детей (до 21 года).

Мембрана Seprafilm Genzyme (Cambridge, MA) для закрытия травмированной поверхности, является нетоксичной, неиммуногенной, биологически совместимой, состоит из гиалуроновой кислоты и карбоксиметилцеллюлозы. Мембрана превращается в гель в течение 24-48 часов и остается на месте размещения на срок до семи суток; полностью рассасывается к 28 дню, не требует фиксации швами. Seprafilm применяли в клинике во время операций 350 больным (из 1024 пациентов); 30 случаев использования пленки при рестернотомии были оценены по сравнению с 10 случаями, где разделяющую мембрану не применяли. Полученные результаты показали, что применение хирургической мембраны Seprafilm приводит к значительному уменьшению количества и прочности спаек [39,40]. Однако стоит отметить, что Seprafilm неэффективен в присутствии крови [39].

Мембрана CardioWrap (MAST Biosurgery USA Inc, San Diego, US) является биорезорбируемой, полупрозрачной мембраной состоящей из L-лактида (70%) и D, L-лактид (30%), исследована в 2004 году в экспериментальной модели на свиньях в течение 4 недель и показала значительное снижение спаечного процесса по сравнению с контрольной группой [40].

Мембрана на основе свиного коллагена первого типа Cova CARD (Biom'Up (Lyon, France) апробирована в эксперименте на овцах, и с применением искусственного кровообращения. Резорбция мембраны происходила в течении 4 месяцев [41,42]. Литературных данных о применении в клинике нет.

При разработке противоспаечных адъювантов особое внимание уделяется воспалению как одному из ведущих факторов патогенеза спаечного процесса. Поэтому в массе экспериментальных работ апробированы различные фармацевтические препараты, воздействующие на это звено процесса.

В Jame Cook Univewrsity в 2005 г. была разработана модель предотвращения спаек с использованием в качестве лабораторных животных свиней в возрасте 8-12 недель. После выполнения срединной стернотомии перикард подвергался трению и высушивался. Животные были разделены на четыре группы: первая группа – контрольная, вторая получала индометацин

(НПВП), третья – рофекоксиб (НПВП) и четвертая – полиэтиленгликоль, распыленный на сердце до закрытия. После операции вторая и третья группы получали НПВП в течение пяти дней. Спайки были оценены после 12 и 25 недель гистологически и при помощи маркеров воспаления. Значительное снижение спаек наблюдалось в группах, где применял индометацин и полиэтиленгликоль [43].

В экспериментальной модели на кроликах была использована модель предотвращения спаек с помощью геля N,O-карбоксиметилхитозана. Спайки формировались путем травмы передней поверхности сердца механическим способом (трением марлей) и высушиванием кислородом. Образование спаек оценивали в интервале от 14 дней до 3 месяцев. К поверхности, обработанной гелем N,O карбоксиметилхитозана, фибробласты не адгезировались, что свидетельствует о том, что карбоксиметилхитозан выступает как биофизический барьер [44].

В экспериментальной модели на овцах использовали ксенографты перикарда и полигликолевой кислоты как средства для предотвращения спаек. С применением искусственного кровообращения спайки были более массивные и плотным слоем охватывали перикард. Исследование показало, что при проведении испытания необходимо учитывать влияние искусственного кровообращения [45]. Помимо вышеперечисленных моделей в исследованиях применяли методику введения жидкости в перикардальную полость [46], использовали заплаты из аутогенных тканей [47], применяли мембраны с противоспаечными агентами из женьшеня [48], желатиновые заплаты [49].

Таким образом применение противоспаечных агентов в кардиохирургической практике позволяет устранить риск повторных операций и осложнений, связанных со спаечным процессом. Однако ни одна из предложенных моделей предотвращения спайкообразования не дает полной свободы от спаечного процесса, а лишь снижает частоту случаев.

Трендом последних лет в разработке противоспаечных адъювантов является использование биодеградируемых барьерных материалов, обладающих биосовместимостью, гемосовместимостью и способных резорбироваться после выполнения барьерной функции и ослабления воспалительной реакции. Эффективность резорбирующихся мембран во многом определяется

тем, какой силы воспалительный ответ они вызывают при имплантации. В идеале воспалительная реакция должна быть минимальна. Оптимальным материалом для создания противоспаечной мембраны является биополимер, вызывающий минимальную макрофагальную и соединительно-тканную реакцию. На этапе создания противоспаечной мембраны необходимо определить сроки и особенности деградации полимерной композиции после имплантации, оценить эффективность предупреждения спаек в эксперименте, убедиться в отсутствии воспалительной реакции со стороны организма.

Наиболее перспективным направлением, на наш взгляд, является создание биодеградируемых полимерных мембран, изготовленных методом электроспиннинга. Преимущество метода электроспиннинга заключается в возможности формирования бикомпонентных нановолокон структуры «ядро-оболочка», где роль «ядра» играет лекарственное вещество. По мере деградации мембраны лекарственные вещества будут выделяться непосредственно в зону хирургического вмешательства и оказывать локальное пролонгированное противовоспалительное действие. Управляя процессом электроспиннинга, мы добиваемся необходимого диаметра волокон, следовательно, регулируем скорость резорбции матрицы и скорость выделения лекарственного препарата [50]. Таким образом, мы получаем возможность управлять процессом адгезиогенеза, подавляя фазу воспаления. Поскольку любое антиспаечное средство должно действовать именно против спаек, а не против нормально заживающей раны, лекарство должно попадать к месту формирования спаек. Подводя итог обзору, можно отметить, что на современном этапе в литературе содержится достаточно сведений о патогенезе спаечного процесса, предложено большое число противоспаечных адъювантов, но не создано радикального средства, предотвращающего спаечный процесс. На наш взгляд, биодеградируемые полимерные барьеры, созданные методом двухфазного электроспиннинга, являются перспективным направлением в предотвращении спаечного процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия – 2015. Болезни и врожден-

ные аномалии системы кровообращения. М.: НЦССХ им А.Н. Бакулева; 2016. 208с.

Bokeriya L.A., Gudkova R.G. Serdechno-sosudistaya khirurgiya – 2015. Bolezni i vrozhdennye anomalii sistemy krovoobrashcheniya. M.: NTsSSKh im A.N. Bakuleva; 2016. [in Russ].

2. Бокерия Л.А., Сивцев В.С. Послеоперационный спаечный перикардит: факторы риска, патогенез и методы профилактики. *Анналы хирургии*. 2014; 6: 7-15.

Bokeriya L.A., Sivtsev V.S. Posleoperatsionnyy spaechnyy perikardit: faktry riska, patogenez i metody profilaktiki. *Annaly khirurgii*. 2014; 6: 7-15. [in Russ].

3. Marelli A.J., Mackie A.S., Ionescu-Ittu R., Rahme E., Pilote L. Congenital heart disease in the general population: changing prevalence and age distribution. *Circulation*. 2007; 115: 163-164. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627224

4. Ellman P.I., Smith R.L., Girotti M.E., Thompson P.W., Kron I.L. Cardiac injury during re sternotomy does not affect perioperative mortality. *Journal of the American College of Surgeons*. 2008; 206: 993–997. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.12.010

5. Elahi M., Dhannapuneni R., Firmin R., Hickey M. Direct complications of repeat median sternotomy in adults. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2005; 13: 135-137. doi: 10.1177/021849230501300208

6. Roselli E.E., Pettersson G.B., Blackstone E.H., Brizzio M.E., Houghtaling P.L., Lauck R., et al. Adverse events during reoperative cardiac surgery: Frequency, characterization, and rescue. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2008; 135: 316–323. doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.08.060

7. Park C.B., Suri R.M., Burkhart H.M., et al. Identifying patients at particular risk of injury during repeat sternotomy: analysis of 2555 cardiac reoperations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*. 2010; 140(5): 1028–1035 doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.07.086

8. Cannata A., Petrella D., Bruschi G., Fratto P., Gambacorta M., Martinelli L. Postsurgical intrapericardial adhesions: mechanisms of formation and prevention. *Ann. Thorac. Surg*. 2013; 95(5): 1818–1826. doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.11.020

9. Бритиков Д.В., Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Новикова С.П., Салохединова Р.Р., Городков А.Ю. и др. Биологические пленочные им-

плантаты для профилактики спаечного процесса (экспериментальное исследование). *Бюллетень НЦССХ ИМ. А.Н. Бакулева РАМН Сердечно-сосудитые заболевания*. 2016;17 (3):13

Britikov D.V., Bokeriya L.A., Bokeriya O.L., Novikova S. P., Calokhedanova R.R., Gorodkov A. Yu. Et al. Biologicheskie plenochnye implantaty dlya profilaktiki spaechnogo protsessa (eksperimental'noe issledovanie). *Byulleten' NTsSSKh IM. A.N. Bakuleva RAMN Serdechno-sosuditye zabolevaniya*. 2016;17 (3):13[in Russ].

10. Бокерия Л.А. Беришвили И.И. Хирургическая анатомия сердца. М.; 2006.

Bokeriya L.A. Berishvili I.I. Khirurgicheskaya anatomiya serdtsa. Moscow; 2006. [in Russ].

11. Herrick S.E., Mutsaers S.E. The potential of mesothelial cells intissue engineering and regenerative medicine applications. *Int. J. Artif. Organs*. 2007; 30: 527—540.

12. Lucas P.A. Stem cells for mesothelial repair: an understudied modality. *Int. J. Artif. Organs*. 2007; 30: 550—556.

13. Mutsaers S.E., Peple C.M., Lansley S.M., Herrick S.E. The origin of regenerating mesothelium: a historical perspective. *Int. J. Artif. Organs*. 2007; 30 (6): 484–494.

14. Nkere U.U., Whawell S.A., Sarraf C.E., et al. Perioperative histologic and ultrastructural changes in the pericardium and adhesions. *Ann. Thorac. Surg*. 1994; 58 437–444. doi: 10.1016/0003-4975(94)92224-1

15. Leak L.V., Ferrans V.J., Cohen S.R., Eidbo E.E., Jones M. Animal model of acute pericarditis and its progression to pericardial fibrosis and adhesions: ultrastructural studies. *Am. J. Anat*. 1987; 180:373–390. doi:10.1002/aja.1001800408

16. Holmdahl L. The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur J. Surg*. 1997; 1: 24—31. doi: 10.1046/j.1524-475X.1994.20306.x

17. DiZerega G.S., Campeau J.D. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum Reprod Update*. 2001; 7: 547—555. doi:10.1093/humupd/7.6.547

18. Herrick S.E., Mutsaers S.E., Ozua P., Sulaiman H., Omer A., Boulos P. et al. Human peritoneal adhesions are highly cellular, innervated, and vascularized. *J. Pathol*. 2000; 192: 67—72: doi 10.1002/1096-9896

19. Sulaiman H., Gabella G., Davis C., Mutsaers S.E., Boulos P., Laurent G.J. et al. Growth of nerve fibres into murine peritoneal

- adhesions. *J. Pathol.* 2000;192: 396—403. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH710>3.0.CO;2-4
20. Sulaiman H., Gabella G., Davis M.C., Mutsaers S.E., Boulos P., Laurent G.J. et al. Presence and distribution of sensory nerve fibers in human peritoneal adhesions. *Ann Surg.* 2001; 234: 256—261. doi: 10.1097/00000658-200108000-00016
 21. Chandler W., Velan T. Secretion of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 during cardiopulmonary bypass. *Thromb. Res.* 2003; 112 (3): 185–92 doi:10.1016/j.thromres.2003.11.006
 22. Malouf J.F., Alam S., Gharzeddine W., Stefadouros M.A. The role of anticoagulation in the development of pericardial effusion and late tamponade after cardiac surgery. *Eur. Heart J.* 1994; 15 (4): 583–4. doi: 10.1093/eurheartj/14.11.1451
 23. Quin J.A., Tauriainen M.P., Huber L.M., McIntire D.D., Kaiser P.A., Ring W.S. et al. Predictors of pericardial effusion after orthotopic heart transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002; 124 (5): 979–83. doi:10.1067/mtc.2002.124387
 24. Ананьев Д.А. Клошинских А. А. Способ изоляции сердца от задней поверхности грудины. Патент RU 2503418. 2012 04 декабря.
 - Anan'ev D.A. Kloshinskih A. A. Spособ izoljácii serdca ot zadnej poverhnosti grudiny. Patent RU 2503418. 2012 04 december.
 25. Белов Ю.В. Искусство коронарной хирургии. М.: МИА; 2009.
 - Belov Ju.V. Iskusstvo koronarnoj hirurgii. Moscow; 2009
 26. Свободов А.А., Зеленикин М.А., Свободов А.А. Способ безопасной рестернотомии. Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2008; 1: 66–67
 - Svobodov A.A., Zelenikin M.A., Svobodov A.A. Spособ bezopasnoj resternotomii. Grudnaja i serdechno-sosudistaja hirurgija. 2008; 1: 66–67. [In Russ].
 27. Quarti A., Nardone S., Colaneri M., Santoro G., Pozzi M. Preliminary experience in the use of an extracellular matrix to repair congenital heart diseases. *I. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2011; 13: 569–572 doi: 10.1510/icvts.2011.280016.
 28. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater.* 2009; 5 (1): 1–13. doi: 10.1016/j.actbio.2008.09.013
 29. Boyd W.D., Johnson W.E. 3rd, Sultan P.K., Deering T.F., Matheny R.G. Pericardial reconstruction using an extracellular matrix implant correlates with reduced risk of postoperative atrial fibrillation in coronary artery bypass surgery patients. *Heart Surg. Forum.* 2010; 13: 311–6. doi: 10.1532/HSF98.20091184.
 30. Gerdisch M.W., Shea R.J., Barron M. D. Clinical experience with CorMatrix extracellular matrix in the surgical treatment of mitral valve disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2014; 148(4): 1370–1378. doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.10.055.
 31. Napoleone C., Valori A., Crupi G., et al. An observational study of Coseal for the prevention of adhesions in pediatric cardiac surgery . *I. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2009; 9: 978–982 doi: 10.1510/icvts.2009.212175.
 32. Cannata A., Petrella D., Gambacorta M. , Russo C.F , Bruschi G., Martinelli L . Histological findings following use of Coseal in a patient with a left ventricular assist device. *Surg. Innov.* 2013; 20(6): 35-7. doi: 0.1177/1553350612443899
 33. Konertz W.F., Kostelka M., Mohr F.W., et al. Reducing the incidence and severity of pericardial adhesions with a sprayable polymeric matrix . *Ann Thorac. Surg.* 2003;(76): 1270–1274 doi: 10.1016/S0003-4975(03)00733-
 34. Salminen J.T, Mattila I., Puntila J.T., Sairanen H.I. Prevention of postoperative pericardial adhesions in children with hypoplastic left heart syndrome. *I. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2011;12:270–272 doi: 10.1510/icvts.2010.241448
 35. Haensig M., Mohr F.W., Rastan A.J. Bioresorbable adhesion barrier for reducing the severity of postoperative cardiac adhesions: focus on REPEL-CV . *Med Devices (Auckl)* . 2011;4: 17–25 doi: 10.2147/MDER.S7957
 36. Schreiber C., Boening A., Kostolny M., et al. European clinical experience with REPEL-CV. *Expert Rev Med Devices.* 2007; 4 : 291–295 doi: 10.1586/17434440.4.3.291
 36. Pines E. A comparative, evaluator-blinded, randomized, parallel study to determine the safety and effectiveness of REPEL-CV® for reducing post-operative adhesions following pediatric cardiothoracic surgery. *Med Devices.* 2011; 4: 17–25. doi: 10.2147/MDER.S7957
 37. Schreiber C., Boening A., Kostolny M., et al. European clinical experience with REPEL-CV. *Expert. Rev. Med. Devices.* 2007; 4: 291–295. doi: 10.1586/17434440.4.3.291
 38. Lodge A.J., Wells W.J., Backer C.L. et al.

A novel bioresorbable film reduces postoperative adhesions after infant cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 2008; 86(2): 614–21 doi: 10.1016/j.athoracsur.2008.04.103.

39. Beck D.E., Cohen Z., Fleshman J.W., et al. A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine . *Dis. Colon. Rectum.* 2003; 46: 1310–1319. doi: 10.1097/01.DCR.0000089117.62296.E4

40. Diamond M.P., Burns E.L., Accomando B., Mian S., Holmdahl L. Seprafilm adhesion barrier: a review of preclinical, animal, and human investigational studies . *Gynecol. Surg.* 2012; 9: 237–245 doi: 10.1007/s10397-012-0741-9

41. Iliopoulos J., Cornwall G.B., Evans R.O., et al. Evaluation of a bioabsorbable polylactide film in a large animal model for the reduction of retrosternal adhesions . *J. Surg. Res.* 2004; 118: 144–153. doi: 10.1016/j.jss.2003.10.023

42. Bel A., Kachatryan L., Bruneval P., et al. A new absorbable collagen membrane to reduce adhesions in cardiac surgery . *I. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2010; 10: 213–216. doi: 10.1510/icvts.2009.215251

43. Bel A., Ricci M., Piquet J., et al. Prevention of postcardiopulmonary bypass pericardial adhesions by a new resorbable collagen membrane . *I. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2012; 14: 469–473. doi: 10.1093/icvts/ivr159

44. Zhou J., Liwski R.S., Elson C., Lee T.D. Reduction in postsurgical adhesion formation after cardiac surgery in a rabbit model using N,O carboxymethyl chitosan to block cell adherence. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008; 135(4): 777–783

45. Gabbay S., Guindy A.M., Andrews J.F., Amato J.J., Seaver P., Khan M.Y. New outlook on pericardial substitution after open heart

operations. *Ann. Thorac. Surg.* 1989; (48): 803–812. doi:10.1016/0003-4975(89)90674-7

46. Seeger J.M., Kaelin L.D., Staples E.M., Yaacobi Y., Bailey J.C., Normann S., Burns J.W., Goldberg E.P. Prevention of postoperative pericardial adhesions using tissue-protective solutions. *J. Surg. Res.* 1997; 68 (1): 63–66. doi: 10.1006/jsre.1996.4990

47. Pacholewicz J.K., Dalosio C., Shawarby O.A., Dharan S.M., Gu J., McGrath L.B. Efficacy of autologous peritoneum as a biological membrane in cardiac surgery. *J. Cardiothorac Surg.* 1994; 8: 563–565. doi: 10.1016/1010-7940(94)90077-9

48. Chang Y., Lai Po-H., Wang Ch.-Ch., et al. Mesothelium regeneration on acellular bovine pericardia loaded with an angiogenic agent (ginsenoside Rg1) successfully reduces postsurgical pericardial adhesions *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006;132:867-874. doi: 10.1016/j.jtcvs.2006.06.029

49. Sakuma K., Iguchi A., Ikada Y., Tabayashi K. Closure of the pericardium using synthetic bioabsorbable polymers. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 80 :1835–1840. doi: 10.1016/j.athoracsur.2005.04.078

50. Насонова М.В., Ходыревская Ю.И., Бураго А.Ю., Доронина Н.В., Ежов В.А., Кудрявцева Ю.А. Противовоспалительные биодеградируемые мембраны для профилактики образования послеоперационных спаек. *Сибирский медицинский журнал.* 2014; 8: 54–59. doi: 10.1234/XXXX-XXXX-2014-8-54-59

Nasonova M.V., Hodyrevskaja Ju.I., Burago A.Ju., Doronina N.V., Ezhov V.A., Kudryavceva Ju.A. Protivovospalitel'nye biodegradiruemye membrany dlja profilaktiki obrazovanija posleoperacionnyh spaek. *Sibirskij medicinskij zhurnal.* 2014; 8 [in Russ].

Статья поступила 30.12.2016

Для корреспонденции:
Шишкова Дарья Кирилловна
Адрес: 650002, г. Кемерово,
Сосновый бульвар, д. 6
Тел. +7 (3842) 64-38-42,
E-mail: shishkovadk@gmail.com

For correspondence:
Shishkova Dariya
Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,
650002, Russian Federation
Тел. +7 (3842) 64-38-42,
E-mail: shishkovadk@gmail.com

PROBLEM OF HEART SALVATION DURING REPERFUSION. OPIOID RECEPTOR AGONISTS AS A POSSIBLE SOLUTION

IGOR KHALIULIN¹, LEONID N. MASLOV²

¹*School of Clinical Sciences, University of Bristol, Bristol, UK*

²*Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Tomsk, Russia*

Ischaemia/reperfusion cardiac injury contributes to morbidity and mortality during percutaneous coronary intervention, heart surgery and transplantation. Even when the recanalization of an infarct-related coronary artery is carried out successfully, there is still a risk of death due to reperfusion injury. Numerous pharmacological interventions have been found in experiments on animals. However, the translation of these interventions to clinical practice has been disappointing. None of the drug treatment has been able to improve in-hospital mortality of patients with acute myocardial infarction. The search for pharmacological agents able to salvage myocardium during reperfusion continues. Opioid receptor (OR) agonists represent one of the promising group of drugs for treatment of patients with myocardial infarction. It has been found that μ -, δ - and κ -OR agonists are able to attenuate heart injury when administered before or at the beginning of reperfusion. However, what kind of OR receptors need to be activated in order to protect the heart during reperfusion and the precise mechanism of this effect have yet to be elucidated.

Key words: ischemia/reperfusion injury, heart, myocardial infarction, cardioprotection, opioid receptor agonists.

The attempts to salvage myocardium during reperfusion using pharmacological interventions

It is commonly accepted that the only effective treatment of myocardial infarction is recanalization of the infarct-related coronary artery. This can be achieved by thrombolysis, percutaneous coronary intervention (PCI), or coronary artery bypass grafting [1-3]. Unfortunately, there is always a risk of death for patients with myocardial infarction, even when the recanalization of the coronary artery is carried out fast and successfully [4]. Therefore, there is a pressing need for creation of new generation drugs able to prevent reperfusion heart injury.

Nowadays, no drug is available, which would be able to attenuate effectively the area of necrosis and mortality in patients with acute myocardial infarction. Different pharmaceutical companies and scientific laboratories carry out the search for this kind of medicine. However, until now, no breakthrough has been achieved in this area.

A number of drugs have been clinically tested for reperfusion injury. For example, it has been proposed that the calcium sensitizer levosimendan has a potential to reduce infarct size. The randomized double-blind clinical study showed improvement of hemodynamic function in patients with ST-elevation myocardial infarction (STEMI)

treated by PCI. However, no infarct-limiting effect of levosimendan was found [5]. Inhibitors of Na^+/H^+ exchanger that showed cardioprotective properties in animal models [6] failed to protect heart in clinical settings [7] and even demonstrated increased mortality [8]. The gold standard MPTP inhibitor cyclosporine A, which showed infarct-limiting effect in laboratory experiments [9-11], did not reduce the risk of the composite outcome of death from any cause, worsening of heart failure during the initial hospitalization/rehospitalization, or causing adverse left ventricular remodelling in patients with STEMI [12]. The P2Y₁₂ receptor inhibitor clopidogrel appeared to reduce infarct size in patients with acute myocardial ischemia [13, 14], but had no effect on mortality in patients with this kind of pathology [15]. A statin atorvastatin neither improved left ventricular function, nor reduced infarct size in STEMI patients [16-18]. Intravenous adenosine infusion has been found to reduce infarct size and attenuate the No Reflow phenomenon in STEMI patients [19-22]. However, as Cohen M.V. and Downey J.M. [23] have pointed out, the ability of adenosine administered at or shortly before reperfusion to provide cardioprotection against infarction is indeed quite controversial. The authors noted that cardioprotective effect of the intravenous infusion of adenosine occurred when it was used as a form of preconditioning, prior to ischemia,

whilst given at reperfusion, adenosine simply did not protect the heart. The infarct-limiting effect of a piperazine derivative trimetazidine is also debatable [24, 25]. In general, the drugs mentioned above showed cardioprotective effects in experiments on animal models or in patients when administered prior to recanalization of the infarct-related coronary artery, but were ineffective in clinical settings when introduced during reperfusion. Furthermore, none of these medicines could improve in-hospital mortality of patients with STEMI.

Clinical relevance of the use of a cardioprotective agent prior to ischemia is restricted to cardiac surgery, when ischemia is caused by aortic cross-clamping. However, in most cases, it is impossible to predict an incident of acute myocardial ischemia and carry out the treatment prior to the ischemic event. A possibility to attenuate specifically the reperfusion heart injury had been unclear until the discovery of the phenomenon of ischemic postconditioning in 2003 [26]. The authors demonstrated that a few brief (30 sec each) episodes of ischemia and reperfusion produced at the commencement of reperfusion following prolonged ischemia halved infarct size. Based on these data, many scientists are trying to find the way to salvage the myocardium during reperfusion by treating the heart not before ischemia, but just before or during reperfusion. In this context, opioid receptor (OR) agonists represent a promising group of drugs.

Opioid receptors as novel targets for prevention of reperfusion heart injury

It has been shown [27-29] that OR agonists reduce infarct size when administered before the onset of reperfusion. Thus in 2004, Gross E.R. et al. [29] found that intravenous infusion of a preferential μ -OR morphine or δ -OR agonist BW373U86 (1mg/kg) 5 min prior to reperfusion in rats promotes decrease in infarct size-to-area at risk ratio (IS/AAR). These results are consistent with a recent study indicating that the selective μ -OR agonist endomorphine-1 (50 μ g/kg) reduced infarct size when injected intravenously 5 min before reperfusion [30]. Infarct-limiting effect of morphine during reperfusion has also been confirmed by Gong et al. [27]. Intravenous injection of the selective κ 1-OR agonist U-50,488 (0.1 mg/kg) 5 min before reperfusion reduced IS/AAR [28]. This effect was abolished by the inhibition of κ 1-OR with nor-

binaltorphimine.

The precise mechanism of the cardioprotective effect of the OR agonists during reperfusion has yet to be discovered. However, it has been established that ORs represent Gi/o-coupled receptors that inhibit adenylyl cyclase and activate phospholipase C, which in turn, synthesizes diacylglycerols stimulating protein kinase C (PKC) [31]. This was confirmed by the work of Peart J.N. & Gross G.J. They showed in the experiments on isolated perfused murine heart that pertussis toxin, which ribosylates the α i subunit of the Gi/o protein, eliminated the cardioprotective effect of morphine [32]. Currently it is suggested that Gi/o proteins serve as an intermediary link between ORs and the protein kinases that perform the protective signaling [33]. The following kinases may be involved in the cardioprotective mechanism of the ORs/ Gi/o activation: PKC [32, 33]; PI3 kinase, Akt, and MAPK – the RISK pathway [34, 35]; GSK-3 β and JAK2 [36]. The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) has been implicated in the preconditioning-induced triggering of Gi/o coupled receptors/PKC pathway [37] and could be involved in the protective effect of ORs [38]. Redox signaling has also been found to participate in the effects of ORs [39]. The studies have also indicated that these effects of OR agonists result in inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening [33], which are critical in reperfusion-induced heart injury [40].

Taken together, it is of paramount importance to find a pharmacological intervention able to salvage myocardium during reperfusion and OR agonist represent a perspective group of drugs in this respect. Further studies are needed in order to establish what kind of ORs need to be activated to achieve the optimal heart salvation during reperfusion and the mechanism involved.

REFERENCES

1. P.W. Serruys, M.-C. Morice, A.P. Kappetein, A. Colombo, D.R. Holmes, M.J. Mack et al. Percutaneous Coronary Intervention versus Coronary-Artery Bypass Grafting for Severe Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2009; 360(10): 961-972.
2. D. Joyal, J. Afilalo, S. Rinfret Effectiveness of recanalization of chronic total occlusions: A systematic review and meta-analysis. *Am Heart J.* 2010; 160(1): 179-187.

3. Ito H., Okamura A., Iwakura K., Masuyama T., Hori M., Takiuchi S. et al. Myocardial Perfusion Patterns Related to Thrombolysis in Myocardial Infarction Perfusion Grades After Coronary Angioplasty in Patients With Acute Anterior Wall Myocardial Infarction. *Circulation*. 1996; 93(11): 1993-9.
4. S.S. Rathore, J.P. Curtis, J. Chen, Y. Wang, B.K. Nallamothu, A.J. Epstein, H.M. Krumholz R. for the National Cardiovascular Data, Association of door-to-balloon time and mortality in patients admitted to hospital with ST elevation myocardial infarction: national cohort study. *BMJ*. 2009; 338: b1807.
5. T. Husebye, J. Eritsland, C. Müller, L. Sandvik, H. Arnesen, I. Seljeflot, A. Mangschau, R. Bjørnerheim, G.Ø. Andersen, Levosimendan in acute heart failure following primary percutaneous coronary intervention-treated acute ST-elevation myocardial infarction. Results from the LEAF trial: a randomized, placebo-controlled study. *Eur J Heart Fail*. 2013; 15(5): 565-572.
6. T. Toda, T. Kadono, M. Hoshiai, Y. Eguchi, S. Nakazawa, H. Nakazawa, N. Higashijima, H. Ishida Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor cariporide attenuates the mitochondrial Ca²⁺ overload and PTP opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(6): H3517.
7. Zeymer U., Suryapranata H., Monassier J.P., Opolski G., Davies J., Rasmanis G. et al. The Na⁺/H⁺ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction: Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38(6): E1644-E1650. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01608-4](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01608-4)
8. R.M. Mentzer, Jr. C. Bartels, R. Bolli, S. Boyce, G.D. Buckberg, B. Chaitman et al. Sodium-Hydrogen Exchange Inhibition by Cariporide to Reduce the Risk of Ischemic Cardiac Events in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: Results of the EXPEDITION Study. *Ann Thorac Surg*. 2008; 85(4): 1261-1270.
9. L.F. González Arbeláez, A. Ciocci Pardo, J.C. Fantinelli, S.M. Mosca, Cyclosporine-A mimicked the ischemic pre- and postconditioning-mediated cardioprotection in hypertensive rats: Role of PKC ϵ . *Exp Mol Pathol*. 2016; 100(2): 266-275.
10. N. Wu, W.N. Li, W.Q. Shu, Y. Lv, D.L. Jia Blocking the mitochondrial permeability transition pore with cyclosporine-A can restore cardioprotection of ischemic postconditioning in hypercholesterolemic rat heart. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19(3): 446-54.
11. E.J. Griffiths, A.P. Halestrap Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993; 25(12): 1461-9.
12. T.-T. Cung, O. Morel, G. Cayla, G. Rioufol, D. Garcia-Dorado, D. Angoulvant et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *New Eng J Med*. 2015; 373(11):1021-1031. DOI: 10.1056/NEJMoa1505489
13. Roubille F., Lairez O., Mewton N., Rioufol G., Ranc S., Sanchez I. et al. Cardioprotection by clopidogrel in acute ST-elevated myocardial infarction patients: a retrospective analysis. *Basic Res Cardiol*. 2012; 107(4): 275. doi: 10.1007/s00395-012-0275-3. Epub 2012 Jun 21.
14. Song Y.B., Hahn J.Y., Gwon H.C., Chang S.A., Lee S.C., Choe Y.H. et al. A high loading dose of clopidogrel reduces myocardial infarct size in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: A magnetic resonance imaging study. *Am Heart J*. 2012 Mar;163(3):500-7. doi: 10.1016/j.ahj.2011.12.007.
15. Bellemain-Appaix A., O'Connor S.A., Silvain J., et al. Association of clopidogrel pretreatment with mortality, cardiovascular events, and major bleeding among patients undergoing percutaneous coronary intervention: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2012; 308(23): 2507-2516.
16. Hahn J.Y., Kim H.J., Choi Y.J., Jo S.H., Kim H.J., Lee S. et al. Effects of atorvastatin pretreatment on infarct size in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Am Heart J*. 2011; 162(6): 1026-33. doi: 10.1016/j.ahj.2011.08.011
17. Kim E.K., Hahn J.-Y., Song Y.B., Chang S.-A., Choi J.-H., Choi S.-H. et al. Effects of High-dose Atorvastatin Pretreatment in Patients with ST-segment Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention: A Cardiac Magnetic Resonance Study. *J Korean Med Sci*. 2015; 30(4): 435-441. doi: 10.3346/jkms.2015.30.4.435
18. PostS. , Post M.C., van den Branden B.J., Eefting F.D., Goumans M.-J., Stella P.R. et al. Early statin treatment prior to primary PCI for acute myocardial infarction: REPERATOR, a randomized

placebo-controlled pilot trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2012; 80(5): 756-765.

19. Mahaffey K.W., Puma J.A., Barbagelata N.A., DiCarli M.F., Leeser M.A., Browne K.F. et al. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: Results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction STudy of Adenosine (AMISTAD) Trial. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34(6): 1711-1720.

20. Micari A., Belcik T.A., Balcells E.A., Powers E., Wei K., Kaul S., Lindner J.R. Improvement in microvascular reflow and reduction of infarct size with adenosine in patients undergoing primary coronary stenting. *Am J Cardiol.* 2005; 96(10):1410-1415.

21. A.M. Ross, R.J. Gibbons, G.W. Stone, R.A. Kloner, R.W. Alexander A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Multicenter Trial of Adenosine as an Adjunct to Reperfusion in the Treatment of Acute Myocardial Infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45(11): 1775-1780. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.061>.

22. Wang J., Chen Y.-D., Zhi, G. Xu Y., Chen, L., Liu H.-B. et al. Beneficial effect of adenosine on myocardial perfusion in patients treated with primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012; 39(3): 247-252.

23. Cohen M.V., Downey J.M. AMISTAD Trials: Possible Reasons for Lack of Success. *Journal of the American College of Cardiology.* 2006; 47(6): 1236.

24. Di Pasquale P., Lo Verso P., Bucca V., Cannizzaro S., Scalzo S., Maringhini G. et al. Effects of Trimetazidine Administration before Thrombolysis in Patients with Anterior Myocardial Infarction: Short-term and Long-term Results. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1999; 13(5): 423-428.

25. Steg P.G., Grollier G., Gallay P., Morice M.-C., Karrillon G.J., Benamer H. et al. A randomized double-blind trial of intravenous trimetazidine as adjunctive therapy to primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2001; 77(2-3): 263-273.

26. Zhao Z.-Q., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang N.-P., Guyton R.A., Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285(2): H579.

27. Gong Z.X., Ran K., Chang Y.T., Xu J.M.

Effect of morphine postconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2009; 38(5): 521-4.

28. Zhang W.P., Zong Q.F., Gao Q., Yu Y., Gu X.Y., Wang Y., Li Z.H., Ge M. Effects of endomorphin-1 postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury and myocardial cell apoptosis in a rat model. *Mol Med Rep.* 2016; 14(4): 3992-8.

29. Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J. Opioid-Induced Cardioprotection Occurs via Glycogen Synthase Kinase β Inhibition During Reperfusion in Intact Rat Hearts. *Circ Res.* 2004; 94(7): 960.

30. Maslov L.N., Khaliulin I., Zhang Y., Krylatov A.V., Naryzhnaya N.V., Mechoulam R. et al. Prospects for creation of cardioprotective drugs based on cannabinoid receptor agonists. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016; 21(3): 262-272.

31. Dhawan B.N., Cesselin F., Raghubir R., Reisine T., Bradley P.B., Portoghese P.S., Hamon M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 1996; 48(4): 567.

32. Peart J.N., Gross G.J. Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment are mediated via different signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(4): H1746.

33. Maslov L.N., Khaliulin I., Oeltgen P.R., Naryzhnaya N.V., Pei J.M., Brown S.A. et al. Prospects for creation of cardioprotective and antiarrhythmic drugs based on opioid receptor agonists. *Med Res Rev.* 2016; 36(5): 871-923.

34. Fryer R.M., Patel H.H., Hsu A.K., Gross G.J. Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardioprotection in the ischemic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281(3): H1184.

35. Xu J., Tian, W. Ma X., Guo J., Shi Q., Jin Y. et al. The Molecular Mechanism Underlying Morphine-Induced Akt Activation: Roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Cell Biochem Biophys.* 2011; 61(2): 303-311.

36. Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J. The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 β . *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(2): H827.

37. Cohen M.V., Downey J.M. Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future. *Br J Pharmacol.* 2015; 172(8): 1913-

1932.

38. Wu X., Zhang B., Fan R., Zhao L., Wang Y., Zhang S. et al. U50,488H inhibits neutrophil accumulation and TNF- α induction induced by ischemia–reperfusion in rat heart. *Cytokine*. 2011; 56(2): 503-507.

39. Peart J.N., Gross G.J. Adenosine and opioid receptor-mediated cardioprotection in the rat:

evidence for cross-talk between receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(1): H81.

40. Halestrap, Clarke A.P. S.J., Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1767(8): 1007-1031.

Статья поступила 25.04.2017

For correspondence:

Khaliulin Igor

Address: 7 Bristol Royal Infirmary,
Upper Maudlin Street, Bristol, BS2 8HW, UK

Tel. +44 117 3422208,

E-mail: i.khaliulin@bristol.ac.uk

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И СЕКРЕТОМ АДИПОЦИТОВ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ И ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

М. Ю. СЕНИЦКИЙ^{1,2}, А. В. ПОНАСЕНКО¹, О. В. ГРУЗДЕВА^{1,3}

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

²*Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия*

³*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово, Россия*

Жировая ткань представляет особый интерес в контексте ее ключевой роли в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, дисфункции эндотелия и миокарда, гипертонии, атеросклероза и ряда других патологических состояний. На настоящий момент накоплено достаточное количество сведений о секреторной функции адипоцитов, что ведет к признанию роли жировой ткани в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы. Изучения молекулярно-генетических основ функционирования жировой ткани может помочь более глубокому пониманию этиопатогенетических механизмов сердечно-сосудистых заболеваний и разработать эффективную стратегию их профилактики и контроля. В данном обзоре проанализирована информация об особенностях профиля адипокинов и цитокинов, секретируемых различными типами жировой ткани (подкожная, эпикардальная, периваскулярная), а также об изменении экспрессии ряда ключевых генов в адипоцитах, полученных из различных жировых депо, у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Ключевые слова: жировая ткань, адипоциты, ожирение, сердечно-сосудистые заболевания, адипокины, экспрессия генов.

GENETIC PROFILE AND SECRETOME OF ADIPOCYTES FROM VISCERAL AND SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES

M. Y. SINITSKY^{1,2}, A. V. PONASENKO¹, O. V. GRUZDEVA^{1,3}

¹*Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia*

²*Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of SB RAS, Kemerovo, Russia*

³*Federal State Budgetary Educational Institution Higher Education Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia*

Adipose tissue is of interest in the context of its role in pathogenesis of cardiovascular diseases, endothelium and myocardium dysfunction, hypertension, atherosclerosis and a number of other pathological conditions. The accumulation of knowledge about secretory functions of adipocytes is leading to recognition of the role of adipose tissue in regulation of cardiovascular system functioning. Studies of molecular-genetic basis of the functioning of adipose tissue can help to understand etiopathogenetic mechanisms of cardiovascular diseases and develop an effective strategy for their prevention and control. In this review, the information about adipokines and cytokines secreted by various types of adipose tissue (subcutaneous, epicardial, perivascular), as well as changes in the expression of key genes in adipocytes obtained from various fat depots in patients with cardiovascular diseases was analyzed.

Key words: Adipose tissue, adipocytes, obesity, cardiovascular diseases, adipokines, gene expression.

Стратегия поиска

В данный обзор включены данные релевантных статей, описывающих особенности секреции и экспрессии генов адипокинов и цитокинов в контексте их влияния на патогенез сердечно-сосудистых заболеваний, опубликованных до мая

2017 г. и представленных в базах данных PubMed и Google Scholar. Поисковые запросы задавались посредством следующих сочетаний слов: для русскоязычных публикаций – «жировая ткань», «адипоциты», «адипокины», «цитокины», «экспрессия генов», «сердечно-сосудистые заболевания»; для англоязычных публикаций – «adipose

tissue», «adipocytes», «adipokines», «cytokines», «gene expression», «cardiovascular diseases».

Введение

Жировая ткань (ЖТ) представляет особый интерес в контексте ее ключевой роли в патогенезе некоторых серьезных патологий, например, диабета 2-го типа и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), а также в развитии таких состояний, как дисфункция эндотелия и миокарда, гипертония, дислипидемия и атеросклероз [1-3]. Накопление сведений о секреторной и эндокринной функции адипоцитов ведет изменению существующих парадигм и признания роли ЖТ в регуляции энергетического гомеостаза, репродуктивной функции, иммунитета и функционирования сердечно-сосудистой системы [1,3,4]. Взаимодействие ЖТ с другими тканями и органами осуществляется посредством множества биологически активных белков, образующих группу адипокинов и/или адипоцитокинов [5]. Первоначально в группу таких белков включали молекулы гормоноподобных веществ (например, лептин или адипонектин), а также провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1, IL-10 и др.), однако более поздние исследования показали сложность человеческого адипокинома, который состоит из сотни различных факторов, многие из которых до сих пор не идентифицированы [4,6,7]. Кроме того, было установлено, что адипокином различных депо ЖТ существенно различается. Известно, что висцеральная (ВЖТ) и подкожная ЖТ (ПЖТ), локализованные в двух наиболее крупных жировых депо, характеризуются уникальными профилями адипокинов [7]. В этом контексте ВЖТ заслуживает особого внимания, так как различные исследования показали положительную корреляцию между количеством висцерального жира и особенностями секрета данного жирового депо и ССЗ [3,7-12]. Важно отметить, что конкретные участки ВЖТ, расположенные вокруг кровеносных сосудов и сердца (периваскулярная [ПВЖТ] и эпикардальная [ЭЖТ] жировая ткань), могут влиять на сердечно-сосудистую функцию миокарда [11,13]. Секретируемые компоненты данной ЖТ могут непосредственно воздействовать на основную сосудистую сеть и вызывать патологические изменения, такие как утолщение стенок сосудов и образования жировых прослоек, и способство-

вать образованию атеросклеротических бляшек [13,14]. Присутствие воспалительных медиаторов в тканях, окружающих эпикардальные коронарные артерии, может приводить к активации сосудистого воспаления, индукции фибротического изменения миокарда, нестабильности атероматозных бляшек и манифестации острых коронарных событий [14].

Принято считать, что профиль адипокинов также изменяется при таких патологических состояниях, как ожирение. В данном случае уровни провоспалительных адипоцитокинов в плазме крови увеличиваются, способствуя развитию хронического воспаления [15]. При ожирении наблюдается также повышенная экспрессия лептина и провоспалительных цитокинов в ПВЖТ, в то время секреция адипонектина, наоборот, снижается [4]. Этой молекуле приписывают кардиопротекторную функцию из-за ее противовоспалительного и антипролиферативного эффекта. Недавно были изучены новые кардиопротективные адипокины, такие как оментин и апеллин [16].

Таким образом, на настоящий момент проблема воздействия различных адипокинов на сосудистую стенку представляет особый интерес. В общей сложности было выявлено более 30 адипокинов, ассоциированных с ССЗ [17]. Наиболее подробно изучены адипокины, способные модулировать процессы миграции и пролиферации гладкомышечных клеток, что, в свою очередь, играет центральную роль в развитии атеросклероза. Кроме того, известно, что активация адипоцитокинами (такими, как TNF- α и лептин) провоспалительных сигнальных путей в значительной степени провоцирует развитие ССЗ. В этом контексте ведущую роль играет фактор транскрипции NF- κ B, так как его гены-мишени кодируют молекулы адгезии, провоспалительные цитокины и медиаторы пролиферации [17].

Адипонектин и лептин

Адипонектин и лептин являются одними из наиболее хорошо изученных адипокинов в контексте их участия в патогенезе и манифестации ССЗ. Недавно было показано, что в крови пациентов с инфарктом миокарда возрастает концентрация лептина, провоспалительных цитокинов на фоне снижения содержания адипонектина [10]. Известно, что адипонектин оказывает противо-

воспалительный и антиатерогенный эффект. Снижение его концентрации в висцеральном жире эпикарда связано с наличием атеросклероза коронарных артерий [18]. Таким образом, представляется актуальным изучение экспрессии генов адипонектина (ADIPOQ) у пациентов с различными формами сердечно-сосудистых патологий. Так, итальянские ученые в своей работе изучили уровень экспрессии мРНК гена ADIPOQ в ЭЖТ и ПЖТ у 11 мужчин, прошедших процедуру АКШ и 10 мужчин с заменой клапана сердца, а также оценили размер адипоцитов и их ассоциации с инсулиновой резистентностью, концентрацией лептина и адипонектина в плазме. В результате проведенного исследования было установлено, что экспрессия мРНК была достоверно ($P < 0,01$) выше в ПЖТ, чем в ЭЖТ ($10,33 \pm 6,97$ против $6,25 \pm 2,20$). Пациенты с протезом клапана сердца характеризовались некоторым снижением экспрессии мРНК данного гена по сравнению с пациентами, перенесшими АКШ, однако данные различия не были достоверны. Размер адипоцитов (клетки из ЭЖТ были значительно меньше, чем клетки из ПЖТ) положительно коррелировал с инсулиновой резистентностью и содержание лептина в плазме, и отрицательно коррелировал с экспрессией мРНК адипонектина и его циркулирующем уровнем [19].

Сходная тенденция по снижению экспрессии мРНК адипонектина в ЭЖТ по сравнению с ПЖТ была получена в более поздней работе, выполненной С. Vambase и соавторами. В целом, снижение уровня адипонектина с одновременным повышением экспрессии CD-48 и MCP-1 было отмечено в обоих типах изученной ЖТ у пациентов с диабетом 2-го типа по сравнению с пациентами, не страдающими от данного заболевания [20].

Снижение экспрессии ADIPOQ и одновременное увеличение экспрессии лептина (LEP) было установлено при анализе транскриптома адипоцитов, полученных из ЭЖТ пациентов с метаболическим синдромом, подвергнутых процедуре АКШ (в контрольную группу были включены пациенты с метаболическим синдромом, не осложненным ССЗ). Нужно отметить, что экспрессия ADIPOQ не менялась в ПЖТ в изученных группах, в то время как более активно экспрессировался LEP и в клетках из данного жирового депо [21].

В другой работе был изучен уровень экспрес-

сии гена ADIPOQ, а также TNF- α , CD-45, IL-6, MCP-1 у пациентов, перенесших чрезкожное коронарное вмешательство (введение «голого» металлического стента). ЭЖТ распределена вокруг коронарных артерий, и эндovasкулярные повреждения, вызванные стентированием, провоцируют воспалительные изменения в ЭЖТ, способствуя рестенозу сосудов. В исследовании были включены образцы ($n = 22$) ЭЖТ от 11 пациентов (по два образца на каждого донора), у которых развился рестеноз после проведения стентирования «голыми» металлическими стентами. Один образец был получен из тканей вокруг стента, а другой – из ткани, расположенной вокруг коронарной артерии без стента. В двух образцах авторы не смогли обнаружить экспрессию ADIPOQ, в остальных образцах экспрессия носила гетерогенный характер, однако достоверных различий по ее уровню в тканях, расположенных вблизи стента и в тканях, отдаленных от него, отмечено не было [22].

Известно, что экспрессия ADIPOQ снижается у пациентов с гипертонией [23], а также с ИБС [24,25], несмотря на увеличение объема ЭЖТ [26] по сравнению с контрольной группой. В то же время для ПЖТ отмечено незначительное повышение экспрессии данного гена у пациентов с ИБС [27].

В недавнем исследовании пациентов с ИБС, выполненном коллективом российских исследователей, были получены результаты, согласующиеся с данными других ученых. Так, в адипоцитах ЭЖТ была отмечена более низкая концентрация адипонектина по сравнению с ПЖТ и одновременное повышение концентрации лептина [12].

В ряде работ была показана взаимосвязь между уровнем секреции адипокинов ЭЖТ и инсулиновой резистентностью [28] и кальцификацией коронарных артерий [29]. Таким образом, отдельный интерес представляет изучение изменения экспрессии адипонектина при обработке адипоцитов различными концентрациями глюкозы. Так, Fernandez-Trasancose с соавторами индуцировали адипогенез в образцах ЭЖТ и ПЖТ, полученных от пациентов с ИБС, перенесших хирургическую операцию ($n = 15$, из них 4 – с диабетом 2-го типа и 11 – с ожирением). Адипогенез индуцировался путем обработки препаратов глюкозой в различных концентрациях (117, 200 и 295 мг/дл). После этого измерялась

экспрессия генов ADIPOQ, β -актина (ACTB), рецептора к инсулину (INSR) и GLUT-4 с помощью метода real-time ПЦР. В результате исследования была получена U-образная кривая зависимости экспрессии гена адипонектина от концентрации глюкозы, но только для образцов ЭЖТ (концентрация глюкозы в 200 мг/дл не модифицировала уровень экспрессии ADIPOQ, что достоверно отличалось от эффектов концентрации в 117 и 295 мг/дл), в то время как общий уровень экспрессии данного гена был достоверно выше в адипоцитах из ПЖТ в сравнении с адипоцитами из ЭЖТ. Кроме того, адипоциты из ПЖТ отвечали повышенной экспрессии гена ADIPOQ в ответ на действие всех трех концентраций глюкозы. Оценка экспрессии других генов показала только одно достоверное превышение – по гену GLUT-4 в ЭЖТ при экспозиции самой высокой концентрацией глюкозы. В клетках ПЖТ значимых различий получено не было [30].

В работе научной группы из Дании были изучены концентрации адипонектина, лептина и ЖК-связывающего белка адипоцитов (AFABP) у 37 пациентов после кардиохирургических операций. Было установлено, что средняя концентрация лептина в перикардиальной жидкости составила 4,3 мкг/л и была сопоставима с концентрацией данного адипокина в плазме крови (5,9 мкг/л). Концентрация AFABP была значительно выше (73 против 8,4 мкг/л), а концентрация адипонектина была значительно ниже (2,8 против 13 мг/л) в перикардиальной жидкости, чем в плазме. Концентрация адипонектина в перикардиальной жидкости в отличие от плазмы не была достоверно связана с возрастом, индексом массы тела, содержанием триглицеридов в плазме или ИБС. Уровень адипонектина, но не AFABP в перикардиальной жидкости, был связан с размером эпикардиальных адипоцитов. Таким образом, у пациентов с заболеваниями сердца и сосудов в перикардиальной жидкости наблюдается повышение концентрации AFABP и снижение концентрации адипонектина [31].

Известно, что висцеральный жир оказывает влияние на патогенез атеросклероза коронарных артерий, однако характер такого влияния изучен еще не в достаточной степени. В частности, неясно, оказывает ли увеличение ЭЖТ такой же эффект на коронарный атеросклероз, как увеличение абдоминального висцерального жира. В исследовании 164 пациентов, страдающих

ИБС (возраст 65 ± 10 лет; 70% мужчин; индекс массы тела – $23,8 \pm 3,6$ кг/м²), у которых была измерена концентрация адипонектина, IL-6, VEGF и серпина E1 в плазме. Было установлено, что концентрация адипокинов (в том числе и лептина) не коррелировала с объемом ЭЖТ. В то же время концентрация адипонектина в плазме достоверно коррелировала с количеством абдоминального жира у пациентов с коронарным атеросклерозом ($r = 0,49$). Таким образом, можно предположить, что механизмы влияния ЭЖТ на развитие коронарного атеросклероза уникальны и отличаются от механизмов, описанных для абдоминальной ЖТ [32]. В недавнем обзоре приведены данные о том, что выработка адипонектина также снижалась в ПЖТ у пациентов, страдающих от атеросклероза [11].

Интересно, что мРНК адипонектина и лептина более активно экспрессируется у женщин, чем у мужчин. Подобные различия у пациентов с разной половой принадлежностью были обнаружены при изучении 46 пациентов, перенесших кардиохирургические операции (например, АКШ или протезирование клапанов в митральной/аортальной позиции). При этом общий уровень экспрессии данных адипокинов был ниже в ЭЖТ, чем в ПЖТ, что согласуется с имеющимися литературными данными [33].

Также имеется работа, посвященная изучению изменения экспрессии мРНК ряда адипокинов и провоспалительных цитокинов в течение кардиохирургической операции. Результаты исследования, выполненного в Чехии, не показали значимых различий по уровню экспрессии лептина и адипонектина в ЭЖТ и ПЖТ в течение операции [34].

DPP-4 (Dipeptidyl Peptidase-4)

Данные полного протеомного профилирования секрета адипоцитов позволили идентифицировать DPP-4 в качестве нового адипокина [35]. DPP-4 представляет собой повсеместно экспрессируемую на клеточной поверхности протеазу, которая широко известна в качестве регулятора уровня глюкозы в крови, реализующегося путем расщепления и инактивации инкретиннов. Концентрации DPP-4 положительно коррелируют с различными параметрами метаболического синдрома, такими как индекс массы тела, уровень лептина и инсулина, и увеличиваются при

воспалительных заболеваниях и атеросклерозе [35]. Интересно, что сравнение различных жировых депо показало, что самая высокая экспрессия белка DPP-4 отмечается в ВЖТ пациентов с ожирением (пятикратное превышение) по сравнению с ПЖТ [35,36]. В дополнение к своей пептидазной активности, еще одной важной функцией DPP-4 является ее взаимодействие с различными лигандами, в том числе с аденозиндезаминазой, кавеолом-1, рецептором тромбоспандина-2 и фибронектином [37]. Связывание DPP-4 с данными лигандами играет определенную роль в различных процессах, в том числе иммунорегуляторных функциях. Недавние исследования показали, что DPP-4 может оказывать как прямое, так и косвенное воздействие на функционирование сердечно-сосудистой системы. Существуют данные о том, что ингибиторы DPP-4 оказывают важные протективные эффекты на сердечно-сосудистую систему, в частности способствуют репарации эндотелия, обладают противовоспалительным эффектом и снижают ишемические повреждения. В частности, *dpp4*^{-/-} мыши обладали лучшей выживаемостью после инфаркта миокарда по сравнению с *dpp4*^{+/+} мышами [38]. В то же время, ингибирование DPP-4 было ассоциировано с тенденцией к повышению риска инсульта у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа [39]. В другой работе по изучению влияния терапии диабета на состояние сердечно-сосудистой системы, напротив, были показаны нейтральные эффекты ингибитора DPP-4 на риск инфаркта миокарда и инсульта [40]. Было также обнаружено, что секреция DPP-4 адипоцитами возрастает при воздействии на данные клетки фактором роста FGF-21 [41]. Все вышеперечисленные результаты свидетельствуют о сложности и комплексном характере эффектов адипокина DPP-4 на сердечно-сосудистую систему. При этом следует отметить, что исследований особенностей генной экспрессии данного адипокина у пациентов с ССЗ на настоящий момент не проводилось.

Липокалин-2 и висфатин

Липокалин-2 представляет собой небольшой липид-связывающий белок с неизвестными еще лигандами [42], в большей степени экспрессирующийся зрелыми адипоцитами. Несмотря на хорошо изученную роль липокалина в иммунном

ответе на бактериальные инфекции, есть также свидетельства о его роли как провоспалительного адипокина в ожирении и связанных с ним метаболических заболеваниях. Наблюдается увеличение циркулирующего липокалина у пациентов с атеросклерозом, гипертонией, ишемической болезнью сердца и коронарными ССЗ [15]. Повышение его концентрации может рассматриваться как предиктор смертности после инфаркта миокарда. Кроме того, липокалин отмечается в атеросклеротических бляшках в ассоциации с повышением активности MMP-9.

Висфатин был впервые описан как адипокин, связывающий и активирующий рецепторы инсулина, а также активатор липогенеза и стимулятор поглощения глюкозы [43]. Помимо его роли в развитии диабета 2-го типа и метаболического синдрома [44,45], висфатин рассматривается в качестве маркера эндотелиальной дисфункции у больных сахарным диабетом 2-го типа и у пациентов с заболеванием почек. У пациентов с метаболическим синдромом и сахарным диабетом 2-го типа, циркулирующие уровни висфатина были предложены в качестве маркера развития атеросклероза сонных артерий [44,46], а также было отмечено локальное повышение его продукции адипоцитами ПЖТ при атеросклерозе коронарных артерий и аорты [47], при этом особенности экспрессии мРНК у пациентов данными диагнозами не изучались.

Ометин и апеллин

Как адипокин, ометин был впервые описан в 2005 году, когда он был идентифицирован с помощью библиотеки кДНК ЖТ сальника [48]. Ометин сильнее экспрессируется в ВЖТ, чем в ПЖТ. Кроме того, этот адипокин преимущественно экспрессируется в стромально-сосудистой фракции ЖТ, и его экспрессия значительно уменьшается у пациентов с ожирением. Первая функция ометина как адипокина заключается в том, что он усиливает поглощение глюкозы, стимулируемое инсулином. Кроме того, ометин также был описан как кардиопротекторный фактор [49,50]. Эффекты и функции апеллина сходны с функциями ометина, при этом он был описан в качестве адипокина, оказывающего протективное воздействие на кардиомиоциты [51]. Работ по изучению экспрессии генов, кодирующих данные белки, в контексте развития ССЗ нам также не удалось обнаружить.

FABP-4, RBR-4, P53, S100A9, sPLA2-IIA

S100A9 (calgranulin B) – кальций-связывающий белок, который может модифицировать воспаление и оксидативный стресс и ассоциирован с атеросклерозом и ожирением [52,53]. Одним из генов, который может регулировать транскрипцию S100A9, является p53. В недавнем исследовании был изучен уровень экспрессии таких генов, как FABP-4, RBR-4 (адипогенные гены), P53 и S100A9 (гены контроля клеточного цикла) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Адипоциты и стромальные клетки были получены из ЭЖТ и ПЖТ от 48 пациентов, подвергнутых аортокоронарному шунтированию (АКШ) и/или заменой клапана. Диаметр адипоцитов измеряли с помощью оптической микроскопии. Было обнаружено, что в адипоцитах ЭЖТ в значительно более низкой степени экспрессируются изучаемые гены, чем в адипоцитах ПЖТ. В то же время пациенты с ожирением характеризовались повышением экспрессии данных генов по сравнению с пациентами без данной патологии. Увеличение размера адипоцитов было связано с экспрессией FABP4, S100A9 и p53 в клетках ПЖТ, и только с экспрессией p53 в клетках ЭЖТ у пациентов с ожирением ($p = 0,003$). Экспрессия p53, но не S100A9 в адипоцитах ЭЖТ связана с увеличением адипоцитов у пациентов с ожирением и ССЗ [54].

Сходные результаты были получены при изучении экспрессии мРНК гена p53 у 63 пациентов с сердечной недостаточностью [55]. Было установлено, что в ЭЖТ p53 экспрессируется активнее, чем в ПЖТ ($1,73 \pm 0,07$ против $1,69 \pm 0,04$, $P < 0,001$), и уровень экспрессии был выше у пациентов с сердечной недостаточностью ($1,75 \pm 0,07$ против $1,70 \pm 0,04$, $P < 0,01$ в ЭЖТ и $1,70 \pm 0,04$ против $1,67 \pm 0,04$, $P < 0,05$ в ПЖТ). Кроме того, уровень экспрессии p53 отрицательно коррелировал с концентрацией адипонектина в ЭЖТ. После адренергической стимуляции изопреналином экспрессия p53 в ЭЖТ увеличивалась. Данные результаты могут быть объяснены тем, что белок p53 является опухолевым супрессором, который регулирует репарацию ДНК, остановку клеточного цикла и апоптоз [56], а также контролирует адипогенез [57]. Он оказывает влияние на небольшие адипоциты, контролирует экспрессию генов, кодирующих белки, участвующих в нейтрализации активных форм кислорода (АФК),

и, возможно, повышает липогенные возможности данных клеток. Слишком низкая экспрессия белка p53 может приводить к утрате его функций и повреждению клеток за счет действия АФК и липотоксических эффектов [58].

В 2010 году впервые было описано повышение экспрессии белка sPLA2-IIA (secretory type II phospholipase A2) в ЭЖТ у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми донорами ($49,3 \pm 13$ против $17,4 \pm 9,7$ $P < 0,01$), при этом уровень экспрессии был выше в ЭЖТ, чем в ПЖТ ($P < 0,001$). Данные результаты позволили сделать предположение о возможности использования данной фосфолипазы в качестве независимого фактора риска для ИБС [59].

Цитокины

Помимо вышеописанных адипокинов, ЖТ продуцирует ряд цитокинов, обладающих про- и противовоспалительными эффектами, в том числе фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкины (IL) -1, -6, -8, макрофагальный хемотаксический протеин-1, ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), фактор комплемента C3 и ряд других. Данные молекулы ассоциированы с развитием воспалительного ответа и тканевых изменений при гипоксии. Кроме того, PAI-1 усиливает пролиферацию гладкомышечных клеток, а C3 компонент комплемента способствует миграции фибробластов. По имеющимся данным, содержание провоспалительных цитокинов в ПЖТ существенно возрастает при атеросклерозе, артериальной гипертензии и ожирении [11].

Изменение цитокинового профиля у пациентов с ССЗ и связь данного феномена с ЖТ подтверждается исследованием концентрации IL-6 в плазме крови 216 пациентов из Японии, страдающих от атеросклероза коронарных артерий. Так, была обнаружена достоверная корреляция концентрации циркулирующего IL-6 с количеством абдоминального висцерального жира у пациентов, в результате чего было предположено, что данное жировое депо может участвовать в механизмах развития атеросклероза коронарных артерий ($r=0,20$) [32]. Помимо увеличения концентрации данного цитокина в крови у больных ССЗ, была также обнаружена и повышенная экспрессия мРНК IL-6 в ЭЖТ (но не в ПЖТ) у пациентов с ИБС по сравнению с пациентами без данного диагноза [24,27]. Кроме того, у пациен-

тов с ИБС в ЭЖТ также была зарегистрирована повышенная экспрессия генов таких цитокинов, как IL-1beta, MCP-1, NPR-C, а в целом экспрессия изученных генов была выше в ЭЖТ, чем в ПЖТ [27].

В работе Sacks et al. (2011) была изучена экспрессия мРНК 70 генов в ЭЖТ и ПЖТ у пациентов с ИБС. В результате проведенных исследований было обнаружено, что 39 из 70 изученных генов характеризуются повышенной экспрессией в ЭЖТ и только 3 – в ПЖТ. Среди наиболее активно экспрессирующихся в ЭЖТ мРНК можно выделить IL-8, который показал трехкратное повышение экспрессии. Однако превышения циркулирующего уровня IL-8 у пациентов с ИБС, в сравнении с контролем, а также достоверных различий по уровню экспрессии его мРНК у пациентов и в контроле отмечено не было [60].

Недавно было продемонстрировано увеличение концентрации циркулирующего TNF-α, а также экспрессии его мРНК как в ЭЖТ, так и в ПЖТ у пациентов с ожирением, страдающих ИБС (37 человек) по сравнению с пациентами без нарушений сердечно-сосудистой системы (20 человек). Данные результаты подтверждают взаимосвязь изменения секретора и транскриптома ЖТ при ССЗ [61]. Сходные результаты были получены и в группе пациентов с метаболическим синдромом, подвергнутых операции АКШ [21].

В адипоцитах ЭЖТ больных ИБС из российской популяции была выявлена более высокая концентрация TNF-α и IL-1 и низкое содержание защитных регуляторных молекул — IL-10 и FGF-beta по сравнению с адипоцитами ПЖТ [12].

Результаты оценки экспрессии провоспалительных цитокинов на различных этапах кардиохирургических операций показали, что экспрессия мРНК TNF-α и CD45 возрастает во время хирургического вмешательства только в ПЖТ, а экспрессия IL-6, резистина и MCP-1 – и в ПЖТ, и в ЭЖТ [34].

Использование транскриптомного анализа для выявления новых адипокинов

Исходя из данных вышеизложенной информации, подробно изучено довольно небольшое количество адипокинов (к числу наиболее изученных можно отнести адипонектин) и генов, задействованных в процессах адипогенеза и секреции адипоцитами белкового продукта. Однако в

литературе встречаются сведения об изучении некоторых других факторов. Так, в адипоцитах ЭЖТ и ПЖТ было проведено сравнение экспрессии 307 генов, задействованных в регуляции ангиогенеза, формировании морфологии сосудов, воспалении и свертывании крови. Из 156 апрегуляторных генов, экспрессируемых в ЭЖТ, 59 были ассоциированы с ангиогенезом и воспалением (например, TNFRSF11B, PLAT, TGFB1, THBS2, HIF1A, GATA6 и SERPINE1), а из 166 даунрегуляторных – 21 ген показал подобные ассоциации (в том числе, ANGPT1, ANGPTL1 и VEGFC). Эти данные свидетельствуют о том, что эпикардальные адипоциты могут принимать участие в значимой модуляции сосудистого воспаления [62].

В результате транскриптомного анализа адипоцитов из разных жировых депо шести мужчин с ИБС, подвергнутых процедуре АКШ, было обнаружено, что ЭЖТ характеризуется повышенной экспрессией рецептора к аденозину (ADORA1), участвующего в патогенезе ишемии миокарда, а также гена простагландинсинтетазы (PTGDS), ассоциированного с прогрессированием атеросклероза. Данные результаты дают представление о биологии ЭЖТ и ее роли в развитии ИБС [63].

Заключение

Накопленные к настоящему моменту данные о секреторной функции жировой ткани и ее роли в патогенезе различных социально-значимых заболеваний, таких как ожирение, сахарный диабет 2-го типа, атеросклероз, артериальная гипертензия, позволяют утверждать о важности продолжения изучения молекулярных основ ее функционирования, что поможет более глубокому пониманию этиопатогенетических механизмов данных заболеваний и разработать эффективную стратегию их профилактики и контроля. Учитывая проблему высокой заболеваемости ССЗ, представляется актуальным изучение белков, секретируемых ЖТ (в особенности ЭЖТ), а также генетического профиля адипоцитов как факторов, влияющих на риск развития и тяжесть протекания различных патологий сердца и сосудов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Gualillo O., Gonzalez-Juanatey J.R., Lago

F. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc Med*. 2007; 17(8): 275-283. doi:10.1016/j.tcm.2007.09.005.

2. Самородская И.В., Кондрикова Н.В. Сердечно-сосудистые заболевания и ожирение. Возможности бариатрической хирургии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015; 3: 53-60. doi:10.17802/2306-1278-2015-3-53-60.

Samorodskaya I.V., Kondrikova N.V. Cardiovascular diseases and obesity. Possibilities of bariatric surgery. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2015; 3: 53-60. [In Russ]. doi:10.17802/2306-1278-2015-3-53-60.

3. Бородкина Д.А., Груздева О.В., Квиткова Л.В., Барбараш О.Л. Можно ли назвать висцеральное ожирение ключевым фактором парадокса ожирения? Проблемы эндокринологии. 2016; 6: 33-39. doi:10.14341/probl2016626?-.?

Borodkina D.A., Gruzdeva O.V., Kvitkova L.V., Barbarash O.L. Is visceral obesity the cause of obesity paradox? *Problems of endocrinology*. 2016; 6: 33-39. [In Russ]. doi:10.14341/probl2016626?-.?

4. Wronkowitz N., Romacho T., Sell H., Eckel G. Adipose Tissue Dysfunction and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Front Horm Res*. 2014; 43: 79-92. doi:10.1159/000360560.

5. Trayhurn P., Drevon C.A., Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle – adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem*. 2011; 117(2): 47-56. doi:10.3109/13813455.2010.535835.

6. Lehr S., Hartwig S., Lamers D., Famulla S., Muller S., Hanisch F.G. et al. Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(1): M111.010504. doi:10.1074/mcp.M111.010504.

7. Yim J., Rabkin S.W. Differences in Gene Expression and Gene Associations in Epicardial Fat Compared to Subcutaneous Fat. *Horm Metab Res*. 2017; 49(5): 327-337. doi:10.1055/s-0042-119202.

8. Bosello O., Zamboni M. Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev*. 2000; 1(1): 47-56.

9. Gaborit B., Venteclef N., Ancel P., Pelloux V., Gariboldi V., Leprince P. et al. Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc*

Res. 2015; 108(1): 62-73. doi:10.1093/cvr/cvv208.

10. Barbarash O., Gruzdeva O., Uchasova E., Dyleva Y., Belik E., Akbasheva O. et al. The role of adipose tissue and adipokines in the manifestation of type 2 diabetes in the long-term period following myocardial infarction. *Diabetol Metab Syndr*. 2016; 8: 24. doi:10.1186/s13098-016-0136-6.

11. Романцова Т.И., Овсянникова А.В. Периваскулярная жировая ткань: роль в патогенезе ожирения, сахарного диабета 2 типа и сердечно-сосудистой патологии. Ожирение и метаболизм. 2015; 12(4): 5-13. doi:10.14341/OMET201545-13.

Romantsova T.I., Ovsiannikova A.V. Perivascular adipose tissue: role in the pathogenesis of obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular pathology. *Obesity and metabolism*. 2015; 12(4): 5-13. [In Russ]. doi:10.14341/OMET201545-13.

12. Груздева О.В., Акбашева О.Е., Дылева Ю.А., Антонова Л.В., Матвеева В.Г. и соавт. Адипокиновый и цитокиновый профили эпикардальной и подкожной жировой ткани у пациентов с ишемической болезнью сердца. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017; 163(5): 560-563.

Gruzdeva O.V., Akbasheva O.E., Dyleva Y.A., Antonova L.V., Matveeva V.G. et al. Adipokinovyj i citokinovyj profili ehpiikardial'noj i podkozhnoj zhirovoj tkani u pacientov s ishemicheskoj boleznyu serdca. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i medicyny*. 2017; 163(5): 560-563. [In Russ].

13. Wu F.G., Wu C.C., Kuo P.L., Wu M.T. Differential impacts of cardiac and abdominal ectopic fat deposits on cardiometabolic risk stratification. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2016; 6: 20. doi:10.1186/s12872-016-0195-5..

14. Venteclef N., Guglielmi V., Balse E., Gaborit B., Cotillard A., Atassi F. et al. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipofibrokines. *Eur. Heart J*. 2015; 36(13): 795-805a. doi: 10.1093/eurheartj/ehv099.

15. Sell H., Habich C., Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2012; 8(12): 709-716. doi:10.1038/nrendo.2012.114.

16. Greulich S., Chen W.J., Maxhera B., Rijzewijk L.J., van der Meer R.W., Jonker J.T. et al. Cardioprotective properties of omentin-1 in type 2 diabetes: evidence from clinical and in vitro studies. *PLoS One*. 2013; 8(3): e59697. doi:10.1371/journal.

pone.0059697.

17. Taube A., Schlich R., Sell H., Eckardt K., Eckel J. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 302(11): H2148-65. doi:10.1152/ajpheart.00907.2011.

18. Rothenbacher D., Brenner H., März W., Koenig W. Adiponectin, risk of coronary heart disease and correlations with cardiovascular risk markers. *Eur Heart J.* 2005; 26(16): 1640-1646.

19. Bambacea C., Telescab M., Zoicoa E., Sepea A., Oliosoa D., Rossia A. et al. Adiponectin gene expression and adipocyte diameter: a comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men. *Cardiovascular Pathology.* 2011; 20(5): e153-156. doi:10.1016/j.carpath.2010.07.005.

20. Bambace C., Sepe A., Zoico E., Telesca M., Oliosoa D., Venturi S. et al. Inflammatory profile in subcutaneous and epicardial adipose tissue in men with and without diabetes. *Heart Vessels.* 2014; 29(1): 42-48. doi:10.1007/s00380-012-0315-9.

21. Gormez S., Demirkan A., Atalar F., Caynak B., Erdim R., Sozer V. et al. Adipose tissue gene expression of adiponectin, tumor necrosis factor- α and leptin in metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Intern Med.* 2011; 50(8): 805-910.

22. Spener R.F., Breda J.R., Pires A.C., Pinhal M.A., Souto R.P. Adiponectin expression in epicardial adipose tissue after percutaneous coronary intervention with bare-metal stent. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2011; 26(3): 427-432.

23. Teijeira-Fernandez E., Eiras S., Grigorian-Shamagian L., Fernandez A., Adrio B., Gonzalez-Juanatey J.R. Epicardial adipose tissue expression of adiponectin is lower in patients with hypertension. *J Hum Hypertens.* 2008; 22(12): 856-863. doi:10.1038/jhh.2008.75.

24. Eiras S., Teijeira-Fernandez E., Shamagian L.G., Fernandez A.L., Vazquez-Boquete A., Gonzalez-Juanatey J.R. Extension of coronary artery disease is associated with increased IL-6 and decreased adiponectin gene expression in epicardial adipose tissue. *Cytokine.* 2008; 43(2): 174-180. doi:10.1016/j.cyto.2008.05.006.

25. Iacobellis G., Pistilli D., Gucciardo M., Leonetti F., Miraldi F., Brancaccio G. et al. Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease. *Cytokine.* 2005; 29(6): 251-255.

26. Bettencourt N., Toshke A.M., Leite D.,

Rocha J., Carvalho M., Sampaio F. et al. Epicardial adipose tissue is an independent predictor of coronary atherosclerotic burden. *Int J Cardiol.* 2011; 158(1): 26-32. doi:10.1016/j.ijcard.2010.12.085.

27. Shibasaki I., Nishikimi T., Mochizuki Y., Yamada Y., Yoshitatsu M., Inoue Y. et al. Greater expression of inflammatory cytokines, adrenomedullin, and natriuretic peptide receptor-C in epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *Regul Pept.* 2010; 165(2-3): 210-217. doi:10.1016/j.regpep.2010.07.169.

28. Iacobellis G., Leonetti F. Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(11): 6300-6302.

29. Mahabadi A.A., Lehmann N., Kalsch H., Robens T., Bauer M., Dykun I. et al. Association of epicardial adipose tissue with progression of coronary artery calcification is more pronounced in the early phase of atherosclerosis: Results from the Heinz Nixdorf recall study. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2014; 7(9): 909-916.

30. Fernández-Trasancos Á., Guerola-Segura R., Paradelo-Dobarro B., Álvarez E., García-Acuña J.M., Fernández Á.L. et al. Glucose and Inflammatory Cells Decrease Adiponectin in Epicardial Adipose Tissue Cells: Paracrine Consequences on Vascular Endothelium. *J. Cell. Physiol.* 2016; 231(5): 1015-1023. doi:10.1002/jcp.25189.

31. Elie A.G., Jensen P.S., Nissen K.D., Geraets I.M., Xu A., Song E. et al. Adipokine Imbalance in the Pericardial Cavity of Cardiac and Vascular Disease Patients. *PLoS One.* 2016; 11(5): e0154693. doi:10.1371/journal.pone.0154693.

32. Harada K., Amano T., Kataoka T., Takeshita M., Harada K., Kunimura A. et al. Impact of abdominal and epicardial fat on the association between plasma adipocytokine levels and coronary atherosclerosis in nonobese patients. *Atherosclerosis.* 2014; 237(2): 671-676. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.014.

33. Iglesias M.J., Eiras S., Piñeiro R., López-Otero D., Gallego R., Fernández A.L. et al. Gender differences in adiponectin and leptin expression in epicardial and subcutaneous adipose tissue. Findings in patients undergoing cardiac surgery. *Rev española Cardiol.* 2006; 59(12): 1252-1260.

34. Kremen J., Dolinkova M., Krajickova J., Blaha J., Anderlova K., Lacinova Z. Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;

91(11): 4620-4627.

35. Lamers D., Famulla S., Wronkowitz N., Hartwig S., Lehr S., Ouwers D.M. et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2011; 60(7): 1917-1925. doi:10.2337/db10-1707.

36. Sell H., Bluher M., Kloting N., Schlich R., Willems M., Ruppe F. et al. Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care*. 2013; 36(12): 4083-4090. doi:10.2337/dc13-0496.

37. Zhong J., Rao X., Rajagopalan S. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2013; 226(2): 305-314. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.012.

38. Fadini G.P., Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1. *Vascul Pharmacol*. 2011; 55(1-3): 10-16. doi:10.1016/j.vph.2011.05.001.

39. Bonnet F., Scheen A.J. Impact of glucose-lowering therapies on risk of stroke in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2017; pii: S1262-3636(17)30075-7. doi:10.1016/j.diabet.2017.04.004.

40. LeBras M.H., Barry A.R., Koshman S.L. Cardiovascular safety outcomes of new antidiabetic therapies. *Am J Health Syst Pharm*. 2017; pii: e285. doi:10.2146/ajhp160279.

41. Berti L., Hartwig S., Irmeler M., Rädle B., Siegel-Axel D., Beckers J. et al. Impact of fibroblast growth factor 21 on the secretome of human perivascular preadipocytes and adipocytes: a targeted proteomics approach. *Arch Physiol Biochem*. 2016; 122(5): 281-288.

42. Wang Y. Small lipid-binding proteins in regulating endothelial and vascular functions: focusing on adipocyte fatty acid binding protein and lipocalin-2. *Br J Pharmacol*. 2012; 165(3): 603-621. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01528.x.

43. Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M., Segawa K., Tanaka M., Kishimoto K. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005; 307(5708): 426-430.

44. Romacho T., Sanchez-Ferrer C.F., Peiro C. Visfatin/Nampt: an adipokine with cardiovascular impact. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 946427. doi:10.1155/2013/946427.

45. Sommer G., Garten A., Petzold S., Beck-Sickingher A.G., Bluher M., Stumvoll M. et al. Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and

potential function of a novel adipokine. *Clin Sci (Lond)*. 2008; 115(1): 13-23. doi:10.1042/CS20070226.

46. Filippatos T.D., Randeve H.S., Derdemezis C.S., Elisaf M.S., Mikhailidis D.P. Visfatin/PBEF and atherosclerosis-related diseases. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010; 8(1): 12-28.

47. Spiroglou S.G., Kostopoulos C.G., Varakis J.N., Papadaki H.H. Adipokines in Periaortic and Epicardial Adipose Tissue: Differential Expression and Relation to Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2010; 17(2): 115-130. doi:10.5551/jat.1735.

48. Tan B.K., Adya R., Randeve H.S. Omentin: a novel link between inflammation, diabetes, and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2010; 20(5): 143-148. doi:10.1016/j.tcm.2010.12.002.

49. Yamawaki H. Vascular effects of novel adipocytokines: focus on vascular contractility and inflammatory responses. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34(3): 307-310.

50. Moreno-Navarrete J.M., Ortega F., Castro A., Sabater M., Ricart W., Fernandez-Real J.M. Circulating omentin as a novel biomarker of endothelial dysfunction. *Obesity (Silver Spring)*. 2011; 19(8): 1552-1559. doi:10.1038/oby.2010.351.

51. Barnes G., Japp A.G., Newby D.E. Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart*. 2010; 96(13): 1011-1016. doi:10.1136/hrt.2009.191122.

52. Averill M.M., Barnhart S., Becker L., Li X., Heinecke J.W., Leboeuf R.C. et al. S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation*. 2011; 123(11): 1216-1226. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.985523.

53. Zhao F., Hoechst B., Duffy A., Gamrekashvili J., Fioravanti S., Manns M.P. et al. S100A9 a new marker for monocytic human myeloid derived suppressor cells. *Immunology*. 2012; 136(2): 176-183. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03566.x.

54. Agra R.M., Fernández-Trasancos Á., Sierra J., González-Juanatey J.R., Eiras S. Differential association of S100A9, an inflammatory marker, and p53, a cell cycle marker, expression with epicardial adipocyte size in patients with cardiovascular disease. *Inflammation*. 2014; 37(5): 1504-1512. doi:10.1007/s10753-014-9876-3.

55. Agra R.M., Teixeira-Fernández E., Pascual-

Figal D., Sánchez-Más J., Fernández-Trasancos A., González-Juanatey J.R. et al. Adiponectin and p53 mRNA in epicardial and subcutaneous fat from heart failure patients. *Eur J Clin Invest.* 2014; 44(1): 29-37. doi:10.1111/eci.12186. Epub 2013 Nov 14.

56. Zhao R., Xiang N., Domann F.E., Zhong W. Expression of p53 enhances selenite-induced superoxide production and apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66(4): 2296-304.

57. Molchadsky A., Shats I., Goldfinger N., Pevsner-Fischer M., Olson M., Rinon A. et al. p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS ONE.* 2008; 3(11): e3707. doi:10.1371/journal.pone.0003707.

58. Bazuine M., Stenkula K.G., Cam M., Arroyo M., Cushman S.W. Guardian of corpulence: a hypothesis on p53 signaling in the fat cell. *Clin Lipidol.* 2009; 4(2): 231-243.

59. Dutour A., Achard V., Sell H., Naour N., Collart F., Gaborit B. et al. Secretory type II phospholipase A2 is produced and secreted by epicardial adipose tissue and overexpressed in patients with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(2): 963-967. doi:10.1210/jc.2009-1222.

60. Sacks H.S., Fain J.N., Cheema P., Bahouth S.W., Garrett E., Wolf R.Y. et al. Depot-specific overexpression of proinflammatory, redox, endothelial cell, and angiogenic genes in epicardial fat adjacent to severe stable coronary atherosclerosis. *Metab Syndr Relat Disord.* 2011; 9(6): 433-439. doi:10.1089/met.2011.0024.

61. Bilgic Gazioglu S., Akan G., Atalar F., Erten G. PAI-1 and TNF- α profiles of adipose tissue in obese cardiovascular disease patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(12): 15919-15925.

62. Chatterjee T.K., Aronow B.J., Tong W.S., Manka D., Tang Y., Bogdanov V.Y. et al. Human coronary artery perivascular adipocytes overexpress genes responsible for regulating vascular morphology, inflammation, and hemostasis. *Physiol Genomics.* 2013; 45(16): 697-709. doi:10.1152/physiolgenomics.00042.2013.

63. Guauque-Olarte S., Gaudreault N., Piche M.E., Fournier D., Mauriege P., Mathieu P. et al. The transcriptome of human epicardial, mediastinal and subcutaneous adipose tissues in men with coronary artery disease. *PLoS One.* 2011; 6(5): e19908. doi:10.1371/journal.pone.0019908.

Статья поступила 28.06.2017

Для корреспонденции:

Понасенко Анастасия Валериевна

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7 (3842) 64-41-56,

E-mail: ponaav@kemcardio.ru

For correspondence:

Ponassenko Anastasia

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, 650002,

Russian Federation

Тел. +7 (3842) 64-41-56,

E-mail: ponaav@kemcardio.ru

ВОЗМОЖНОСТИ ФИЗИЧЕСКИХ ТРЕНИРОВОК КАК ФАКТОРА ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПЕРЕД ВЫПОЛНЕНИЕМ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Ю. А. АРГУНОВА, С. А. ПОМЕШКИНА, А. А. ИНОЗЕМЦЕВА

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

Коронарное шунтирование (КШ) сохраняет ведущую позицию в хирургическом лечении ишемической болезни сердца (ИБС). Предоперационная подготовка (преабилитация) и послеоперационная реабилитация имеют важное значение в реализации положительных эффектов реваскуляризации миокарда. Одним из методов кардиопротекции в предоперационном периоде КШ выступает ишемическое прекондиционирование. Перспективным методом достижения эффектов ишемического прекондиционирования в предоперационном периоде могут рассматриваться физические тренировки, обладающие инфаркт-лимитирующим, антиаритмическим эффектами, улучшающие функцию эндотелия, что положительно сказывается на результатах оперативного лечения.

Ключевые слова: коронарное шунтирование, преабилитация, ишемическое прекондиционирование, физические тренировки.

POTENTIAL BENEFITS OF EXERCISE TRAINING AS A FACTOR OF ISCHEMIC PRECONDITIONING PRIOR TO CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING (REVIEW)

Y. A. ARGUNOVA, S. A. POMESHKINA, A. A. INOZEMTSEVA

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia

Coronary artery bypass grafting (CABG) remains the gold-standard treatment for coronary artery disease (CAD). Preoperative management (prehabilitation) and postoperative rehabilitation are pivotal for positive effects of myocardial revascularization. Ischemic preconditioning is one of the methods for cardioprotection in the preoperative period. Exercise trainings may have beneficial effects on ischemic preconditioning in the preoperative period, limiting infarct size, producing antiarrhythmic effects, and improving endothelial function. Exercise trainings produce beneficial effects on the outcomes of surgical treatment.

Keywords: coronary artery bypass grafting, prehabilitation, ischemic preconditioning, exercise training.

В настоящее время число проводимых вмешательств по реваскуляризации миокарда у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), в том числе коронарного шунтирования (КШ), продолжает неуклонно расти [1]. Эта тенденция актуализирует вопросы подготовки пациентов к хирургическому вмешательству и послеоперационного ведения.

На современном этапе все большее внимание уделяется разработке комплексного подхода к послеоперационной реабилитации пациентов, подвергшихся прямой реваскуляризации миокарда. Неоспоримым фактом является то, что кардиореабилитация показана всем пациентам после операции КШ, выступает эффективным и

безопасным средством вторичной профилактики [2-4]. В 2016 году в Российской Федерации активно обсуждался проект Российских клинических рекомендаций «Коронарное шунтирование больных ишемической болезнью сердца: реабилитация и вторичная профилактика», в которых предложен комплексный этапный подход с вовлечением мультидисциплинарной команды [5].

Необходимость реабилитационных программ в послеоперационном периоде является общепризнанным фактом. В последние годы в России, несмотря на существующие организационные трудности, реабилитация переживает ренессанс, и для пациентов с КШ внедряется ее трехэтапная система.

Однако программа предоперационной подготовки пациента (преабилитация) в настоящее время не имеет широкого распространения в клинической практике. В то же время подготовка пациента к достаточно сложному хирургическому вмешательству, которым, несомненно, является КШ, представляется актуальной задачей [5]. Важность данного направления актуализирует также сохраняющаяся высокая частота развития осложнений интра- и послеоперационного периодов. Так, несмотря на достижения кардиохирургии и кардиоанестезиологии частота развития интраоперационных инфарктов миокарда, например, варьирует от 4 до 80% в зависимости от критериев диагностики [6].

Существующая практика подготовки пациента к любому плановому кардиохирургическому вмешательству как за рубежом, так и в крупных российских кардиохирургических центрах, заключается только в оценке предоперационного статуса пациента накануне операции по заключениям специалистов амбулаторного (стационарного) звена, выполненного по месту его жительства. Следует согласиться с этой позицией, поскольку система организации медицинской помощи и принципы ее финансирования распределяют «сферы ответственности» при выполнении высокотехнологичных вмешательств таким образом, чтобы каждый этап оказания медицинской помощи имел свои задачи.

Однако существуют вопросы, требующие активного междисциплинарного обсуждения. Так, процент коморбидной патологии, выявляемой у российских пациентов перед проведением кардиохирургических вмешательств, оказался меньший, чем у европейских и американских [7]. Это наиболее ярко прослеживается при анализе частоты выявления сахарного диабета. По видимому, причиной тому является инертность «амбулаторного этапа» в активном скрининге пациентов с ИБС на выявление нарушений углеводного обмена. Результаты таких скрытых коморбидных состояний для пациентов, подвергающихся хирургическим вмешательствам, плачевны.

Еще одной важной задачей предоперационного периода является возможность реализовать эффекты предоперационной органопротекции. Известно, что любое кардиохирургическое вмешательство с использованием искусственного кровообращения сопряжено с ишемическим и реперфузионным повреждением миокарда. Ре-

зультатом этих феноменов являются периоперационные инфаркты миокарда и сердечная недостаточность.

Вопросу кардиопротекции и повышения устойчивости кардиомиоцитов к ишемии в настоящее время уделяется большое внимание исследователей. Особенно актуальной эта проблема представляется в аспекте защиты миокарда от реперфузионного повреждения у больных с ИБС при проведении реваскуляризации миокарда, в том числе при выполнении операции КШ [8, 9]. Одним из доступных методов оптимизации защиты клетки от ишемического повреждения является ишемическое прекондиционирование. В экспериментальных исследованиях показано, что кратковременная ишемия миокарда, инициируя каскад биохимических процессов в кардиомиоцитах, активирует внутриклеточные сигнальные системы и приводит к запуску защитных адаптационных механизмов, позволяющих миокарду адаптироваться к более продолжительным последующим эпизодам ишемии [10, 11].

Впервые феномен ишемического прекондиционирования был описан Murty С.Е. с соавторами [12]. Было показано, что короткие эпизоды ишемии (продолжительностью 5 минут) защищают сердце от ишемического повреждения в период последующей длительной гипоксии в течение 40 минут. При этом зона инфаркта сокращается на 75%. В дальнейшем инфарктимитирующий эффект ишемического прекондиционирования был подтвержден на многих экспериментальных моделях [13]. По данным Национального института сердца, легких и крови (США), ишемическое прекондиционирование наряду с ранней реперфузией является одним из наиболее эффективных методов защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения [14, 15].

На современном этапе выделяют раннюю и позднюю фазы ишемического прекондиционирования в зависимости от продолжительности временного интервала между прекондиционирующим стимулом и эпизодом ишемии. Раннее прекондиционирование наступает через 5-120 минут после нанесения стимула и имеет кратковременный кардиопротективный эффект до 60-90 минут. Поздняя фаза характеризуется более длительным эффектом кардиопротекции, до трех суток, и наступает через 24-96 часов после прекондиционирующего стимула [16, 17].

Первоначально предполагалось, что эффект

ишемического preconditionирования является результатом открытия коллатеральных сосудов [18], однако в последующем был показан кардиопротективный эффект preconditionирования независимо от изменения коронарного кровотока [19]. В современных исследованиях механизм ишемического preconditionирования представлен тремя этапами: триггерным, медиаторным и эффекторным. Триггерный этап характеризуется накоплением в миокарде ряда веществ, которые запускают активацию внутриклеточных ферментов (протеинкиназ типов В и С, цитоплазматической тирозинкиназы, митогенактивируемых протеинкиназ). Активация внутриклеточных ферментов и их взаимодействие объединяют в медиаторный этап. Эффекторная стадия включает в себя активацию внутриклеточных мишеней, отвечающих за реализацию защиты миокарда [17, 20]. В качестве триггеров рассматриваются аденозин, брадикинин, опиоидные пептиды, а также оксид азота (NO), ионы кальция и свободные радикалы кислорода.

Наименее изученным является эффекторный этап preconditionирования. В настоящее время известно, что эффекторный этап ишемического preconditionирования реализуется в основном на уровне митохондрий, а именно АТФ-зависимых калиевых каналов митохондрий. Активация этих структур приводит к снижению тока ионов кальция внутрь митохондрий и снижению образования активных форм кислорода [20, 21]. Кроме того, имеются данные также об активации сарколеммальных АТФ-зависимых калиевых каналов, а также K^+ -каналов внутренней мембраны митохондрий [22]. На этапе реперфузии кардиопротективные механизмы ишемического preconditionирования реализуются за счет ингибирования гликогенсинтетазы-киназы 3-бета (ГСК-3 β) путем ее фосфорилирования протеинкиназами типов В и С, что приводит к закрытию митохондриальных пор и снижению трансмембранного тока кальция в митохондрии, это предупреждает их разрушение и гибель кардиомиоцитов [23, 20, 21]. Однако на современном этапе этот взгляд на молекулярные механизмы ишемического preconditionирования подвергается сомнению, и конечные эффекторы preconditionирования остаются до конца не изученными [24].

Важным вопросом остается выбор наиболее эффективного и безопасного варианта preconditionирования миокарда [16]. «Золотым стан-

дартом» кардиопротекции считается локальное ишемическое preconditionирование, обеспечивающее наиболее выраженный защитный эффект, однако его применение ограничивается только кардиохирургической практикой, может выполняться только интраоперационно и имеет краткосрочный эффект [17, 13]. Локальное ишемическое preconditionирование подразумевает кратковременные эпизоды пережатия аорты при выполнении КШ или кратковременное раздувание баллона в коронарной артерии при выполнении чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (ЧТКА). В ходе хирургических операций используются различные методики локального ишемического preconditionирования. В настоящее время эффективность такого вида ишемического preconditionирования доказана в многочисленных исследованиях, результаты которых демонстрируют антиаритмический, инфаркт-лимитирующий и протективный в отношении эндотелия эффекты [25, 26]. Однако, по мнению ряда авторов, предложенные протоколы ишемического preconditionирования имеют ограничения ввиду опасности развития эмболических осложнений у пациентов с выраженными атеросклеротическими изменениями аорты [27, 28].

При выполнении кардиохирургических вмешательств также может быть использован эффективный и неинвазивный метод дистантного preconditionирования [27, 29, 30]. Выделяется три вида дистантного ишемического preconditionирования: внутрисердечное, межорганное и переносимое от сердца донора к сердцу акцептора [23]. Суть внутрисердечного ишемического preconditionирования заключается в том, что короткие эпизоды ишемии одной зоны миокарда защищают от последующей длительной ишемии миокард соседней анатомической зоны. Данный феномен был продемонстрирован Przyklenk K. с соавторами [31], в экспериментальной работе которых было установлено, что короткие эпизоды ишемии, вызванные пережатием огибающей артерии, вызывали повышение устойчивости к ишемии участка миокарда, кровоснабжаемого передней нисходящей артерией. Межорганное ишемическое preconditionирование заключается в том, что при возникновении коротких эпизодов ишемии-реперфузии одного органа происходит повышение устойчивости к ишемии другого органа. В экспериментах на кроликах был доказан эффект ишемического preconditionи-

онирования при переливании перфузата от сердца донора, подвергнутого ишемии-реперфузии, к сердцу акцептора, а также при переливании цельной крови животного, у которого было выполнено локальное ишемическое прекондиционирование [32].

В проведенных исследованиях с участием пациентов кардиохирургического профиля наиболее широкую распространенность получила методика дистантного прекондиционирования, подразумевающая раздувание манжеты для неинвазивного измерения артериального давления на плече. Впервые эффективность методики была продемонстрирована в работе Gunaydin B. с соавторами [33], где было показано увеличение активности лактатдегидрогеназы после применения двух 3-минутных эпизодов компрессии плечевой артерии у пациентов, перенесших КШ. Таким образом, был сделан вывод о реализации протективного эффекта ишемического прекондиционирования путем активации анаэробного гликолиза. Обычно протокол дистантного ишемического прекондиционирования включает в себя 3-5 эпизодов ишемии продолжительностью по 3-5 минут, чередующиеся с пятиминутными интервалами реперфузии [20, 34]. Так, в работе Cho Y.J. с соавторами (2016) [34] у пациентов, планируемых для проведения КШ, применялось 4 цикла 5-минутной компрессии плечевой артерии с последующим пятиминутным расслаблением пневматической манжеты. Было продемонстрировано сокращение числа инфарктов миокарда по сравнению с контрольной группой, в которой дистантное прекондиционирование не применялось, в течение трех лет последующего наблюдения.

Одним из эффективных и безопасных неинвазивных методов достижения эффектов ишемического прекондиционирования могут выступать физические тренировки. Преимущество этого метода у пациентов с ИБС заключается в том, что, помимо протективных эффектов вследствие воздействия ишемического прекондиционирования, физические тренировки обладают доказанной эффективностью в отношении снижения показателей общей и сердечно-сосудистой смертности, повышения качества жизни пациентов [35], обладают липидкорректирующим эффектом [36], уменьшают выраженность системного воспаления [37], позитивно влияют на показатели когнитивного статуса [38].

В настоящее время большой интерес представляет использование физических тренировок высокой интенсивности, позволяющих достигать необходимого эффекта ишемического прекондиционирования у пациентов с ИБС. Так, в исследовании Ляминой Н.П. с соавторами (2014) [39] у пациентов после неполной реваскуляризации миокарда при чрескожных коронарных вмешательствах (ЧКВ) проводился 10-дневный курс ежедневных контролируемых физических тренировок высокой интенсивности (мощность нагрузок составляла 80% от максимальной пороговой нагрузочной мощности). Достижение эффекта ишемического прекондиционирования определялось депрессией сегмента ST и/или появлением стенокардии. На фоне тренировок было продемонстрировано сокращение суммарной продолжительности ишемии и эктопической активности, а также увеличение толерантности к физической нагрузке в группе пациентов с высокоинтенсивными физическими нагрузками по сравнению с группой тренировок средней интенсивности. Схожий протокол тренировок применялся в исследовании Sawatzky J.A. с соавторами (2014) [40] у пациентов, планируемых для выполнения КШ. Было продемонстрировано значимое увеличение толерантности к физической нагрузке (увеличение дистанции при выполнении теста шестиминутной ходьбы) в группе пациентов, выполнявших тренировки. Кроме того 100% пациентов с тренировками в предоперационном периоде были вовлечены в реабилитационные мероприятия в послеоперационном периоде по сравнению с 43% пациентов группы без тренировок на этапе предоперационной подготовки, то есть предоперационная физическая подготовка предопределяет и большую приверженность пациентов к послеоперационной реабилитации.

В исследование Hambrecht R. с соавторами [41] включались пациенты со стабильной ИБС и сохранной ФВ ЛЖ, планируемые для проведения КШ, в ходе которого в качестве кондукта использовалась левая внутренняя грудная артерия. В предоперационном периоде проводился 4-недельный курс контролируемых физических тренировок, интенсивность определялась максимально возможной нагрузкой, не вызывавшей ангинозный болевой синдром. В ходе последующей операции проводилось исследование биоптата левой внутренней грудной артерии в группе физических тренировок и группе контроля.

Авторы показали значимое увеличение эндотелий-зависимой вазодилатации за счет экспрессии эндотелиальной NO-синтазы в группе физических тренировок.

Эффекты такого вида преабилитации проявились и в сокращении сроков пребывания пациентов в послеоперационном периоде в отделении реанимации, а также общего времени госпитализации [42, 43]. Рандомизированное исследование Arthur H.M. с соавторами [42] показало, что пациенты, занимавшиеся физическими тренировками два раза в неделю в период подготовки к КШ, провели меньше времени в отделении интенсивной терапии и в стационаре в целом в послеоперационном периоде. Кроме того, авторы отметили улучшение показателей качества жизни этой группы пациентов в течение 6 месяцев после КШ по сравнению с пациентами, не занимавшимися физическими тренировками на предоперационном этапе.

Проведенные исследования демонстрируют безопасность использования тренировок у пациентов с ИБС перед реваскуляризацией миокарда. В качестве маркеров безопасности в большинстве исследований применялись маркеры некроза миокарда – тропонин, МВ-фракция креатинфосфокиназы (КФК), а также мозговой натрийуретический пептид (BNP) [44]. Показано, что даже тренировки высокой интенсивности не приводили к повреждению миокарда – уровень кардиоспецифических ферментов не отличался от нормативных значений [16, 44].

Полученные данные позволяют использовать физические тренировки на этапе подготовки к реваскуляризации миокарда с целью улучшения эндотелиальной функции, ремоделирования и восстановления артериальной стенки как нативных артерий, так и артерий, используемых в качестве шунтов. Это позволит оптимизировать последующие результаты операции и минимизировать осложнения, связанные со спазмом и окклюзией шунтов в послеоперационном периоде [45]. При достижении ишемии во время физических тренировок высокой интенсивности включаются процессы адаптации как краткосрочного, так и долгосрочного характера. Возможность инициировать развитие феномена ишемического preconditionирования во время применения коротких курсов физических тренировок высокой интенсивности приводит к лучшим и более быстрым результатам кардиопротекции у больных

со сниженным коронарным резервом по сравнению с использованием физических тренировок средней интенсивности [16, 39].

Однако в настоящее время общепринятого протокола preconditionирования с помощью физических тренировок не разработано, каждый исследователь разрабатывает свою программу физических тренировок для изучаемой категории пациентов. Это актуализирует необходимость дальнейших исследований и разработки для каждой категории пациентов единого протокола, основанного на дифференцированном подходе, учитывающем пороговые значения физических нагрузок с точки зрения эффективности и безопасности. Актуальным является выбор категории пациентов, получающих наибольшую пользу от таких тренировок при сохранении безопасности; обосновании наиболее информативных показателей, характеризующих эффективность таких воздействий, а также сроков выполнения и кратности физических тренировок. С учетом существующей системы оказания помощи пациентам кардиохирургического профиля актуальной является и проблема выбора наиболее оптимальных условий проведения такой подготовки (амбулаторный или стационарный этап).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия. Болезни и врожденные anomalies системы кровообращения. М.; 2014.
Bokeriia L.A., Gudkova R.G. Serdechno-sosudistaia khirurgiia. Bolezni i vrozhdennye anomalii sistemy krovoobrashcheniia. Moscow; 2014. [in Russ].
2. Wijns W., Kolh Ph., Danchin N., Di Mario C., Falk V., Folliguet T. et al. ESC/EACTS Guidelines on myocardial Revascularization. The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Eur Heart J. 2010; 31: 2501–2555. doi:10.1093/eurheartj/ehq277.
3. Windecker S., Kolh P., Alfonso F., Collet J.P., Cremer J., Falk V. et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial Revascularization. The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Eur Heart J. 2014; 35(37): 2541-2619.

DOI: 10.1093/eurheartj/ehu278.

4. Hillis L.D., Smith P.K., Anderson J.L., Bittl J.A., Bridges C.R., Byrne J.G. et al. 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2011; 124: e652–e735. doi: 10.1161/CIR.0b013e31823c074e.

5. Бокерия Л.А., Аронов Д.М., Барбараш О.Л., Бубнова М.Г., Князева Т.А., Лямина Н.П. и др. Российские клинические рекомендации. Коронарное шунтирование больных ишемической болезнью сердца: реабилитация и вторичная профилактика. *CardioСоматика*. 2016; 7 (3–4): 5–71.

Bokeriya L.A., Aronov D.M., Barbarash O.L., Bubnova M.G., Knyazeva T.A., Lymina N.P. et al. Russian clinical guidelines. Coronary artery bypass grafting in patients with ischemic heart disease: rehabilitation and secondary prevention. *Cardiosomatics*. 2016; 7 (3–4): 5–71. [in Russ].

6. Осипова О.А., Суязова С.Б., Власенко М.А., Годлевская О.М. Диагностика интраоперационного инфаркта миокарда при хирургической реваскуляризации. Современные проблемы науки и образования. 2012; 3: 44.

Osipova O.A., Suyazova S.B., Vlasenko M.A., Godlevskaya O.M. Perioperative myocardial infarction diagnostics after surgical coronary revascularization. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2012; 3:44. [in Russ].

7. Барбараш О.Л., Семенов В.Ю., Самородская И.В., Евсеева М.В., Рожков Н.А., Сумин А.Н. и др. Коморбидная патология у больных ишемической болезнью сердца при коронарном шунтировании: опыт двух кардиохирургических центров. Российский кардиологический журнал. 2017; 3: 6-13. doi: <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-3-6-13>

Barbarash O.L., Semenov V.Yu., Samorodskaya I.V., Evseeva M.V., Rozhkov N.A., Sumin A.N. Comorbid conditions in patients with coronary artery disease undergoing coronary artery bypass grafting: dual center experience. *Russ J Cardiol*. 2017; 3:6-13. [in Russ]. doi: <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-3-6-13>

8. Радивилко А.С. Профилактика осложнений после операций с искусственным кровообращением (дайджест публикаций). Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.

2016; 3: 117-123. doi: 10.17802/2306-1278-2016-3-117-123.

Radivilko A.S. Prevention of complications after surgery with cardiopulmonary bypass. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2016; 3:117-123. [in Russ]. doi: 10.17802/2306-1278-2016-3-117-123.

9. Williams T., Waksman R., De Silva K., Jacques A., Mahmoudi M. Ischemic preconditioning – an unfulfilled promise. *Cardiovasc Revasc Med*. 2015; 16(2): 101-108. doi: 10.1016/j.carrev.2014.12.010.

10. Лупанов В.П., Максименко А.В. Протективная ишемия в кардиологии. Формы кондиционирования миокарда. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2011; 10(1): 111–119.

Lupanov V.P., Maksimenko A.V. Protective ischemia in cardiology. Myocardial conditioning forms. *Cardiovascular therapy and prevention*. 2011; 10(1): 111–119. [in Russ].

11. Лямина Н.П., Карпова Э.С., Котельникова Е.В. Адаптация к гипоксии и ишемическое прекодиционирование: от фундаментальных исследований к клинической практике. Клиническая медицина. 2014; 2: 23–29.

Lyamina N.P., Karpova E.S., Kotelnikova E.V. Adaptation to hypoxia and ischemic preconditioning: from basic research to clinical practice. *Klinicheskaja medicina*. 2014; 2: 23–29. [in Russ].

12. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74 (5): 1124-1136.

13. Кабанов В.О., Гребенник В.К., Дорофейков В.В., Шешурина Т.А., Курапеев Д.И., Галагудза М.М. Ишемическое прекодиционирование без повторного пережатия аорты во время операций аортокоронарного шунтирования: первые результаты. Вестник северо-западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2013; 3 (4): 23-29.

Kabanov V.O., Grebennik V.K., Dorofeykov V.V., Sheshurina T.A., Kurapeev D.I., Galagoudza M.M.. Ischemic preconditioning without repeated aortic cross-clamp during CABG: early results. *Vestnik severo-zapadnogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta im. I.I. Mechnikova*. 2013; 3 (4): 23-29. [in Russ].

14. Kloner R.A., Bolli R., Marban E., Reinlib L., Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an

NHLBI workshop. *Circulation*. 1998; 97: 1848–1867.

15. Rezende P.C., Rahmi R.M., Uchida A.H., da Costa L.M., Scudeler T.L., Garzillo C.L. et al. Type 2 diabetes mellitus and myocardial ischemic preconditioning in symptomatic coronary artery disease patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2015; 14: 66. doi: 10.1186/s12933-015-0228-x.

16. Лямина Н.П., Карпова Э.С., Котельникова Е.В., Бизяева Е.А. Эндогенная протекция на основе ишемического preconditionирования: возможности защиты миокарда при эндоваскулярном и восстановительном лечении. *Успехи современного естествознания*. 2015; 1: 572-579.

Lyamina N.P., Karpova E.S., Kotelnikova E.V., Bizyaeva E.A. Endogenous protection based on ischemic preconditioning possibility of myocardial protection in endovascular and rehabilitation treatment. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*. 2015; 1: 572-579. [in Russ].

17. Шляхто Е.В., Нифонтов Е.М., Галагудза М.М. Ограничение ишемического и реперфузионного повреждения миокарда с помощью пре- и посткондиционирования: молекулярные механизмы и мишени для фармакотерапии. *Креативная кардиология*. 2007; 1-2: 75-101.

Shljahto E.V., Nifontov E.M., Galagudza M.M. Ogranichenie ishemicheskogo i reperfuzionnogo povrezhdeniya miokarda s pomoshh'ju pre- i postkondicionirovaniya: molekuljarnye mehanizmy i misheni dlja farmakoterapii. *Creative cardiology*. 2007; 1-2: 75-101. [in Russ].

18. Jaffe M.D., Quinn N.K. Warm-up phenomenon in angina pectoris. *Lancet*. 1980; 2: 934–936.

19. Okazaki Y., Kodama K., Sato H., Kitakaze M., Hirayama A., Mishima M., et al. Attenuation of increased regional myocardial oxygen consumption during exercise as a major cause of warm-up phenomenon. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 21: 1597–1604.

20. Баутин А.Е., Карпова Л.И., Маричев А.О., Ташханов Д.М., Науменко В.С., Галагудза М.М. Кардиопротективные эффекты ишемического кондиционирования: современные представления о механизмах, экспериментальные подтверждения, клиническая реализация. *Трансляционная медицина*. 2016; 3 (1): 50–62.

Bautin AE, Karpova LI, Marichev AO, Tashkhanov DM, Naumenko V, Galagudza MM. Cardioprotective effects of ischemic conditioning.

Up-to-date information in physiology, experimental evidences and clinical applications. *Translational Medicine*. 2016; 3 (1): 50–62. [in Russ].

21. Ruiz-Meana M. Ischaemic preconditioning and mitochondrial permeability transition: a long-lasting relationship. *Cardiovasc Res*. 2012; 96(2): 157-159. doi: 10.1093/cvr/cvs177.

22. Hanley P.J., Daut J.K. K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *Ibid*. 2005; 39: 17–50.

23. Лихванцев В.В., Мороз В.В., Гребенчиков О.А., Гороховатский Ю.И., Заржецкий Ю.В., Тимошин С.С. и др. Ишемическое и фармакологическое preconditionирование. *Общая реаниматология*. 2012; VIII (1): 61-66.

Likhvantsev V.V., Moroz V.V., Grebenchikov O.A., Gorokhvatsky Yu.I., Zarzhetsky Yu.V., Timoshin S.S. et al. Ischemic and pharmacological preconditioning. *Obshhaja reanimatologiya*. 2012; VIII (1): 61-66. [in Russ].

24. Верещагин И.Е., Тарасов Р.С., Верещагин Е.И., Ганюков В.И. Методы кардиопротекции при инфаркте миокарда. Современное состояние вопроса. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2016; (4): 44-51. doi:10.17802/2306-1278-2016-4-44-51.

Vereshchagin I.A., Tarasov R.S., Vereshchagin E.I., Ganyukov V.I. Methods cardioprotection in myocardial infarction. Current status of the issue. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2016; (4): 44-51. doi:10.17802/2306-1278-2016-4-44-51. [in Russ].

25. Галагудза М.М. Влияние локального и дистантного preconditionирования на частоту возникновения и выраженность экспериментально индуцированных ишемических тахикардий. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2007; 4: 12–17.

Galagudza M.M. The influence of local and remote myocardial preconditioning on the incidence and severity of experimentally induced ischemic tachyarrhythmias. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2007; 4: 12–17. [in Russ].

26. Laude K., Richard V., Thuillez C. Coronary endothelial cells: a target of ischemia reperfusion and its treatment? *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2004; 97(3): 250-254.

27. Heusch G., Botker H., Przyklenk K., Redington A., Yellon D. Remote ischemic

conditioning. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65(2): 177-195. doi: 10.1016/j.jacc.2014.10.031.

28. Apostolakis E., Baikoussis N.G., Papakonstantinou N.A. The role of myocardial ischemic preconditioning during beating heart surgery: biological aspect and clinical outcome. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2012; 14(1): 68-71. doi: 10.1093/icvts/ivr024.

29. Heusch G. Remote ischemic conditioning: the enigmatic transfer of protection. *Cardiovasc Res.* 2017; 113(1): 1-2. doi: 10.1093/cvr/cvw240.

30. Kleinbongard P., Skyschally A., Heusch G. Cardioprotection by remote ischemic conditioning and its signal transduction. *Pflugers Arch.* 2017; 469(2): 159-181. doi: 10.1007/s00424-016-1922-6.

31. Przyklenk K., Bauer B., Ovize M., Kloner R.A., Whittaker P. Regional ischemic «preconditioning» protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation.* 1993; 87(3): 893—899.

32. Dickson E.W., Lorbar M., Porcaro W. A., Fenton R.A., Reinhardt C.P., Gysembergh A. et al. Rabbit heart can be «preconditioned» via transfer of coronary effluent. *Am. J. Physiol.* 1999; 277(6 Pt 2): 2451-2457.

33. Günaydin B., Cakici I., Soncul H., Kalaycioglu S., Cevik C., Sancak B. et al. Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol. Res.* 2000; 41(4): 493—496.

34. Cho Y.J., Lee E.H., Lee K., Kim T.K., Hong D.M., Chin J.H. et al. Long-term clinical outcomes of Remote Ischemic Preconditioning and Postconditioning Outcome (RISPO) trial in patients undergoing cardiac surgery. *Int J Cardiol.* 2016; 231: 84-89. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.12.146.

35. Perk J., De Backer G., Gohlke H., Graham I., Reiner Z., Verschuren M. et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *Eur. Heart J.* 2012; 33: 1635-1701. doi: 10.1093/eurheartj/ehs092.

36. Kwaśniewska M., Jegier A., Kostka T., Dzikowska-Zaborszczyk E., Rębowska E., Kozińska J. et al. Long-term effect of different physical activity levels on subclinical atherosclerosis in middle-aged men: a 25-year prospective study [Electronic Resource]. *PLoS One.* 2014; 9 (1): e85209. doi: 10.1371/journal.pone.0085209 (date accessed: 22.03.2016).

37. Pinto A., Di Raimondo D., Tuttolomondo A., Buttà C., Milio G., Licata G. Effects of physical

exercise on inflammatory markers of atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 2012; 18(28): 4326-4349.

38. Аргунова Ю.А., Трубникова О.А., Мамонтова А.С., Сырова И.Д., Кухарева И.Н., Малева О.В. и др. Влияние трехнедельного курса аэробных физических тренировок на нейродинамические показатели пациентов, перенесших коронарное шунтирование. *Российский кардиологический журнал.* 2016; 2 (130): 30-36. doi: <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-2-30-36>

Argunova Y.A., Trubnikova O.A., Mamontova A.S., Syrova I.D., Kuhareva I.N., Maleva O.V. et al. The influence of three-week aerobic exercise program on neurodynamic parameters of patients underwent coronary bypass grafting. *Russ J Cardiol.* 2016; 2 (130): 30–36. doi: <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-2-30-36>. [in Russ].

39. Lymina N.P., Kotelnikova E.V., Karpova E., Bizyaeva E., Lyamina S.V. Controlled physical rehabilitation based on ischemic preconditioning phenomenon in patients with ischemic heart disease with diastolic dysfunction. *European Journal of Heart Failure.* 2014; 16 (2): 1747.

40. Sawatzky J.A., Kehler D.S., Ready A.E., Lerner N., Boreskie S., Lamont D. et al. Prehabilitation program for elective coronary artery bypass graft surgery patients: a pilot randomized controlled study. *Clin Rehabil.* 2014; 28(7): 648-657. doi: 10.1177/0269215513516475.

41. Hambrecht R., Adams V., Erbs S., Linke A., Kräinkel N., Shu Y. et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003; 107 (25): 3152-3158.

42. Arthur H.M., Daniels C., McKelvie R., Hirsh J., Rush B. Effect of a preoperative intervention on preoperative and postoperative outcomes in low-risk patients awaiting elective coronary artery bypass graft surgery. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 2000; 133(4): 253-262.

43. Valkenet K., van de Port I.G., Dronkers J.J., de Vries W.R., Lindeman E., Backx F.J. The effects of preoperative exercise therapy on postoperative outcome: a systematic review. *Clin Rehabil.* 2011; 25(2): 99-111. doi: 10.1177/0269215510380830.

44. Бизяева Е.А. Физические тренировки на раннем этапе кардиореабилитации у больных ишемической болезнью сердца с неполной реваскуляризацией миокарда: интенсивность и кардиопротекция. *Бюллетень медицинских Ин-*

тернет-конференций. 2014; 4 (3): 237-239.

Bizjaeva E.A. Fizicheskie trenirovki na rannem
jetape kardioreabilitacii u bol'nyh ishemicheskoy
bolezni'serдца s nepolnoj revaskuljarizaciej
miokarda: intensivnost' i kardioprotekcija. Bulletin
of Medical Internet conferences. 2014; 4 (3): 237-
239. [in Russ].

45. Alkarmi A., Thijssen D.H., Albouaini

K., Cable N.T., Wright D.J., Green D.J., Dawson
E.A. Arterial prehabilitation: can exercise induce
changes in artery size and function that decrease
complications of catheterization? Sports Med. 2010;
40(6): 481-492. doi: 10.2165/11531950-000000000-
00000.

Статья поступила 06.06.17

Для корреспонденции:

Аргунова Юлия Александровна

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7(923)517-03-51,

E-mail: argunova-u@mail.ru

For correspondence:

Argunova Yulia

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,

650002, Russian Federation

Тел. +7(923)517-03-51,

E-mail: argunova-u@mail.ru

ТРЕБОВАНИЯ ДЛЯ АВТОРОВ

*Приняты на заседании Ученого совета
10 февраля 2012 г.*

Редакция научно-практического рецензируемого журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний» просит внимательно ознакомиться с нижеследующими инструкциями по подготовке рукописей для публикации.

Настоящие Правила разработаны на основании требований Гражданского кодекса РФ, Закона РФ «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.1993 г. № 5351-1 с изменениями от 19 июля 1995 г. и 20 июля 2004 г., Закона РФ «О средствах массовой информации» от 27.12.1991 г. № 2124-I с последующими изменениями и регулируют взаимоотношения между издательством в лице редакции научно-практического рецензируемого журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний», в дальнейшем именуемой «Редакция», и автором, передавшим свою статью для публикации в журнал, в дальнейшем именуемый «Автор».

Научно-практический рецензируемый журнал «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний» публикует статьи по широкому спектру проблем медицинской науки и практического здравоохранения, а также по вопросам сердечно-сосудистой патологии. В журнале публикуются обзоры, оригинальные статьи, сообщения из практики, лекции, информационные сообщения. Все представленные материалы рецензируются и обсуждаются редакционной коллегией.

Авторские права и ответственность

Автор(ы), направляя статью в Редакцию, поручает Редакции обнародовать произведение посредством его опубликования в печати. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, приводимой Автором(ами).

Автор(ы), направляя статью в Редакцию, соглашается с тем, что к Редакции журнала переходят неисключительные имущественные права на использование статьи (переданного в Редакцию журнала материала, в т. ч. такие охраняемые объекты авторского права, как фотографии автора, рисунки, схемы, таблицы и т. п.), в том числе на воспроизведение в печати и в сети Интернет; на распространение; на перевод на любые языки народов мира; экспорт и импорт экземпляров журнала со статьей Автор(ов) в целях распространения, на доведение до всеобщего сведения. Указанные выше права Автор(ы) передает Редакции без ограничения срока их действия на территории всех стран мира, в том числе на территории Российской Федерации.

Редакция при использовании статьи вправе снабжать ее любым иллюстрированным материалом, рекламой и разрешать это делать третьим лицам. Редакция и Издательство вправе переуступить полученные

от Автор(ов) права третьим лицам и вправе запрещать третьим лицам любое использование опубликованных в журнале материалов в коммерческих целях.

Автор(ы) гарантирует наличие у него исключительных прав на использование переданного Редакции материала. В случае нарушения данной гарантии и предъявления в связи с этим претензий к Редакции Автор(ы) самостоятельно и за свой счет обязуется урегулировать все претензии. Редакция не несет ответственности перед третьими лицами за нарушение данных автором гарантий.

За Автором(ами) сохраняется право использования его опубликованного материала, его фрагментов и частей в личных, в том числе научных и преподавательских целях. Права на рукопись считаются переданными Автором(ами) Редакции с момента принятия в печать.

Перепечатка материалов, опубликованных в журнале, другими физическими и юридическими лицами возможна только с письменного разрешения Издательства, с обязательным указанием названия журнала, номера и года публикации.

Правила рецензирования рукописей

Статьи, поступающие в Редакцию, направляются на рецензирование высококвалифицированному специалисту, имеющему ученую степень доктора наук и научную специализацию, наиболее близкую к теме статьи.

Рецензенты уведомляются о том, что направленные им рукописи являются интеллектуальной собственностью авторов и относятся к сведениям, не подлежащим разглашению. Рецензентам не разрешается делать копии для своих нужд. Нарушение конфиденциальности возможно только в случае заявления о недостоверности или фальсификации материалов.

Сроки рецензирования в каждом отдельном случае определяются Редакцией с учетом создания условий для максимально оперативной публикации статей. При получении отрицательной рецензии Редакция направляет Автору(ам) замечания, вопросы рецензентов с предложением доработать статью или аргументированно (частично или полностью) опровергнуть мнение Редакции. После исправления работы рецензируются повторно, при повторном несогласии Автор(ов) с мнением рецензента статья направляется на рецензию независимому специалисту. Результаты рецензирования обсуждаются на заседаниях редакционной коллегии, где принимается окончательное решение о публикации работы.

Не допускаются к публикации:

а) статья, оформленная не по требованиям, Автор(ы) которой отказываются от технической доработки статей;

б) статья, Автор(ы) которой не выполняет конструктивные замечания рецензента или аргументированно не опровергает их.

Требования к оформлению статьи

1. Для издания принимаются ранее не опубликованные статьи и другие материалы (обзоры, рецензии и т. д.), соответствующие тематике журнала.

2. Статья должна иметь визу научного руководителя на первой странице и сопроводительное письмо от учреждения, в котором выполнена работа, на имя главного редактора журнала. В редакцию направляется два экземпляра статьи в машинописном виде и один экземпляр в электронном виде на электронный адрес avtor@kemcardio.ru. электронный вариант рукописи представляется в текстовом редакторе MS Word.

3. Последняя страница второго печатного экземпляра статьи собственноручно подписывается Автором(ами). Указываются фамилия, имя, отчество, почтовый адрес и телефон, при наличии — адрес электронной почты Автора, с которым редакция будет вести переписку.

4. На отдельном листе необходимо представить (для публикации в журнале) сведения о каждом Авторе: 1) имя, отчество, фамилия; 2) ученая степень, ученое звание, должность; 3) место работы — учреждение и отдел (кафедра, клиника, лаборатория, группа и др.); 4) полный почтовый служебный адрес и e-mail; 5) номер служебного телефона и факса (см. таблицу ниже).

№	Ф.И.О.	Ученая степень, ученое звание	Должность	Место работы (учреждение, отдел, кафедра, клиника)	Почтовый служебный адрес, e-mail	Служебный телефон, факс

5. Общие требования к оформлению статей:
текстовый редактор – Microsoft Word,
формат бумаги – A4,
поля – 2 см со всех сторон,
шрифт – Times New Roman,
размер шрифта – 14-й кегель,
межстрочный интервал – 1,5,
абзацный отступ – 1,25,
ориентация – книжная,
редактор формул – пакет Microsoft Office,
графики, таблицы и рисунки – черно-белые, цветные, допускается штриховка

УДК (см., например, teacode.com/online/udc или udk-codes.net),

инициалы, фамилия Автора(ов),

полное название представляемой организации (вуза), город, страна – форматирование по левому краю, курсивом, строчными буквами,

название статьи – форматирование по центру, без отступа, прописными буквами,

текст статьи – выравнивание по ширине.

6. Титульный лист в обязательном порядке включает: 1) УДК; 2) название (*полностью набирается заглавными буквами*); 3) инициалы и фамилию Автора(ов); 4) место работы Автора(ов) с указанием города, страны. Все на русском языке. **Эта же информация, исключая УДК, представляется на английском языке.**

7. На отдельном листе излагается краткое резюме статьи (не более 250 слов) на русском языке. Текст резюме структурируется с указанием: *цели, материалов и методов, основных результатов, заключения*. В резюме обзора достаточно отразить основное его содержание. В конце резюме должны быть представлены ключевые слова – не более 6 слов или словосочетаний, определяющих основные понятия. Ниже (*через 2 межстрочных интервала*) приводится резюме и ключевые слова на английском языке.

8. Объем оригинальной статьи не должен превышать 12 страниц, заметок из практики – 5 страниц, обзоров и лекций – до 20 страниц машинописного текста.

9. Текст. Структура текста статьи выбирается Авторами. Желательно, чтобы она отвечала общепринятой структуре для статей данного направления. Например, для статей, содержащих результаты оригинальных исследований, рекомендуются следующие разделы: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение». Каждый элемент статьи должен быть отделен от соседних элементов дополнительным межстрочным интервалом. Обзоры и лекции, статьи по истории медицины, общественному здоровью и здравоохранению могут оформляться иначе. Название статьи и других материалов должно быть адекватным содержанию и по возможности кратким.

Введение статьи, содержащей оригинальные данные, знакомит читателя с изучаемой проблемой, содержит аргументы о необходимости исследования, цели исследования, решаемые задачи.

Раздел **«Материалы и методы»** характеризует: оригинальность и тип исследования, его планирование, контроль систематических ошибок, масштаб и продолжительность исследования, подход к набору участников исследования, критерии их включения и исключения, какие вмешательства оценивались и с чем их сравнивали, какие измерялись исходы и каким образом и т. д. Описываются методы, аппараты и все процедуры так, чтобы другие исследователи могли адекватно воспроизвести подобное исследование. Даются ссылки на общепринятые методы, кратко описываются оригинальные методы. Указываются все использованные лекарства и химические вещества, включая их коммерческие названия, дозы и способы применения. Приводится полный перечень использованных статистических методов анализа и критериев проверки гипотез. Представляют принятый в исследовании критический уровень значимости «р», а также фактическую величину до-

стигнутого для статистического критерия уровня значимости «р» (например, $p=0,237$, $p=0,0016$ или $p<0,001$). Нежелательно использование обобщенных выражений типа « $p<0,05$ » или « $p>0,05$ ». Если статистические критерии имеют ограничения по их применению, указывают, как они проверялись и каковы результаты этих проверок. Для параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения и результаты этой проверки. Рекомендуется дать характеристику массива экспериментальных наблюдений (число наблюдений и число переменных) и определение всем статистическим терминам, пояснить сокращения и обозначения.

Результаты представляются в тексте, таблицах и иллюстрациях в логической последовательности. Недопустимо повторять в тексте содержание таблиц и рисунков. Если средние значения параметров по группам наблюдения представлены столбиковыми диаграммами, рекомендуется указывать 95 %-ный доверительный интервал для каждой средней. В таблице обязательно должно быть показано число наблюдений по каждому признаку, поскольку не у всех объектов исследования зачастую возможно измерение всех исследуемых признаков. Результаты, полученные при расчетах, рекомендуется округлять, средние величины – до десятичных значений, величину среднеквадратичного отклонения (STD) и ошибку средней (SEM) – до сотых значений.

Обсуждение. Выделяются, акцентируются новые и наиболее важные аспекты исследования, формулируются выводы, которые из них следуют. Обсуждаются области возможного применения полученных результатов и их ограничения. Соотносятся оригинальные результаты с другими исследованиями в этой же области. Важно проследить полученные результаты с целью и задачами исследования, необходимо избегать необоснованных заявлений и выводов, не полностью вытекающих из полученных результатов. В обсуждение могут быть включены обоснованные рекомендации и краткое заключение. При необходимости формулируются новые гипотезы, когда это оправдано, но четко обозначается, что это именно только гипотезы и предположения.

10. Таблиц должно быть не более 4. Таблицы даются отдельной страницей. При построении таблиц необходимо все пункты представлять отдельными строками. Таблицы должны располагаться в пределах рабочего поля. При переносе таблицы на другую страницу следует переносить и шапку таблицы. Таблицы должны содержать сжатые, необходимые данные. Каждая таблица печатается с номером, ее названием и пояснением, все цифры, итоги и проценты должны соответствовать приводимым в тексте. Название таблицы выравнивается по центру страницы, номер таблицы выравнивается по левому краю страницы. При необходимости предоставления данных в большем количестве таблиц и рисунков редакция

вправе размещать иллюстрации в виде электронных приложений на сайте журнала с указанием ссылок.

11. Каждый рисунок представляется отдельным файлом на электронном носителе и распечатывается на отдельной странице. Допускается использование рисунков в форматах JPEG, TIFF. Используемое в тексте сканированное изображение должно иметь разрешение не менее 300 точек на дюйм. Рисунки не должны повторять материалы таблиц. Каждый рисунок должен иметь подпись, содержащую номер рисунка. Рисунки должны быть пронумерованы последовательно, в соответствии с порядком, в котором они впервые упоминаются в тексте.

12. Место размещения иллюстративного материала указывается на полях текста статьи с указанием номера рисунка, таблицы.

13. При обработке материала используется система единиц СИ. Статья должна быть тщательно выверена: цитаты, химические формулы, таблицы, дозы визируются авторами на полях. В сноске к цитатам указывается источник (автор, название, издание, год, том, номер, страница). Сокращения допускаются только после того, как указано полное название. В заголовке работы и резюме необходимо указать оригинальное название препарата, в тексте можно использовать торговое название. Специальные термины следует приводить в русском переводе и использовать только общепринятые в научной литературе слова.

14. Список литературы / References

Авторы несут полную ответственность за точность данных, приведенных в приставленном списке литературы. В списке литературы ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

Список литературы представляется на отдельной странице. В списке все работы перечисляются в порядке цитирования, а не в алфавитном порядке.

Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях и лекциях допускается до 20, в обзорах – до 60 источников.

В тексте статьи ссылки на источники приводятся в квадратных скобках арабскими цифрами, например, [1, 3].

Ссылки на русскоязычные статьи, имеющие название на английском языке, приводятся также на английском языке, при этом в конце ссылки указывается [In Russ.].

Если статья не имеет английского названия, вся ссылка транслитерируется на сайте: <http://ru.translit.ru/?account=bgn>. в формате BGN.

Названия журналов на русском языке в списке литературы не сокращаются. Названия иностранных журналов могут сокращаться в соответствии с вариантом сокращения, принятым конкретным журналом.

Если цитируемая статья имеет DOI (digital object identifier, цифровой идентификатор объекта), его необходимо указать после описания статьи.

Для составления описаний в списке литературы используется стандарт на библиографическую ссылку NLM – National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Если количество авторов не превышает 6, в библиографическом описании указываются все авторы. Если количество авторов более 6, следует указать шесть первых авторов и добавить *и др.* или *et al.*

Примеры библиографических описаний

1. *Статья из русскоязычного журнала, имеющая англоязычное название*

Кухарчук А. Л. Стволовые клетки и регенеративно-пластическая медицина. Трансплантология. 2004; 7 (3): 76–90.

Kuharchyk A. L. Stem cells and regenerative-plastic medicine. Transplantologiya. 2004; 7 (3): 76–90. [In Russ.].

2. *Статья из русскоязычного журнала, не имеющая англоязычного названия*

Трапезникова М. Ф., Филиппов П. Я., Перлин Д. В., Кулачков С. М. Лечение структур мочеочечника после трансплантации почки. Урология и нефрология. 1994; 3: 42–45.

Trapeznikova M. F., Filiptsev P. Ya., Perlin D. V., Kulachkov S. M. Lechenie striktur mochetochnika posle transplantatsii pochki. Urologia i nefrologia. 1994; 3: 42–45.

3. *Статья из англоязычного журнала*

Goldstein D. J., Oz M. C., Rose E. A. Implantable left ventricular assist devices. N. Engl. J. Med. 1998; 339: 1522–1533.

4. *Статья из журнала, имеющего DOI*

Kaplan B., Meier-Kriesche H-U. Death after graft loss: An important late study endpoint in kidney transplantation. American Journal of Transplantation. 2002; 2 (10): 970–974. DOI:10.1034/j.1600-6143.2002.21015.x.

5. *Англоязычная монография*

Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

6. *Русскоязычная монография*

Ивашкин В. Т., Шептулин А. А. Методические рекомендации по обследованию и лечению больных с нарушениями двигательной функции желудка. М.; 2008.

Ivashkin V. T., Sheptulin A. A. Metodicheskie rekomendatsii po obsledovaniyu i lecheniyu bol'nykh s narusheniyami dvigatel'noy funktsii zheludka. Moscow; 2008.

7. *Диссертация (автореферат диссертации)*

Максимова Н. В. Клинико-экономический анализ консервативной тактики лечения пациентов с синдромом диабетической стопы в городе Москве. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2011.

Maksimova N. V. Kliniko-ekonomicheskiy analiz konservativnoy taktiki lecheniya patsientov s sindromom diabeticheskoy stopy v gorode Moskve [dissertation]. Moscow; 2011.

8. *Ресурс в сети Internet*

Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

15. Статья должна быть написана грамотно, текст, таблицы и другие материалы тщательно выверены. Рукопись, оформленная не по требованиям, к рассмотрению не принимается и возвращается Автору(ам) на доработку.

16. Редакция оставляет за собой право на редактирование и сокращение текста, не меняющие научного смысла статьи.

17. В случае отклонения статьи Редакция высылает Автору(ам) соответствующее аргументированное и обоснованное уведомление.

Статьи следует направлять в Редакцию по адресу: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; Редакция научно-практического рецензируемого журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Технический редактор

Осипенко Кира Сергеевна

Тел/факс **8 (3842) 64-16-25**. E-mail: avtor@kemcardio.ru

Условие публикации статей в научно-практическом рецензируемом журнале «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний» – **бесплатно**.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Приглашаем вас к сотрудничеству. Вы можете разместить информацию о деятельности вашей компании на страницах журнала в виде научной статьи, доклада или в форме рекламы. По вопросам размещения рекламы обращаться к **Осипенко Кире Сергеевне** по телефону (8-3842) 64-16-25 или e-mail: osipks@kemcardio.ru

Тарифы на размещение рекламных материалов

Площадь на полосе	Черно-белая печать, руб.	Полноцветная печать, руб.
1/1 165 × 260 мм (A4)	12 000	24 000
1/2	6 000	12 000
1/4	3 000	6 000
1/8	1 500	3 000
1/16	800	1 500
Текстовая реклама	120 руб. за 1 см ²	
Научная статья – 1 стр.	6 000	8 500

Скидки: 2 публикации – 5 %, 4 публикации – 10 %, 6 публикаций – 15 %.

Денежные средства перечислять на расчетный счет:

КООО «Кузбасское научное общество кардиологов»
ИНН 4205069956 КПП 420501001
р/с 40703810032350000033
Филиал ОАО «УРАЛСИБ» в г. Новосибирске
к/с 30101810400000000725
БИК 045004725
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, дом 6