



www.reanimatology.com

ISSN 1813-9779 (print)

ISSN 2411-7110 (online)

ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ GENERAL REANIMATOLOGY

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Scientific-and-Practical Journal

Том 14

Volume 14

№ 2

Москва
Moscow
2018

Новейшая система терапевтической контролируемой гипотермии **Arctic Sun 5000** – Medivance (США) оказывает протективное действие на жизненно важные органы, позволяет снизить скорость и интенсивность метаболических процессов, уменьшая потребность тканей в кислороде.

На сегодняшний день технология системы **Arctic Sun 5000** обеспечивает наиболее точный и быстрый уровень контроля температуры пациента за счет циркуляции воды в каналах манжет на гидрогелевой основе, имитирующих эффект погружения тела пациента в воду и обеспечивающих высокоэффективный, быстрый теплообмен, за счет полного и непрерывного контакта манжеты с кожей пациента.

Применение искусственной гипотермии позволяет улучшить исход у пациентов с:

- Остановкой сердца (постреанимационная болезнь)
- Травматическими повреждениями головного мозга
- Инсультом
- Печеночной энцефалопатией
- Медикаментозно не купируемой лихорадкой
- Инфарктом миокарда с подъемом ST



novalung®

Система экстракорпоральной мембранной вентиляции iLA (interventional Lung Assist) – **Novalung**

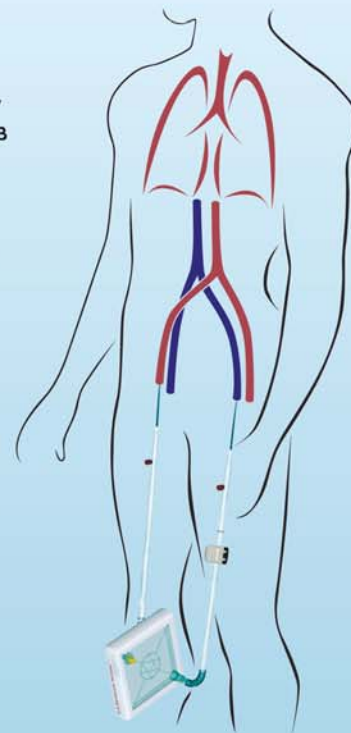
Система iLA обеспечивает эффективную оксигенацию и элиминацию CO_2 , за счет высокотехнологичной мембраны Novalung с уникальным покрытием, позволяющим в течение 29 дней протезировать функцию легких у пациентов с тяжелыми формами дыхательной недостаточности, не поддающимися лечению традиционными режимами ИВЛ.

Система iLA служит мостом к выздоровлению у пациентов с тяжелым: РДСВ, не прибегая к агрессивным режимам вентиляции.

iLA позволяет успешно лечить пациентов с не купируемым астматическим статусом, эффективно удаляя CO_2 из организма в протективных режимах вентиляции.

Подсоединение **системы iLA** осуществляется пункционным методом через бедренную артерию/бедренную вену, поток крови обеспечивается за счет артерио-венозной разницы давлений, без насоса, что делает данную процедуру относительно простой и доступной в широкой клинической практике.

Объем заполнения системы составляет 250 мл.
 Поток крови регулируемый: от 0,5 до 4,5 л/мин.



www.schag.ru

– эксклюзивный дистрибьютор в России

ЗАО «ШАГ»
 119002, г. Москва,
 Карманицкий пер., д. 9
 Арбат Бизнес Центр, офис 501А
 т. +7 (495) 956-13-09,
 ф. +7 (495) 956-13-10

ООО «ШАГ Северо-Запад»
 193318, г. Санкт-Петербург,
 ул. Ворошилова, д. 2
 Бизнес Центр «Охта», офис 206
 т. +7 (812) 440-92-21,
 ф. +7 (812) 440-73-90

ООО «ШАГ-Юг»
 344091,
 г. Ростов-на-Дону,
 пр-кт Стачки, д. 245
 т. +7 (863) 298-00-76,
 т./ф. +7 (863) 266-74-36

ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ

научно-практический рецензируемый журнал

- охватывает вопросы медицины критических состояний
- публикует рукописи на русском и английском языках бесплатно
- включен в базы данных SCOPUS (с 2015 г.), РИНЦ (Российский Индекс научного цитирования), RSCI на платформе WoS CA и др. базы данных; Перечень изданий, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ

РЕДАКТОРЫ

В. В. МОРОЗ, главный редактор, член-корр. РАН, профессор, ФНКИЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Г. А. РЯБОВ, зам. главного редактора, академик РАН, профессор, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКИЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

А. М. ГОЛУБЕВ, зам. главного редактора, д.м.н., профессор, ФНКИЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Д. А. ОСТАПЧЕНКО, научный редактор, д.м.н., Городская клиническая больница №1 им. Н. И. Пирогова (г. Москва, Россия)

В. М. ПИСАРЕВ, научный редактор, д.м.н., профессор, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКИЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

И. Г. БОБРИНСКАЯ, д.м.н., профессор, Московский государственный медико-стоматологический университет (Россия)

С. БАРАМИ, профессор, Международное общество по изучению шока, Институт экспериментальной и клинической травматологии им. Л. Больцмана (г. Вена, Австрия)

Л. БОССАРТ, профессор, Консультативный комитет Европейского совета по реанимации (г. Антверпен, Бельгия)

Г. А. БОЯРИНОВ, д.м.н., профессор, Нижегородская государственная медицинская академия (Россия)

А. А. БУНЯТЯН, академик РАН, профессор, Научный центр хирургии им. Б. В. Петровского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Россия)

Ж.-Л. ВИНСЕНТ, профессор, Больница Эрасме Университет Либре (г. Брюссель, Бельгия)

Г. В. ГВАК, д.м.н., Областная детская клиническая больница (г. Иркутск, Россия)

Г. А. ГОРОДНИК, д.м.н., профессор, Национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецкое клиническое территориальное медицинское объединение (Украина)

А. В. ГРЕЧКО, д.м.н., профессор, ФНКИЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Е. В. ГРИГОРЬЕВ, д.м.н., профессор, НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАН (г. Кемерово, Россия)

А. И. ГРИЦАН, д.м.н., профессор, Красноярский государственный медицинский университет (Россия)

В. Т. ДОЛГИХ, д.м.н., профессор, Омская государственная медицинская академия (Россия)

И. Б. ЗАБОЛОТСКИХ, д.м.н., профессор, Кубанский государственный медицинский университет (г. Краснодар, Россия)

М. Н. ЗАМЯТИН, д.м.н., профессор, Институт усовершенствования врачей Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова (г. Москва, Россия)

А. А. ЗВЯГИН, д.м.н., профессор, Институт хирургии им. А. В. Вишневского (г. Москва, Россия)

В. Л. ЗЕЛЬМАН, академик РАН, профессор, Медицинская школа Keck (г. Лос Анджелес, США)

Ж.-М. КАВАЙОН, Европейское общество по изучению шока, Институт Пастера (г. Париж, Франция)

Н. А. КАРПУН, д.м.н., Городская клиническая больница № 68 (г. Москва, Россия)

И. А. КОЗЛОВ, д.м.н., профессор, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского (г. Москва, Россия)

GENERAL REANIMATOLOGY

Scientific-and-Practical Peer-Reviewed Journal

- It is covering questions of medicine of critical states
- Manuscripts in Russian and English are published free-of-charge
- It is indexed in SCOPUS (Since 2015), PIIH, RSCI (Russian Science Citation Index, WoS CA), it is included in the Supreme Certifying Commission List of Russian periodical and research issues in which the publication of Postgraduate education works (PhD, DSc) are recommended

EDITORS

Viktor V. MOROZ, Editor-in-Chief, MD, PhD, DSc, Professor, Corr. Member of RAS, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Gennady A. RYABOV, Deputy Editor-in-Chief, MD, PhD, DSc, Professor, Member of RAS, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Arkady M. GOLUBEV, Deputy Editor-in-Chief, MD, PhD, DSc, Professor, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Dmitry A. OSTAPCHENKO, Scientific Editor, MD, PhD, DSc, N. I. Pirogov Moscow City Hospital №1 (Moscow, Russia)

Vladimir M. PISAREV, Scientific Editor, MD, PhD, DSc, Professor, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Irina G. BOBRINSKAYA, MD, PhD, DSc, Professor, Moscow Medical Dental University (Moscow, Russia)

Soheyl BAHRAMI, Professor, PhD, The International Federation of Shock Society (IFSS), Ludwig Boltzmann Institute of Experimental and Clinical Traumatology (Vienna, Austria)

Leo L. BOSSAERT, MD, Professor, Board of Advisory Committee, European Resuscitation Council University of Antwerpen (Belgium)

Gennady A. BOYARINOV, MD, PhD, DSc, Professor, Nizhniy Novgorod State Medical Academy (Nizhniy Novgorod, Russia)

Armen A. BUNYATYAN, MD, PhD, DSc, Professor, Member of RAS, B.V. Petrovsky Russian Research Surgical Center, I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Jean-Louis VINCENT, Professor, Erasme Hospital, Université Libre de Bruxelles (Belgium)

Gennady V. GVAK, MD, PhD, DSc, Regional Children Hospital (Irkutsk, Russia)

Georgy A. GORODNIK, DSc, Professor, M. Gorky National Medical University; Donetsk Territorial Medical Association (Ukraine)

Andrey V. GRECHKO, PhD, DSc, Professor, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Moscow, Russia)

Evgeny V. GRIGORYEV, MD, PhD, DSc, Professor, Research Scientific Institute of Clinical Studies of complex problems of cardiovascular diseases, Siberian Branch, RAS (Kemerovo, Russia)

Alexey I. GRITSAN, MD, PhD, DSc, Professor, Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia)

Vladimir T. DOLGIH, MD, PhD, DSc, Professor, Omsk State Medical Academy (Omsk, Russia)

Igor B. ZABOLOTSKIY, MD, PhD, DSc, Professor, Kuban State Medical University (Krasnodar, Russia)

Michael N. ZAMYATIN, MD, PhD, DSc, Professor, Institute of Advanced Medical Studies, N. I. Pirogov National Medical Surgery Center (Moscow, Russia)

Alfred A. ZVYAGIN, MD, PhD, DSc, Professor, A. V. Vishnevsky Institute of Surgery (Moscow, Russia)

Vladimir L. ZELMAN, Member of RAS, Professor, Keck School of Medicine (Los Angeles, USA)

Jean-Marc CAVAILLON, DSc, European Shock Society (ESS), Institute Pasteur (Paris, France)

Nikolai A. KARPUN, MD, PhD, DSc, City Hospital № 68 (Moscow, Russia)

Igor A. KOZLOV, MD, PhD, DSc, Professor, M. F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute (Moscow, Russia)

П. КОХАНЕК, профессор, Центр исследований проблем реаниматологии им. П. Сафара, Университет Питтсбурга (США)

А. Н. КУЗОВЛЕВ, д.м.н., НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Г. А. ЛИВАНОВ, д.м.н., профессор, НИИ скорой медицинской помощи им. И. И. Джanelидзе (г. С.-Петербург, Россия)

В. В. ЛИХВАНЦЕВ, д.м.н., профессор, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского (г. Москва, Россия)

И. Ф. ОСТРЕЙКОВ, профессор, Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования (г. Москва)

Г. В. ПОРЯДИН, член-корр. РАН, профессор, Национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова (г. Москва, Россия)

В. И. РЕШЕТНЯК, д.м.н., профессор, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Д. М. САБИРОВ, д.м.н., профессор, Ташкентский институт усовершенствования врачей (Узбекистан)

Д. В. САДЧИКОВ, д.м.н., профессор, Саратовский государственный медицинский университет (Россия)

С. В. СВИРИДОВ, д.м.н., профессор, Национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, (г. Москва, Россия)

Е. А. СПИРИДОНОВА, д.м.н., профессор, Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева (г. Москва, Россия)

Н. Д. УШАКОВА, д.м.н., профессор, Научно-исследовательский онкологический институт (г. Ростов-на-Дону, Россия)

А. М. ХАДЖИБАЕВ, д.м.н., профессор, Республиканский научный центр экстренной медицинской помощи (г. Ташкент, Узбекистан)

С. Е. ХОРОШИЛОВ, д.м.н., Главный военный клинический госпиталь им. Н. Н. Бурденко (г. Москва, Россия)

А. М. ЧЕРНЫШ, д.м.н., профессор, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии (г. Москва, Россия)

Ю. Л. ШЕВЧЕНКО, академик РАН, профессор, Национальный медико-хирургический центр им. Н. И. Пирогова (г. Москва, Россия)

И. В. ЯРЕМА, член-корр. РАН, профессор, Московский государственный медико-стоматологический университет (Россия)

Технический секретарь Н. В. Голубева

Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-18690 от 02 ноября 2004 г. Печатное издание журнал «Общая реаниматология» зарегистрирован Федеральной службой по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.

Периодичность: 6 раз в год

Учредитель: © Фонд «Медицина критических состояний»

Издательство: НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

Оригинал-макет: Н. В. Голубева

Верстка: С. В. Шишков

Типография: «Advanced Solutions», 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 19, стр. 1. E-mail: om@aov.ru

Контакты с редакцией:

Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2.

Тел.: +7-495-650-25-20; +7-495-694-17-73; +7-495-694-65-05.

E-mail: journal_or@mail.ru; сайт: www.reanimatology.com

Подписка и распространение: индекс издания по каталогу «Книга-Сервис» — 46338. Цена свободная

Подписано в печать: 08.05.2018

Patrick M. KOCHANЕК, MD, FCCM, Professor, P. Safar Center for Resuscitation Research, University of Pittsburgh School of Medicine (USA)

Artem N. KUZOVLEV, MD, DSc, V. A. Negovsky Research Institute of Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology (Moscow, Russia)

Georgy A. LIVANOV, MD, PhD, DSc, Professor, I. I. Dzhanelidze Institute of Emergency Medical Care (St. Petersburg, Russia)

Valery V. LIKHVANTSEV, MD, PhD, DSc, Professor, M. F. Vladimirovsky Moscow Region Clinical Research Institute (Moscow, Russia)

Ivan F. OSTREYKOV, MD, PhD, DSc, Professor, Medical Academy of Continuous Postgraduate Education, (Moscow, Russia)

Gennady V. PORYADIN, MD, PhD, DSc, Professor, Corr. Member of RAS, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Vasily I. RESHETNYAK, MD, PhD, DSc, Professor, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology (Moscow, Russia)

Djurabay M. SABIROV, DSc, Professor, Tashkent Institute of Postgraduate Medical Education (Tashkent, Uzbekistan)

Dmitry V. SADCHIKOV, MD, PhD, DSc, Professor, State Medical University (Saratov, Russia)

Sergey V. SVIRIDOV, MD, PhD, DSc, Professor, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Elena A. SPIRIDONOVA, MD, PhD, DSc, Professor, D. Rogachev National Scientific Practical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia)

Natalia D. USHAKOVA, MD, PhD, DSc, Professor, Rostov Cancer Research Institute, (Rostov-on-Don, Russia)

Abdukhakim M. KHADJIBAEV, MD, Professor, Republican Research Center of Emergency Medicine, (Tashkent, Uzbekistan)

Sergey E. KHOROSHILOV, MD, PhD, DSc., N. N. Burdenko Main Clinical Military Hospital, Russian Ministry of Defence (Moscow, Russia)

Alexander M. CHERNYSH, PhD, DSc., Professor, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology (Moscow, Russia)

Yury L. SHEVCHENKO, MD, PhD, DSc., Professor, Member of RAS, N. I. Pirogov National Medical Surgical Center (Moscow, Russia)

Ivan V. YAREMA, MD, PhD, DSc., Professor, Corr. Member of RAS, Moscow Medical Dental University (Moscow, Russia)

Technical Secretary: Natalia V. Golubeva

Registration certificate of the Journal «Obshchaya reanimatologiya» (General Reanimatology): ПИ № ФС77-18690, November 2, 2004, Federal Service for Supervision of Compliance with Legislation in the Sphere of Mass Communications and Protection of Cultural Heritage

Publication Frequency: 6 numbers per year.

Founder: © «Emergency Medicine» Fund

Publisher: V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russia

Artwork: Natalia V. Golubeva

Page-proof: Sergey V. Shishkov

Printing House:

«Advanced Solutions» 19, Leninsky Prospekt, Build. 1, Moscow 119071, Russia, E-mail: om@aov.ru

Contacts: 25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia.

Tel. +7-495-650-25-20; +7-495-694-17-73; +7-495-694-65-05.

E-mail: journal_or@mail.ru; сайт: www.reanimatology.com

Subscription: Index 46338, refer to catalog of «Книга-Сервис»

Signed for printing: 08.05.2018

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ТРАВМА

- Функциональная активность автономной нервной системы при различных уровнях сознания у пациентов с повреждением головного мозга
Ю. Ю. Кирячков, А. В. Гречко, Д. Л. Колесов, А. А. Логинов, М. В. Петрова, И. В. Пряников, И. Г. Щелкунова, П. Прадхан

КРИТИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ
НОВОРОЖДЕННЫХ

- Нарушение липидного обмена у новорожденных в раннем неонатальном периоде
С. А. Перепелица

СЕПСИС

- Экстракорпоральная детоксикация при абдоминальном сепсисе у онкологических больных
Н. Д. Ушакова, О. И. Кит, А. А. Маслов, А. П. Меньшенина

ОСТРЫЕ ОТРАВЛЕНИЯ

- Клозапин: механизмы токсичности и побочных эффектов (обзор)
А. С. Бабкина, А. М. Голубев, Д. В. Сундуков, А. Р. Баширова, М. А. Голубев

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

- Влияние антиоксиданта на основе янтарной кислоты на превращение метгемоглобина в оксигемоглобин *in vitro*
А. М. Черныш, Е. К. Козлова, В. В. Мороз, В. А. Сергунова, О. Е. Гудкова, Е. А. Манченко, А. П. Козлов
- Синтетический аналог лей-энкефалина предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции *in vitro*
О. А. Гребенчиков, А. М. Овезов, Ю. В. Скрипкин, Т. С. Забелина, О. Н. Улиткина, А. В. Луговой, А. С. Приходько, А. Ю. Рыжков, Р. А. Зиновкин
- Перспективы использования средств на основе митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 в терапии труднозаживающих ран (обзор)
Р. А. Зиновкин, Е. Н. Попова, О. Ю. Плетюшкина, О. П. Ильинская, В. М. Писарев, Б. В. Черняк

ХРОНИКА

- Памяти профессора Ю. А. Чурляева
Памяти профессора Н. В. Шаповаловой

INJURY

- 4 Functional Activity of the Autonomous Nervous System at Different Levels of Consciousness in Patients with a Brain Damage
Yury Yu. Kiryachkov, Andrey V. Grechko, Dmitry L. Kolesov, Alexey A. Loginov, Marina V. Petrova, Igor V. Pryanikov, Inessa G. Shchelkunova, Pratil Pradkhan

CRITICAL STATUS
IN NEWBORNS

- 13 Impairment of the Lipid Metabolism in Newborns in the Early Neonatal Period
Svetlana A. Perepelitsa

SEPSIS

- 25 Extracorporeal Detoxification in Abdominal Sepsis in Cancer Patients
Nataliya D. Ushakova, Oleg I. Kit, Andrey A. Maslov, Anna P. Men'shenina

ACUTE INTOXICATIONS

- 35 Clozapine: Mechanisms of Toxicity and Side Effects
Anastasiya S. Babkina, Arkady M. Golubev, Dmitry V. Sundukov, Asiya R. Bashirova, Mikhail A. Golubev

EXPERIMENTAL
STUDIES

- 46 Effects of Succinate-Based Antioxidant on *in vitro* Conversion of Methemoglobin in Oxyhemoglobin
Alexander M. Chernysh, Elena K. Kozlova, Victor V. Moroz, Victoria A. Sergunova, Olga E. Gudkova, Ekaterina A. Manchenko, Alexander P. Kozlov
- 60 Synthetic Analogue of Leu-Enkephalin Prevents Endothelial Dysfunction *in vitro*
Oleg A. Grebenchikov, Alexey M. Ovezov, Yuri V. Skripkin, Tatiana S. Zabelina, Olga N. Ulitkina, Alexander V. Lugovoy, Anastasiya S. Prihodko, Alexander Yu. Ryzhkov, Roman A. Zinovkin
- 69 Prospects for Drugs Based on the Mitochondria-Targeting Antioxidant SkQ1 in Treatment of Wounds with Impaired Healing
Rjman A. Zinovkin, Ekaterina N. Popova, Olga Yu. Pletjushkina, Olga P. Ilyinskaya, Vladimir M. Pisarev, Boris V. Chernyak

CHRONICLES

- 87 In Memory of Professor Yury A. Churlyayev (in Rus)
89 In Memory of Professor Nina V. Shapovalova (in Rus)

Функциональная активность автономной нервной системы при различных уровнях сознания у пациентов с повреждением головного мозга

Ю. Ю. Кирячков¹, А. В. Гречко¹, Д. Л. Колесов¹, А. А. Логинов¹, М. В. Петрова^{1,2},
И. В. Пряников¹, И. Г. Щелкунова¹, П. Прадхан^{2*}

¹ Федеральный научный клинический центр реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Российский университет дружбы народов
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

* Непал

Functional Activity of the Autonomous Nervous System at Different Levels of Consciousness in Patients with a Brain Damage

Yury Yu. Kiryachkov¹, Andrey V. Grechko¹, Dmitry L. Kolesov¹, Alexey A. Loginov¹,
Marina V. Petrova^{1,2}, Igor V. Pryanikov¹, Inessa G. Shchelkunova¹, Pranil Pradkhan^{2*}

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow
6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia

* Nepal

Цель — оценка уровня сознания у пациентов с повреждением головного мозга на основе электрофизиологического обследования функционального состояния автономной нервной системы путем регистрации параметров вариабельности ритма сердца.

Материал и методы исследования. В исследование включили 77 пациентов на 20-50-е сутки после черепно-мозговой травмы, аноксического повреждения, последствий острых нарушений мозгового кровообращения. В качестве критериев нормы и патологии активности автономной нервной системы (АНС) приняли следующие параметры вариабельности ритма сердца (ВРС) для 5-минутной записи: парасимпатическую гиперактивность (гипервагусное состояние) с 95% доверительными интервалами принимали в пределах значений для SDNN (стандартное отклонение от средней длительности всех синусовых R—R интервалов), [41,5–149,3 мс]; для rMSSD (среднеквадратичное отклонение разности двух смежных отсчетов R—R кардиоинтервалов в мс), [42,4–175,0 мс]; для pNN50% (доля в % соседних синусовых R—R интервалов, которые различаются более чем на 50 мсек), [8,14–54,66%]; для SI (стресс-индекс напряжения Баевского), [0–80 нормализованных единиц н. е.]; симпатическую гиперактивность принимали в пределах значений для SDNN [4,54–13,30 мс]; для rMSSD [2,25–5,77 мс]; для pNN50% [0–0,109%]; для SI >900 н. е.; Норма параметров ВРС принималась в пределах значений для SDNN [13,31–41,4 мс]; для rMSSD [5,78–42,3 мс]; для pNN50% [0,110–8,1%]; для SI [80–900 н. е.]. Для верификации гипервагусного состояния, симпатической гиперактивности или нормы в указанных пределах принимали 3 из 4-х параметров.

Результаты. У 40 (51,9%) пациентов из обследованных 77-и после повреждения головного мозга параметры функциональной активности АНС находились в зоне патологических значений. Симпатическую гиперактивность выявили у 34-х пациентов и в 6-ти случаях зафиксировали гипервагусное состояние. Патологические параметры HRV выявили у 80% пациентов при тяжелых формах нарушения сознания (вегетативное состояние, кома), а при норме сознания — обнаружили лишь у 20% пациентов.

Заключение. Компьютерный анализ вариабельности сердечного ритма — необходимый элемент обследования пациентов с различными уровнями сознания после повреждения головного мозга травматического и нетравматического генеза. Частота патологических изменений со стороны функционального состояния автономной нервной системы достоверно нарастает в группах пациентов от нормального уровня сознания к состоянию минимального сознания, вегетативному состоянию и коме. Основным вариантом патологии АНС в группах пациентов находящихся в состоянии минимального сознания, вегетативном состоянии и коме является симпатическая гиперактивность.

Ключевые слова: автономная нервная система; вариабельность сердечного ритма; синдром минимального сознания; вегетативное состояние

Адрес для корреспонденции:

Юрий Кирячков
E-mail: kirychyu@yandex.ru

Correspondence to:

Yury Kiryachkov
E-mail: kirychyu@yandex.ru

The purpose of the study — assessment of the level of consciousness in patients with a brain damage on the basis of electrophysiological examination of the functional state of the autonomous nervous system by recording parameters of the heart rate variability (HRV).

Materials and Methods. The study included 77 patients on Day 20–50 after a traumatic brain injury, anoxic injury, consequences of acute cerebral circulation disorders. The following parameters of the HRV for a 5-minute recording were accepted as criteria of norm and pathology of the autonomous nervous system (ANS) activity: (1) parasympathetic hyperactivity (hypervagal state) values with 95% confidence intervals were recorded within the accepted values for (a) SDNN (standard deviation of normal to normal R-R intervals), [41.5–149.3 ms]; (b) rMSSD (root-mean-square of the successive normal sinus R–R interval difference in ms), [42.4–175.0 ms]; (c) pNN50% (percentage of successive normal sinus RR intervals >50 ms), [8.14–54.66%]; (d) SI (Baevisky stress index), [0–80 normalized units, n. u.]; (2) the sympathetic hyperactivity recordered within the range of values for (a) SDNN [4.54–13.30 ms]; (b) rMSSD [2.25–5.77 ms]; (c) pNN50% [0–0.109%]; (d) SI >900 n. u.; (3) the normal value of ANS parameters were recordered within the range of values for (a) SDNN [13.31–41.4 ms]; (b) rMSSD [5.78–42.3 ms]; (c) pNN50% [0.110–8.1%]; (d) SI [80–900 n. u.]. For verification of the hypervagal state, sympathetic hyperactivity or normal state, at least 3 of 4 parameters should be within the specified limits.

Results. In 40 (51.9%) of 77 patients examined after a brain damage, ANS functional activity parameters were within the range of pathological values. The sympathetic hyperactivity was identified in 34 patients, and in 6 cases the hypervagal state was diagnosed. Pathological parameters of HRV were found in 80% of patients with severe forms of unconsciousness (vegetative state, coma), and only in 20% of patients with normal consciousness.

Conclusion. The computer analysis of the HRV is a necessary element of examination of patients with different levels of consciousness after a brain damage of a traumatic and non-traumatic genesis. The frequency of pathological changes in the functional state of the autonomous nervous system increases significantly in groups of patients from the normal level of consciousness to the state of minimal consciousness, vegetative state, and coma. The sympathetic hyperactivity is the main type of ANS pathology in the groups of patients with minimal consciousness, in the vegetative state, and coma.

Keywords: *autonomous nervous system; heart rate variability; minimal consciousness syndrome; vegetative state*

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-4-12

Введение

Применяемые в настоящее время шкалы оценки сознания у пациентов с повреждением головного мозга травматического и нетравматического генеза (Glasgow, Four) используются для прогнозирования летальности [1–8]. Однако по ним оцениваются только поведенческие реакции пациентов (речь, движения, открывание глаз, рефлексы). В тоже время, общеизвестно, что сбалансированная адаптационная реакция автономной (вегетативной) нервной системы организма является ключевым моментом сохранения устойчивости организма при развитии критических состояний, в том числе и церебральной недостаточности [9–13]. Патология данной функциональной структуры организма приводит к развитию осложнений системного характера, нарушению системного и регионального кислородного гомеостаза, регуляции сосудистого тонуса, вторичным повреждениям головного мозга, нутритивной недостаточности, проблемам, связанным с вертикализацией и отменой искусственной вентиляции легких (ИВЛ) («снятие с ИВЛ», weaning) [14, 15].

Цель исследования — оценка уровня сознания у пациентов с повреждением головного мозга на основе электрофизиологического обследования функционального состояния автономной нервной системы (АНС) путем регистрации параметров вариабельности ритма сердца.

Материал и методы

Критериями включения пациентов в исследование являлись: возраст от 18 до 79 лет, повреждение головного

Introduction

Currently used scales of assessment of consciousness in patients with brain injury of a traumatic and non-traumatic genesis (Glasgow, Four) are applied to predict mortality [1–8]. However, only patients' behavioral reactions (speech, movements, eye opening, reflexes) are evaluated by these scales. At the same time, it is well known that a balanced adaptive reaction of the autonomous (vegetative) nervous system is the key to maintaining the stability of the organism in the development of critical conditions, including cerebral insufficiency [9–13]. A pathology of this functional structure of the body leads to the development of systemic complications, impairment of systemic and regional oxygen homeostasis, regulation of vascular tone, secondary brain damage, nutritive insufficiency, problems of verticalization and weaning [14, 15].

The purpose of this study was to assess the level of consciousness in patients with a brain damage on the basis of electrophysiological examination of the functional state of the autonomous nervous system (ANS) by recording parameters of the HRV.

Materials and Methods

There were the following inclusion criteria: age from 18 to 79 years; brain damage of a traumatic, vascular, and anoxic genesis, at least 20 days from the onset of the disease. Patients with acute brain disease were not included in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology taking into account the statements of the Declaration of Helsinki. There was no conflict of interests.

мозга травматического, сосудистого, аноксического генеза, не менее 20-и суток от начала заболевания. В исследование не включали пациентов в остром периоде заболевания головного мозга. Исследование одобрено комитетом по этике ФНКЦ РР с учетом параграфов Хельсинской Декларации. Конфликт интересов отсутствовал.

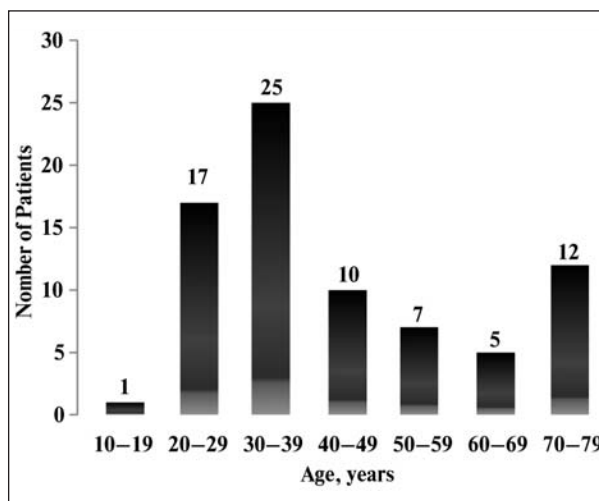
В исследование, выполненное на 20–50-е сутки после черепно-мозговой травмы, развития патологии головного мозга нетравматического генеза (аноксическое повреждение; последствия оперативных вмешательств и острых нарушений мозгового кровообращения) включили 77 пациентов, находившихся в клинике ФГНБУ ФНКЦ РР в период 2016–2017 гг. Мужчин было — 45, женщин — 32, средний возраст — $43,3 \pm 2,0$ лет (рис. 1).

По нозологии пациентов распределили следующим образом: последствия черепно-мозговой травмы (ЧМТ), ($n=45$); последствия острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), ($n=6$); последствия аноксического повреждения головного мозга ($n=10$); последствия субарахноидального кровоизлияния ($n=5$); последствия удаления опухоли или артерио-венозной мальформации головного мозга ($n=11$).

Оценку уровня сознания пациентов проводили по шкале CRS-R – Coma Recovery Scale-Revised. Диагностическими критериями данной шкалы являлись 6 субшкал: 1) Слуховой функции (0–4 балла); 2) Зрительной функции (0–5 баллов); 3) Моторной (двигательной) функции (0–6 баллов); 4) Вербальной (оромоторной) функции (0–3 балла); 5) Коммуникативной функции (0–2 балла); 6) Активации (возбуждения), (0–3 балла). Уровень сознания в баллах по данной шкале колеблется от 0 (кома), до 23 (состояние ясного сознания). Подробности клинического применения шкалы CRS-R и ее дефиниции приведены в публикации Giocino et al. (2002) [16].

Выделили 4 группы пациентов (табл. 1).

Во всех группах проводили оценку функционального состояния автономной (вегетативной) нервной системы на основе компьютерного анализа вариабельности ритма сердца (ВРС) [17]. Оценку ВРС проводили прибором Полиспектр-8 EX (фирма Нейро-софт, Россия) с протоколом беспроводной связи Bluetooth между кардиоанализатором и персональным компьютером. В каждый период исследования анализировали не менее 300 кардиоинтервалов (параметры ВРС вычисляли по соответствующим формулам распределения кардиоинтервалов). Определяли следующие пока-



Возрастной состав пациентов, включенных в исследование.
Age of patients included in the study.

Примечание. Number of Patients – число пациентов; Age, years – возраст, лет.

77 patients who were in the clinic of Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation over the period from 2016 until 2017 were included in the study starting from the 20th–50th day after a traumatic brain injury or a brain pathology of a non-traumatic genesis (anoxic damage; consequences of surgical interventions and acute disorders of cerebral circulation). There were 45 men and 32 women; the average age was 43.3 ± 2.0 years (Fig. 1).

Based on the nosological entities, the patients were distributed as follows: consequences of a craniocerebral injury (CCI) ($n=45$); consequences of acute disorders of cerebral circulation (stroke), ($n=6$); consequences of anoxic brain injury ($n=10$); consequences of subarachnoid hemorrhage ($n=5$); consequences of removal of a tumor or arteriovenous malformations of the brain ($n=11$).

The assessment of patients' level of consciousness was carried out using the CRS-R scale (Coma Recovery Scale-Revised). 6 subscales were diagnostic criteria of this scale: 1) auditory function (0–4 scores); 2) visual function (0–5 scores); 3) motor function (0–6 scores); 4) oromotor (verbal) function (0–3 scores); 5) communication function (0–2 scores);

Таблица 1. Характеристика групп обследованных пациентов.

Table 1. Characteristics of groups of tested patients.

Parameters	Values of parameters in groups			
	Group 1, $n=10$	Group 2, $n=22$	Group 3, $n=40$	Group 4, $n=5$
Consciousness	clear	minimal	vegetative	coma
Sex, M (F)	8 (2)	15 (7)	19 (21)	3 (2)
Median age, years	60.4 ± 5.12	40.18 ± 3.34	41.0 ± 2.62	62.75 ± 1.88
Nosology, n				
– consequences of the brain tumor removal	3	4	3	1
– consequences of stroke	3	2	–	1
– consequences of a craniocervical injury	2	13	28	2
– anoxic brain injury	1	1	8	–
– consequences of subarachnoid bleeding	1	2	1	1

Note. Для табл. 1–3: Parameters – параметры; Values of ... in groups – значения ... в группах; Consciousness – состояние сознания; clear – ясное; minimal – минимальное; vegetative – вегетативное; coma – кома; Sex, M (F) – пол, м (ж); Median age, years – средний возраст, лет; Nosology – нозология; consequences – последствия; of the brain tumor removal – удаления опухоли головного мозга; of stroke – ОНМК; of a craniocervical injury – ЧТМ; anoxic brain injury – аноксическое повреждение головного мозга; of subarachnoid bleeding – субарахноидальное кровоизлияние.

Таблица 2. Параметры уровня сознания обследованных пациентов по шкалам Glasgow, Four, Giocini, $M \pm m$.
Table 2. Parameters of Glasgow, Four, Giocini scales of consciousness level of patients included in the study, $M \pm m$.

Scales parameters, score	Values of parameters in groups			
	Group 1, $n=10$	Group 2, $n=22$	Group 3, $n=40$	Group 4, $n=5$
Glasgow	14,4 $\pm$ 0,26	9,09 $\pm$ 0,25*	6,88 $\pm$ 0,12*	4,8 $\pm$ 0,19*
Four	15,9 $\pm$ 0,09	14,6 $\pm$ 0,21*	10,6 $\pm$ 0,24*	3,4 $\pm$ 0,24*
Giocini	22,9 $\pm$ 0,09	8,4 $\pm$ 0,53*	5,07 $\pm$ 0,36*	1,6 $\pm$ 0,39*

Note. For Table 2, 3: patient groups: 1 – normal level of consciousness; 2 – state of minimum consciousness; 3 – vegetative state; 4 – coma. * – $P < 0.001$ vs. Group 1.

Примечание. Score – баллы. Для табл. 2, 3: группа 1 – пациенты с нормальным уровнем сознания; группа 2 – пациенты в состоянии минимального сознания; группа 3 – пациенты в вегетативном состоянии; группа 4 – пациенты в коме. * – $p < 0,001$ в сравнении с группой 1.

затели ВРС: SDNN – среднеквадратичное отклонение R–R кардиоинтервалов в мс; rMSSD – среднеквадратичное отклонение разности двух смежных отсчетов R–R кардиоинтервалов в мс; pNN50% – долю R–R кардиоинтервалов в процентах, отличающихся от предыдущего более, чем на 50 мс; SI – стрессовый индекс Баевского в н. е.; LF/HF-соотношение спектра низких и высоких частот в н. е.; VLF спектр очень низких частот в мс²; LF спектр низких частот в мс² и %; HF спектр высоких частот в мс² и %. В качестве критериев нормы и патологии активности АНС приняли следующие параметры ВРС: парасимпатическую гиперактивность (гипервагусное состояние) с 95% достоверными интервалами принимали в пределах значений для SDNN [41,5–149,3 мс]; для rMSSD [42,4–175,0 мс]; для pNN50% [8,14–54,66%]; для SI [0–80 н.е.]; симпатическую гиперактивность принимали в пределах значений для SDNN [4,54–13,30 мс]; для rMSSD [2,25–5,77 мс]; для pNN50% [0–0,109%]; для SI >900 н. е.; норму параметров функциональной активности АНС принимали в пределах значений для SDNN [13,31–41,4 мс]; для rMSSD [5,78–42,3 мс]; для pNN50% [0,110–8,1%]; для SI [80–900 н. е.]. Для верификации парасимпатической гиперактивности, симпатической гиперактивности или нормы в указанных пределах должны быть 3 из 4-х параметров [18].

Статистическую обработку полученных данных провели по программе Statistica 13 EN (StatSoft Russia, StatSoft Inc., США), с использованием t -критерия Стьюдента. Достоверными признавали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные по шкалам Glasgow, Four, Giocini параметры уровня сознания представили в табл. 2.

Очевидно, что при оценке всех шкал получили достоверное отличие состояния нормы сознания от состояния минимального сознания, вегетативного состояния и комы. Наибольшие дифференциальные различия получили по шкале Giocini, где прослеживается градация баллов с 22,9 $\pm$ 0,09 (при норме сознания) до 1,6 $\pm$ 0,39 (кома).

У 40 (51,9%) пациентов из обследованных 77-и после повреждения головного и мозга в результате ЧМТ, аноксии, ОНМК параметры функциональной активности АНС находились в зоне патологических значений [18]. Симпатическую гиперактивность выявили у 34-х пациентов и в 6-ти случаях зафиксировали парасимпатическую гиперактивность.

6) arousal (activation) function (0–3 scores). The level of consciousness ranges from 0 (coma) to 23 (state of clear consciousness) according to this scale scoring. Details of the clinical application of the CRS-R scale and its definition are given by Giocino et al. (2002) [16].

There were 4 groups of patients (Table 1).

The functional state of the autonomous (vegetative) nervous system was assessed in all groups on the basis of a computer analysis of the HRV. [17]. The evaluation of HRV was performed by the Polyspektr-8 EX apparatus (Neurosoft, Russia) with the protocol of the wireless Bluetooth connection between the cardioanalyzer and a personal computer. In each study period, at least 300 R–R intervals were analyzed (the HRV parameters were calculated according to corresponding formulas of distribution of cardiac intervals). The following HRV parameters were determined: SDNN – standard deviation of normal to normal R–R intervals, in ms; rMSSD – root-mean-square of the successive normal sinus R–R interval difference, in ms; pNN50% – percentage of successive normal sinus R–R intervals >50 ms; SI – Baevsky stress-index in n.u.; LF/HF-low frequency/high frequency ratio in n.u.; VLF (very low frequency spectrum) in ms²; LF (low frequency spectrum) in ms² and %; HF (high frequency spectrum) in ms² and %. The following parameters of the heart rate variability (HRV) were accepted as criteria of norm and pathology of the ANS activity: parasympathetic hyperactivity (hypervagal state) with 95% confidence intervals was taken within the accepted values for SDNN, [41.5–149.3 ms]; for rMSSD [42.4–175.0 ms]; pNN50% [8.14–54.66%]; for SI [0–80, n.u.]; the sympathetic hyperactivity was taken within the range of values for SDNN [4.54–13.30 ms]; for rMSSD [2.25–5.77 ms]; for pNN50% [0–0.109%]; for SI >900 n.u.; the normal value of ANS parameters were taken within the range of values for SDNN [13.31–41.4 ms]; for rMSSD [5.78–42.3 ms]; for pNN50% [0.110–8.1%]; for SI [80–900 n.u.]. For verification of the parasympathetic hyperactivity, sympathetic hyperactivity or norm, 3 of 4 parameters should be within the specified limits.

Statistical processing of the obtained data was carried out by means of the Statistica 13 EN software (StatSoft Russia, StatSoft Inc., USA), using the t -test. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

Results and Discussion

Parameters of the level of consciousness obtained according to the Glasgow, Four, and Giocini scales are presented in Table 2.

It is obvious that the assessment of all scales demonstrate a significant difference between the state of the normal consciousness and the state of the min-

Таблица 3. Параметры временного и спектрального анализа вариабельности ритма сердца обследованных пациентов ($M \pm m$).**Table 3. Parameters of time domains and spectral analysis heart rate variability in study groups of patients ($M \pm m$).**

Parameters	Values of parameters in groups				
	Group 1 $n=10$	Group 2 $n=22$	Group 3 $n=40$		Group 4 $n=4$
			Subgroup 3A $n=26$	Subgroup 3B $n=14$	
SDNN, msec	21.7 $\pm$ 5.34	22.4 $\pm$ 3.04	8.12 $\pm$ 0.88***	48 $\pm$ 0.99***	8.2 $\pm$ 2.17***
rMSSD, msec	9.3 $\pm$ 0.89	12.7 $\pm$ 3.66	3.88 $\pm$ 0.36***	59 $\pm$ 17.9**	4.6 $\pm$ 1.08**
PNN50, %	0.155 $\pm$ 0.09	4.01 $\pm$ 2.74	0.009 $\pm$ 0.007**	24.3 $\pm$ 10.3*	0
S.I. n. u.	476.2 $\pm$ 79.3	715 $\pm$ 174.8	2155 $\pm$ 269.4***	94.2 $\pm$ 17.7	1868 $\pm$ 525*
LF/HF n. u.	4.38 $\pm$ 1.46	4.67 $\pm$ 1.1	5.39 $\pm$ 0.906	0.94 $\pm$ 0.76*	3.01 $\pm$ 0.92
VLF, ms ²	767 $\pm$ 564.7	534 $\pm$ 102.7	110.1 $\pm$ 35.3	375 $\pm$ 196.7	62.3 $\pm$ 17.5
LF, ms ²	99.0 $\pm$ 29.0	129.7 $\pm$ 35.6	22.9 $\pm$ 3.5*	626 $\pm$ 496.7	15.4 $\pm$ 5.35*
HF, ms ²	32.5 $\pm$ 4.17	184 $\pm$ 112.5	5.1 $\pm$ 0.83***	695 $\pm$ 38.8***	7.62 $\pm$ 3.62**
VLF, %	63.8 $\pm$ 5.78	71.1 $\pm$ 3.77	70.58 $\pm$ 3.02	20.7 $\pm$ 3.59***	72.6 $\pm$ 7.1**
LF, %	22.1 $\pm$ 3.69	16.6 $\pm$ 1.98	22.3 $\pm$ 2.62	30.1 $\pm$ 17.6	19.04 $\pm$ 5.61
HF, %	13.8 $\pm$ 3.69	12.09 $\pm$ 3.43	6.63 $\pm$ 1.17	49.2 $\pm$ 21.2	8.1 $\pm$ 2.05

Note. Subgroup 3A – patients in a vegetative state with paroxysmal sympathetic hyperactivity; subgroup 3B – patients in a vegetative state with hypervagal reaction; SDNN – standard deviation of normal to normal R–R intervals, ms; rMSSD – root-mean-square of the successive normal sinus R–R interval difference, ms; pNN50% – percentage of successive normal sinus R–R intervals >50 ms; Triangular index (TrI) – triangular index in n. u.; HF high frequency spectrum, ms²; LF low frequency spectrum, ms²; LF/HF – low frequency/high frequency ratio, n. u.; VLF very low frequency spectrum, ms². * – $P < 0.05$; ** – $P < 0.01$; *** – $P < 0.001$ vs. Group 1.

Примечание. Подгруппа 3А – пациенты в вегетативном состоянии с гиперсимпатикотонией; подгруппа 3В – пациенты в вегетативном состоянии с гипервагусной реакцией. SDNN – среднеквадратичное отклонение R–R кардиинтервалов в мс; rMSSD – среднеквадратичное отклонение разности двух смежных отсчетов R–R кардиинтервалов в мс; pNN50% – доля R–R кардиинтервалов в процентах, отличающихся от предыдущего более чем на 50 мс; Triangular index (TrI) – коэффициент треугольности в н. е.; HF – спектр высоких частот в мс²; LF – спектр низких частот в мс²; LF/HF – соотношение спектра низких и высоких частот в н. е.; VLF – спектр очень низких частот в мс². * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ в отличие от группы 1.

Патологические параметры ВРС (табл. 3) выявили в большинстве случаев при тяжелых формах нарушения сознания (вегетативное состояние, кома) у 32-х (80%) пациентов, а при более легких нарушениях сознания (минимальное сознание) и при норме сознания – обнаружили всего у 20% пациентов. Обратную зависимость выявили при анализе нормальных значений ВРС: тяжелые формы нарушения сознания (вегетативное состояние и кома) найдены всего у 12 (32,4%) пациентов, а при более легких формах нарушения сознания (минимальное сознание, норма сознания) нормальные параметры ВРС регистрировали у 25-и (67,6%) пациентов. В подавляющем большинстве случаев, нормальные значения функциональной активности АНС регистрировали у пациентов с нормальным уровнем сознания. Так, в 1-й группе (норма уровня сознания, $n=10$), у 90% пациентов – норма ВРС, и всего у 1-го пациента (10%) зафиксировали симпатическую гиперактивность. В 2-й группе (состояние минимального сознания, $n=22$), 7 (31,8%) пациентов имели патологическое функциональное состояние АНС в виде симпатической гиперактивности. В 3-й группе (вегетативное состояние, $n=40$), число пациентов с патологическим функциональным уровнем активности АНС составило 28 (70%), из них 26 – с симпатической гиперактивностью (из подгруппы 3А, табл. 3), 2 – с парасимпатической гиперактивностью (из подгруппы 3В, табл. 3). Нормальные значения ВРС имели 12 (30%) пациентов. В 4-й группе (уровень сознания – кома, $n=5$) 80% пациентов имели пато-

imum consciousness, vegetative state and coma. The greatest differential differences were obtained using the Giocini scale, where the gradation of scoring from 22.9 $\pm$ 0.09 (normal consciousness) to 1.6 $\pm$ 0.39 (coma) was observed.

In 40 (51.9%) of 77 patients examined after a brain damage resulting from the craniocervical injury and stroke, ANS functional activity parameters were within the range of pathological values [18]. The sympathetic hyperactivity was identified in 34 patients, and in 6 cases the parasympathetic hyperactivity was diagnosed.

Pathological parameters of the HRV (Table 3) were found in most cases of severe forms of impairment of consciousness (vegetative state, coma) in 32 (80%) patients; and in the case of less severe impairment of consciousness (minimal consciousness) and in the case of normal consciousness they were found only in 20% of patients. The inverse dependence was found in the analysis of normal values of HRV: severe forms of impairment of consciousness (vegetative state and coma) were found in only 12 (32.4%) patients; and in the case of less severe forms of impairment of consciousness (minimal consciousness, normal consciousness), normal parameters of HRV were found in 25 (67.6%) patients. In the vast majority of cases, normal values of the ANS functional activity were found in patients with a normal level of consciousness. For example, in the group 1 (normal level of consciousness, $n=10$), 90% of patients presented normal HRV, and only 1 patient (10%) presented sympathetic hyperactivity. In the group 2 (state of minimal consciousness,

логию функциональной активности АНС. Достоверные отличия по электрофизиологическим параметрам ВРС получили между группами пациентов с нормой уровня сознания и пациентами находившимися в вегетативном состоянии и коме (соответственно, 1-я и 3-я и 4-я группы пациентов). Достоверных отличий по параметрам ВРС между группой пациентов находящихся в состоянии нормы уровня сознания (1-я группа) и группы пациентов в состоянии минимального сознания (2-я группа) не получили, что возможно указывает на восстановление центральной (гипоталамической) функциональной активности АНС и может служить хорошим прогностическим признаком.

Травматическое повреждение головного мозга (ТБИ), острое нарушение мозгового кровообращения, являются одними из основных причин смерти и тяжелой инвалидности во всем мире [19]. При этом неврологическая оценка — необходимый элемент дифференцировки пациентов в отделении интенсивной терапии. Определение уровня сознания по шкалам Glasgow, Four, Giacino предполагает подсчет различных симптомов в ответ на стимулы внешней среды (боль, речь, свет и т.п.). Субъективный характер данных методик признается многими исследователями, зависит от опыта врача. В целях увеличения точности зачастую прибегают к вычислению среднего результата по оценкам уровня сознания пациента несколькими медицинскими работниками, что затрудняет общую интерпретацию результата [2]. Кроме того, с учетом известных проблем данных шкал сознания предлагается их модифицировать, исключая, оценку моторного дефицита (так называемый бинарный метод применения шкалы Glasgow) [20]. Существенной проблемой определения уровня сознания с позиций неврологического и психологического подхода является отсутствие регистрации биохимических, гематологических, электрофизиологических параметров, что не позволяет определять структурные и функциональные патологические изменения головного мозга. В тоже время, накапливаются данные, что автономная дисфункция присутствует при повреждениях головного мозга и служит показателем состояния, исхода, функциональной независимости пациентов. В исследовании Esterov D. et al. (2017) показано, что автономная дисфункция при травме головного мозга вызывает нарушение функции комплекса органов и увеличивает показатели летальности [11]. Авторами найдено, что явления дисфункции АНС (на основании анализа вариабельности ритма сердца) сохраняются и после коррекции клинических симптомов ЧМТ. Hilz M. J. и соавт. (2017) провели оценку ВРС у пациентов с легкой, средней и тяжелой степенями повреждения головного мозга [12]. Авторы исследовали спектральные характеристики ВРС с определением симпатического высокочастотного спектра (LF) и парасимпатического низкочастотного

$n=22$), 7 (31.8%) patients had a pathological functional condition of the ANS in the form of sympathetic hyperactivity. In the group 3 (vegetative state, $n=40$), the number of patients with a pathological functional level of the ANS activity was 28 (70%), 26 of whom had sympathetic hyperactivity (subgroup 3A, table 3), and 2 patients had parasympathetic hyperactivity (subgroup 3B, table 3). Normal HRV values were found in 12 (30%) patients. In the group 4 (coma, $n=5$) the number of patients with a pathology of the ANS functional activity was 80%. Differences in the electrophysiological parameters of the HRV between groups of patients with the normal consciousness (group 1) vs. patients who were in the vegetative state (group 2) and coma (group 3) were significant. To the contrary, no significant differences in HRV parameters between the group of patients with normal consciousness (group 1) and the group of patients in the state of minimal consciousness (group 2) have been obtained. The latter may be due to the recovery of the central (hypothalamic) functional activity of the ANS and can serve as a good prognostic sign.

The traumatic brain injury (TBI) and an acute cerebral circulation disorder are among the leading causes of death and severe disability worldwide [19]. At the same time, the neurological evaluation is a necessary element of differentiation of patients in the intensive care unit. The assessment of the level of consciousness using Glasgow, Four, and Giacini scales involves the calculation of various symptoms in response to the environmental stimuli (pain, speech, light, etc.). The subjective nature of these techniques is recognized by many researchers and depends on doctor's experience. In order to increase the accuracy, the average result based on scoring of patient's level of consciousness by several healthcare professionals is often calculated, which complicates the overall interpretation of the result [2]. In addition, taking into account the known problems of these scales, it is proposed to modify them by excluding the evaluation of the motor deficiency (a so-called binary method of application of the Glasgow scale) [20]. Lack of registration of biochemical, hematological, and electrophysiological parameters that limits the understanding structural and functional pathological changes in the brain poses a significant problem in determining the level of consciousness from the standpoint of neurological and psychological approaches. At the same time, there are data on the autonomous dysfunction in a brain damage that may serve as an m marker of the state, outcome, and functional independence of patients. In a study of Esterov D. et al. (2017) it was shown that the autonomous dysfunction in a brain injury caused impairment of the organ complex function and increases mortality rates [11]. The authors found that the manifestations of the ANS dysfunction (on the basis of the analysis of the heart rhythm variability) are persisted even after correction of clinical symptoms of CCI. Hilz M. J. et al. (2017)

спектра (HF), соотношения LF/HF, нормализованных единиц LF и HF ВРС спектра и данные сравнены между группами в покое и при вертикализации. Авторы нашли корреляцию параметров автономной нервной системы и уровня шкалы комы Глазго ($p < 0,05$). Шкала комы Глазго коррелировала позитивно с LF, LF/HF и негативно — с HF. Mirow S. и соавт. (2016), показали, что анализ ВРС позволяет выполнить оценку координации структурных (анатомических) и функциональных систем организма [21]. Параметры ВРС суммированы и сравнены с неврологическим статусом. Патологический нистагм коррелирует со снижением SDNN на 25%. Повышение симпатической модуляции ассоциируется с уровнем тревожности — рост LF/HF на 19%. Эти данные свидетельствуют о необходимости оценки дисфункции АНС при обследовании пациентов после ЧМТ. Osteraas N. D. и соавт. (2017) в обзорной статье показывают клиническое значение оценки взаимодействия АНС и кардиоваскулярной систем [13].

Стресс-обусловленная кардиомиопатия, обусловленная нарушением взаимосвязи мозг-сердце, встречается при многих состояниях, и, в особенности, при травме головного мозга, приводя к симпатической гиперактивности. Введено понятие «пароксизмальной симпатической гиперактивности», которое встречается у пациентов после травм головного мозга с большой частотой (PSH Paroxysmal sympathetic hyperactivity). При PSH наблюдается целый каскад одновременно возникающих неблагоприятных симптомов: тахикардия, тахипноэ, гипертензия, лихорадка, дистония мышц, гипергидроз, что вместе взятое ухудшает соматический статус пациентов, неврологический прогноз, реабилитацию. Пациенты с симптомами PSH имеют худший нутритивный статус, у них чаще развиваются инфекционные осложнения, длительнее пребывание в отделениях интенсивной терапии, достоверно выше летальность [22–25]. PSH вызывает существенно нарушает гомеостаз и приводит к вторичному, кумулятивному повреждению головного мозга. Именно симпатическая гиперактивность и является основным патологическим изменением функциональной активности АНС у пациентов в вегетативном состоянии и в состоянии комы. Очевидно, что оценка дисфункции АНС — необходимый и обязательный элемент обследования пациентов после ЧМТ, аноксии головного мозга, последствий периперационных осложнений.

Заключение

Компьютерный анализ variability сердечного ритма — необходимый элемент обследования пациентов с различными уровнями сознания после повреждения головного мозга травматического и нетравматического генеза.

assessed the HRV in patients with mild, moderate and severe degrees of brain damage [12]. The authors investigated the spectral characteristics of the HRV determining the sympathetic high-frequency spectrum (LF) and parasympathetic low-frequency spectrum (HF), the LF/HF ratio, normalized units of the LF and HF HRV spectrum. The groups including patients at a rest and during verticalization were compared. The authors found a correlation between the parameters of the autonomous nervous system and the consciousness level determined by a Glasgow coma scale ($P < 0.05$). Glasgow coma scale correlated positively with LF, LF/HF whereas negative correlation with HF was found. Mirow S. et al. (2016) showed that the analysis of the HRV allows assessing the coordination of structural (anatomical) and functional systems of the body [21]. The HRV parameters were summarized and compared to the neurological status. Pathological nystagmus correlated with a 25% decrease of SDNN values. The increase in sympathetic modulation associated with the level of anxiety: a 19-percent growth of LF/HF was noted. These data demonstrate the need to assess ANS dysfunctions while examining patients after CCI. Osteraas N.D. et al. (2017) in a review article have shown the clinical value of assessment of interaction of the ANS and cardiovascular systems [13].

Stress-related cardiomyopathy caused by impairment of the brain-heart interconnection occurs in many conditions and especially in the brain injury leading to sympathetic hyperactivity. The concept of «paroxysmal sympathetic hyperactivity» has been introduced, which occurs very commonly in patients after brain injuries (PSH, Paroxysmal sympathetic hyperactivity). In PSH, there is a cascade of simultaneously occurring adverse symptoms: tachycardia, tachypnea, hypertension, fever, muscle dystonia, and hyperhidrosis, which together worsen the somatic status of patients, neurological prognosis, and rehabilitation. Patients with symptoms of PSH have a more severe nutritional status, more often develop infectious complications, stay in the intensive care units for a longer period of time, and exhibit a significantly higher mortality rate [22–25]. PSH causes a significant impairment of homeostasis and leads to a secondary, cumulative brain damage. It is sympathetic hyperactivity that is the main pathological change in the ANS functional activity in patients in the vegetative state and in coma. It is obvious that the assessment of dysfunction of the ANS is a necessary and compulsory element of the examination of patients after a craniocerebral injury, anoxia of the brain, and consequences of perioperative complications.

Conclusion

The computer analysis of the HRV is an obligatory element of examination of patients with different

Анализ частоты изменений функционального состояния АНС по группам пациентов выявил достоверное градуальное нарастание показателей АНС у пациентов — от группы с нормального уровня сознания к группам с состоянием минимального сознания, вегетативного состояния и комы.

Основным вариантом патологии АНС в группах пациентов, находящихся в состоянии минимального сознания, вегетативном состоянии и коме, является симпатическая гиперактивность, резкое усиление тонуса симпатического звена АНС.

Оценка функции АНС позволяет контролировать уровень сознания пациентов после повреждения головного мозга травматического и нетравматического генеза.

Литература

1. Sadaka F., Pate D., Lakshmanan R. The FOUR score predicts outcome in patients after traumatic brain injury. *Neurocrit. Care.* 2012; 16 (1): 95-101. DOI: 10.1007/s12028-011-9617-5. PMID: 21845490
2. Jalali R., Rezaei M. A comparison of the Glasgow Coma Scale score with full outline of unresponsiveness scale to predict patients' traumatic brain injury outcomes in intensive care units. *Crit. Care Res. Pract.* 2014; 2014: 289803. DOI: 10.1155/2014/289803. PMID: 25013727
3. Teasdale G.M., Pettigrew L.E., Wilson J.T., Murray G., Jennett B. Analyzing outcome of treatment of severe head injury: a review and update on advancing the use of the Glasgow Outcome Scale. *J. Neurotrauma.* 1998; 15 (8): 587-597. DOI: 10.1089/neu.1998.15.587. PMID: 9726258
4. Abou El Fadl M.H., O'Phelan K.H. Management of traumatic brain injury: an update. *Neurol. Clin.* 2017; 35 (4): 641-653. DOI: 10.1016/j.ncl.2017.06.003. PMID: 28962805
5. Zafar S.F., Postma E.N., Biswal S., Fleuren L., Boyle E.J., Bechek S., O'Connor K., Shenoy A., Jonnalagadda D., Kim J., Shafi M.S., Patel A.B., Rosenthal E.S., Westover M.B. Electronic health data predict outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit. Care.* 2017; Oct 5. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s12028-017-0466-8. PMID: 28983801
6. Bartolo M., Bargellesi S., Castioni C.A., Intiso D., Fontana A., Copetti M., Scarponi F., Bonaiuti D.; the Intensive Care and Neurorehabilitation Italian Study Group. Mobilization in early rehabilitation in intensive care unit patients with severe acquired cerebral injury: an observational study. *J. Rehabil. Med.* 2017; 49 (9): 715-722. DOI: 10.2340/16501977-2269. PMID: 28980699
7. Martinell L., Nielsen N., Herlitz J., Karlsson T., Horn J., Wise M.P., Undén J., Rylander C. Early predictors of poor outcome after out-of-hospital cardiac arrest. *Crit. Care.* 2017; 21 (1): 96. DOI: 10.1186/s13054-017-1677-2. PMID: 28410590
8. Majdan M., Brazinova A., Rusnak M., Leitgeb J. Outcome prediction after traumatic brain injury: comparison of the performance of routinely used severity scores and multivariable prognostic models. *J. Neurosci. Rural. Pract.* 2017; 8 (1): 20-29. DOI: 10.4103/0976-3147.193543. PMID: 28149077
9. Hilz M.J., Aurnhammer F., Flanagan S.R., Intravooth T., Wang R., Hösl K.M., Pauli E., Koehn J. Eyeball pressure stimulation unveils subtle autonomic cardiovascular dysfunction in persons with a history of mild traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2015; 32 (22): 1796-1804. DOI: 10.1089/neu.2014.3842. PMID: 26192266
10. Hoarau X., Richer E., Dehail P., Cuny E. Comparison of long-term outcomes of patients with severe traumatic or hypoxic brain injuries treated with intrathecal baclofen therapy for dysautonomia. *Brain Inj.* 2012; 26 (12): 1451-1463. DOI: 10.3109/02699052.2012.694564. PMID: 22725634
11. Esterov D., Greenwald B.D. Autonomic dysfunction after mild traumatic brain injury. *Brain Sci.* 2017; 7 (8): pii: E100. DOI: 10.3390/brainsci7080100. PMID: 28800081
12. Hilz M.J., Wang R., Markus J., Ammon F., Hösl K.M., Flanagan S.R., Winder K., Koehn J. Severity of traumatic brain injury correlates with long-term cardiovascular autonomic dysfunction. *J. Neurol.* 2017; Aug 2. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s00415-017-8581-1. PMID: 28770375
13. Osteraas N.D., Lee V.H. Neurocardiology. *Handb. Clin. Neurol.* 2017; 140: 49-65. DOI: 10.1016/B978-0-444-63600-3.00004-0. PMID: 28187814
14. Rogobete A.F., Sandesc D., Papurica M., Stoicescu E.R., Popovici S.E., Bratu L.M., Vernic C., Sas A.M., Stan A.T., Bedreag O.H. The influence of metabolic imbalances and oxidative stress on the outcome of critically ill polytrauma patients: a review. *Burns Trauma.* 2017; 5: 8. DOI: 10.1186/s41038-017-0073-0. PMID: 28286784
15. Sauaia A., Moore F.A., Moore E.E. Postinjury inflammation and organ dysfunction. *Crit. Care Clin.* 2017; 33 (1): 167-191. DOI: 10.1016/j.ccc.2016.08.006. PMID: 27894496

levels of consciousness after a brain damage of a traumatic and non-traumatic genesis.

The frequency of changes in the functional state of the ANS in patients has been significantly and gradually increasing starting from the group with patients exhibiting normal level of consciousness to groups of patients with minimal consciousness, vegetative state, and coma.

A sympathetic hyperactivity, a precipitous enhancement of sympathetic ANS, is the main type of ANS pathology in the groups of patients with minimal consciousness, in the vegetative state and coma.

The assessment of the ANS function allows to monitor the level of consciousness of patients after traumatic and non-traumatic brain injury.

References

1. Sadaka F., Pate D., Lakshmanan R. The FOUR score predicts outcome in patients after traumatic brain injury. *Neurocrit. Care.* 2012; 16 (1): 95-101. DOI: 10.1007/s12028-011-9617-5. PMID: 21845490
2. Jalali R., Rezaei M. A comparison of the Glasgow Coma Scale score with full outline of unresponsiveness scale to predict patients' traumatic brain injury outcomes in intensive care units. *Crit. Care Res. Pract.* 2014; 2014: 289803. DOI: 10.1155/2014/289803. PMID: 25013727
3. Teasdale G.M., Pettigrew L.E., Wilson J.T., Murray G., Jennett B. Analyzing outcome of treatment of severe head injury: a review and update on advancing the use of the Glasgow Outcome Scale. *J. Neurotrauma.* 1998; 15 (8): 587-597. DOI: 10.1089/neu.1998.15.587. PMID: 9726258
4. Abou El Fadl M.H., O'Phelan K.H. Management of traumatic brain injury: an update. *Neurol. Clin.* 2017; 35 (4): 641-653. DOI: 10.1016/j.ncl.2017.06.003. PMID: 28962805
5. Zafar S.F., Postma E.N., Biswal S., Fleuren L., Boyle E.J., Bechek S., O'Connor K., Shenoy A., Jonnalagadda D., Kim J., Shafi M.S., Patel A.B., Rosenthal E.S., Westover M.B. Electronic health data predict outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit. Care.* 2017; Oct 5. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s12028-017-0466-8. PMID: 28983801
6. Bartolo M., Bargellesi S., Castioni C.A., Intiso D., Fontana A., Copetti M., Scarponi F., Bonaiuti D.; the Intensive Care and Neurorehabilitation Italian Study Group. Mobilization in early rehabilitation in intensive care unit patients with severe acquired cerebral injury: an observational study. *J. Rehabil. Med.* 2017; 49 (9): 715-722. DOI: 10.2340/16501977-2269. PMID: 28980699
7. Martinell L., Nielsen N., Herlitz J., Karlsson T., Horn J., Wise M.P., Undén J., Rylander C. Early predictors of poor outcome after out-of-hospital cardiac arrest. *Crit. Care.* 2017; 21 (1): 96. DOI: 10.1186/s13054-017-1677-2. PMID: 28410590
8. Majdan M., Brazinova A., Rusnak M., Leitgeb J. Outcome prediction after traumatic brain injury: comparison of the performance of routinely used severity scores and multivariable prognostic models. *J. Neurosci. Rural. Pract.* 2017; 8 (1): 20-29. DOI: 10.4103/0976-3147.193543. PMID: 28149077
9. Hilz M.J., Aurnhammer F., Flanagan S.R., Intravooth T., Wang R., Hösl K.M., Pauli E., Koehn J. Eyeball pressure stimulation unveils subtle autonomic cardiovascular dysfunction in persons with a history of mild traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2015; 32 (22): 1796-1804. DOI: 10.1089/neu.2014.3842. PMID: 26192266
10. Hoarau X., Richer E., Dehail P., Cuny E. Comparison of long-term outcomes of patients with severe traumatic or hypoxic brain injuries treated with intrathecal baclofen therapy for dysautonomia. *Brain Inj.* 2012; 26 (12): 1451-1463. DOI: 10.3109/02699052.2012.694564. PMID: 22725634
11. Esterov D., Greenwald B.D. Autonomic dysfunction after mild traumatic brain injury. *Brain Sci.* 2017; 7 (8): pii: E100. DOI: 10.3390/brainsci7080100. PMID: 28800081
12. Hilz M.J., Wang R., Markus J., Ammon F., Hösl K.M., Flanagan S.R., Winder K., Koehn J. Severity of traumatic brain injury correlates with long-term cardiovascular autonomic dysfunction. *J. Neurol.* 2017; Aug 2. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s00415-017-8581-1. PMID: 28770375
13. Osteraas N.D., Lee V.H. Neurocardiology. *Handb. Clin. Neurol.* 2017; 140: 49-65. DOI: 10.1016/B978-0-444-63600-3.00004-0. PMID: 28187814
14. Rogobete A.F., Sandesc D., Papurica M., Stoicescu E.R., Popovici S.E., Bratu L.M., Vernic C., Sas A.M., Stan A.T., Bedreag O.H. The influence of metabolic imbalances and oxidative stress on the outcome of critically ill polytrauma patients: a review. *Burns Trauma.* 2017; 5: 8. DOI: 10.1186/s41038-017-0073-0. PMID: 28286784
15. Sauaia A., Moore F.A., Moore E.E. Postinjury inflammation and organ dysfunction. *Crit. Care Clin.* 2017; 33 (1): 167-191. DOI: 10.1016/j.ccc.2016.08.006. PMID: 27894496

16. Giacino J.T., Ashwal S., Childs N., Cranford R., Jennett B., Katz D.I., Kelly J.P., Rosenberg J.H., Whyte J., Zafonte R.D., Zasler N.D. The minimally conscious state: definition and diagnostic criteria. *Neurology*. 2002; 58 (3): 349-353. DOI: 10.1212/WNL.58.3.349. PMID: 11839831
17. Malik M., Huikuri H., Lombardi F., Schmidt G.; e-Health/Digital Rhythm Study Group of the European Heart Rhythm Association. The purpose of heart rate variability measurements. *Clin. Auton. Res.* 2017; 27 (3): 139-140. DOI: 10.1007/s10286-017-0416-8. PMID: 28349277
18. Кирячков Ю.Ю., Салтанов А.И., Хмелевский Я.М. Компьютерный анализ вариабельности ритма сердца. Новые возможности для анестезиолога и врачей других специальностей. *Вестн. интенс. терапии*. 2002; 1: 3-8.
19. Godbolt A.K., Stenberg M., Jakobsson J., Sorjonen K., Krakau K., Ståhnacke B.M., Nygren DeBoussard C. Complications during recovery from severe traumatic brain injury: frequency and associations with outcome. *BMJ Open*. 2015; 5 (4): e007208. DOI: 10.1136/bmjopen-2014-007208. PMID: 25941181
20. Kupas D.F., Melnychuk E.M., Young A.J. Glasgow Coma Scale motor component («Patient Does Not Follow Commands») performs similarly to total Glasgow Coma Scale in predicting severe injury in trauma patients. *Ann. Emerg. Med.* 2016; 68 (6): 744.e3-750.e3. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2016.06.017. PMID: 27436703
21. Mirow S., Wilson S.H., Weaver L.K., Churchill S., Deru K., Lindblad A.S. Linear analysis of heart rate variability in post-concussive syndrome. *Undersea Hyperb. Med.* 2016; 43 (5): 531-547. PMID: 28768072
22. Hinson H.E., Schreiber M.A., Laurie A.L., Baguley I.J., Bourdette D., Ling G.S. Early fever as a predictor of paroxysmal sympathetic hyperactivity in traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 2017; 32 (5): E50-E54. DOI: 10.1097/HTR.0000000000000271. PMID: 28060200
23. Samuel S., Allison T.A., Lee K., Choi H.A. Pharmacologic management of paroxysmal sympathetic hyperactivity after brain injury. *J. Neurosci. Nurs.* 2016; 48 (2): 82-89. DOI: 10.1097/JNN.0000000000000207. PMID: 26954919
24. Fernandez-Ortega J.F., Prieto-Palomino M.A., Garcia-Caballero M., Galeas-Lopez J.L., Quesada-Garcia G., Baguley I.J. Paroxysmal sympathetic hyperactivity after traumatic brain injury: clinical and prognostic implications. *J. Neurotrauma*. 2012; 29 (7): 1364-1370. DOI: 10.1089/neu.2011.2033. PMID: 22150061
25. Toklu H.Z., Sakarya Y., Tümer N. A proteomic evaluation of sympathetic activity biomarkers of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by western blotting technique following experimental traumatic brain injury. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1598: 313-325. DOI: 10.1007/978-1-4939-6952-41_6. PMID: 28508370
16. Giacino J.T., Ashwal S., Childs N., Cranford R., Jennett B., Katz D.I., Kelly J.P., Rosenberg J.H., Whyte J., Zafonte R.D., Zasler N.D. The minimally conscious state: definition and diagnostic criteria. *Neurology*. 2002; 58 (3): 349-353. DOI: 10.1212/WNL.58.3.349. PMID: 11839831
17. Malik M., Huikuri H., Lombardi F., Schmidt G.; e-Health/Digital Rhythm Study Group of the European Heart Rhythm Association. The purpose of heart rate variability measurements. *Clin. Auton. Res.* 2017; 27 (3): 139-140. DOI: 10.1007/s10286-017-0416-8. PMID: 28349277
18. Kiryachkov Yu.Yu., Saltanov A.I., Khmelevsky Ya.M. Computer analysis of heart rate variability. New opportunities for an anesthesiologist and doctors of other specialties. *Vestnik Intensivnoi Terapii*. 2002; 1: 3-8. [In Russ.]
19. Godbolt A.K., Stenberg M., Jakobsson J., Sorjonen K., Krakau K., Ståhnacke B.M., Nygren DeBoussard C. Complications during recovery from severe traumatic brain injury: frequency and associations with outcome. *BMJ Open*. 2015; 5 (4): e007208. DOI: 10.1136/bmjopen-2014-007208. PMID: 25941181
20. Kupas D.F., Melnychuk E.M., Young A.J. Glasgow Coma Scale motor component («Patient Does Not Follow Commands») performs similarly to total Glasgow Coma Scale in predicting severe injury in trauma patients. *Ann. Emerg. Med.* 2016; 68 (6): 744.e3-750.e3. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2016.06.017. PMID: 27436703
21. Mirow S., Wilson S.H., Weaver L.K., Churchill S., Deru K., Lindblad A.S. Linear analysis of heart rate variability in post-concussive syndrome. *Undersea Hyperb. Med.* 2016; 43 (5): 531-547. PMID: 28768072
22. Hinson H.E., Schreiber M.A., Laurie A.L., Baguley I.J., Bourdette D., Ling G.S. Early fever as a predictor of paroxysmal sympathetic hyperactivity in traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 2017; 32 (5): E50-E54. DOI: 10.1097/HTR.0000000000000271. PMID: 28060200
23. Samuel S., Allison T.A., Lee K., Choi H.A. Pharmacologic management of paroxysmal sympathetic hyperactivity after brain injury. *J. Neurosci. Nurs.* 2016; 48 (2): 82-89. DOI: 10.1097/JNN.0000000000000207. PMID: 26954919
24. Fernandez-Ortega J.F., Prieto-Palomino M.A., Garcia-Caballero M., Galeas-Lopez J.L., Quesada-Garcia G., Baguley I.J. Paroxysmal sympathetic hyperactivity after traumatic brain injury: clinical and prognostic implications. *J. Neurotrauma*. 2012; 29 (7): 1364-1370. DOI: 10.1089/neu.2011.2033. PMID: 22150061
25. Toklu H.Z., Sakarya Y., Tümer N. A proteomic evaluation of sympathetic activity biomarkers of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by western blotting technique following experimental traumatic brain injury. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1598: 313-325. DOI: 10.1007/978-1-4939-6952-41_6. PMID: 28508370

Поступила 09.11.17

Received 09.11.17

XIV Всероссийская ежегодная конференция с международным участием «Проблема инфекции при критических состояниях» (Проблема «ИКС»)

6–7 июня 2018 г., НИИ Общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Россия 107031, г. Москва, ул. Петровка 25, стр. 2

Организаторы конференции: Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитации (ФНКЦ РР), НИИОР им. В. А. Неговского. МГМСУ им. А. И. Евдокимова, Российская Ассоциация детских хирургов, РНИМУ им. Н. И. Пирогова, НИИ НДХиТ ДЗ г. Москвы.

Участие для врачей бесплатное. Во время работы конференции, в рамках федерального пилотного проекта по непрерывному медицинскому образованию (НМО) с начислением баллов, состоится курс лекций с участием зарубежных экспертов Т. Sharshar (France), J. Fazakas (Hungary). Принятые Оргкомитетом тезисы и статьи будут опубликованы БЕСПЛАТНО в официальном Сборнике конференции. Сборнику будет присвоен код ISBN, обеспечена рассылка в библиотеки РФ и Российскую книжную палату.

Для участия в конференции необходимо направить в Оргкомитет заявку или запрос официального приглашения. В них следует указать: ФИО, организацию, подразделение, адрес, телефон, E-mail для обратной связи, а также желаемую форму участия (посещение заседаний, доклад, демонстрация клинического случая, обучение на мастер-классе, публикация в сборнике: тезисы – 1–2 стр. и /или статья – 5–10 стр.). **ТРЕБОВАНИЯ К ТЕЗИСАМ:** формат A4, шрифт Times New Roman, размер 12 пт, межстрочный интервал 1,5, поля по краям 2,5 см. Контент – не более 2-х страниц выверенного текста, включающего: Название; Фамилию, И.О. авторов; Учреждение; Город; Страну; Цель; Материалы и методы; Результаты; Выводы; ФИО, почтовый адрес телефон, факс, e-mail ответственного автора. Файл с тезисом в формате Word for Windows называют фамилией первого автора и отправляют по электронной почте problema-x@yandex.ru в виде приложения. Направляемые материалы должны быть получены Оргкомитетом не позднее 07 апреля 2018 г.

Координатор научной программы:

д.м.н, проф. Н.В. Белобородова +7 (916) 131-74-54; E-mail: nvbeloborodova@yandex.ru

Оргкомитет, ответственный за публикацию материалов конференции:

к.б.н. Е. А. Черневская: +7 (906) 792-70-41; E-mail: nproblema-x@yandex.ru

Информационная поддержка – Русский Медицинский Сервер: <http://rusmedserv.com>

Нарушение липидного обмена у новорожденных в раннем неонатальном периоде

С. А. Перепелица

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии
Россия, 10703, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2
Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта,
Россия, 236041, г. Калининград, ул. Александра Невского, д. 14

Impairment of the Lipid Metabolism in Newborns in the Early Neonatal Period

Svetlana A. Perepelitsa

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia
Immanuel Kant Baltic Federal University
14 Aleksandr Nevsky Str., 236041 Kaliningrad, Russia

Цель работы. Исследование показателей липидного обмена у новорожденных для выявления общих закономерностей в зависимости от гестационного возраста.

Материал и методы. Провели анализ течения беременности и ее исхода у 286-и женщин, от которых родилось 323 новорожденных ребенка, из них 89 детей от многоплодной беременности. Детей, в зависимости от их гестационного возраста, разделили на 4 группы. Проводили определение содержания холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), липопротеинов низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности в центральной венозной крови сразу после рождения и на 5-е сутки жизни.

Результаты. Для 31,3% новорожденных характерна гипотриглицеридемия менее 0,2 ммоль/л, содержание ТГ в крови в пределах 0,21–0,5 ммоль/л выявлено у 43,3% детей, т. е. у 76,6% снижена перинатальная продукция ТГ. Перинатальная продукция ТГ зависит от гестационного возраста ребенка, чем он меньше, тем ниже содержание ТГ в крови у новорожденных при рождении. При сроках гестации 25–33 недели перинатальная продукция ТГ низкая у большинства новорожденных. С увеличением срока гестации увеличивается перинатальная продукция исследуемого показателя липидного обмена. Содержание ТГ в крови быстро возрастает при достижении гестационного возраста 37 недель. Постнатальная продукция ТГ в крови новорожденных не имеет зависимости от гестационного возраста при сроке гестации от 31 недели и более. При рождении у новорожденных всех групп определяли гипохолестеринемию, низкое содержание ЛПНП и ЛПВП, достоверных отличий между группами по исследуемым показателям не выявили ($p > 0,01$).

Выводы. Состояние липидного обмена у новорожденных в перинатальном периоде зависит от гестационного возраста и массы тела при рождении. Низкая продукция ТГ характерна для глубоко недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении, что обусловлено физиологической незрелостью органов и систем. Особенности пренатального морфогенеза таковы, что полноценный липидный обмен возможен только к доношенному сроку гестации. Патологическое течение беременности нарушает нормальную продукцию триглицеридов, холестерина, липидов низкой и высокой плотности. Наибольшие изменения исследуемых показателей характерны для глубоко недоношенных детей с гестационным возрастом 25–31 неделя. Это возраст ассоциирован с высокой частотой развития респираторного дистресс-синдрома. На продукцию ТГ при рождении влияет дефицит буферных оснований, на содержание холестерина — величина рН и напряжение кислорода в крови при рождении. При увеличении срока гестации содержание продуктов липидного обмена увеличивается. Имеются индивидуальные особенности новорожденных, у которых при доношенном сроке беременности возможны перинатальные нарушения липидного обмена.

Ключевые слова: новорожденные; гестационный возраст; триглицериды; холестерин; липиды низкой и высокой плотности

The purpose of the study. To study parameters of the lipid metabolism in newborn infants to identify general patterns depending on the gestational age.

Materials and methods. The course of pregnancy and its outcome was analyzed in 286 women who gave birth to 323 infants; 89 of them were born in multiple pregnancies. The infants were divided into 4 groups depending on the gestational age. Levels of cholesterol (C), triglycerides (TG), low-density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL) were tested in the central venous blood immediately after birth and on the 5th day of life.

Адрес для корреспонденции:

Светлана Перепелица
E-mail: sveta_perepeliza@mail.ru

Correspondence to:

Svetlana Perepelitsa
E-mail: sveta_perepeliza@mail.ru

Results. Hypotriglyceridemia below 0.2 mmol/l was typical for 31.3% of the newborns; a TG level within the range of 0.21–0.5 mmol/l was found in 43.3% of infants, i.e. the perinatal production of TG was decreased in 76.6% of infants. The perinatal TG production depended on the infant's gestational age: the smaller it was, the lower TG blood level was in infants at birth. At the gestational age of 25–33 weeks, the perinatal TG production was low in most newborns. The perinatal production of the lipid metabolism parameter was increased with the increase of the gestational age. The TG blood level increased rapidly at the gestational age of 37 weeks. The postnatal TG production in the blood of newborn babies had no dependence on the gestational age starting from the gestational age of 31 weeks and more. Hypercholesterolemia and lower both LDL and HDL levels were found in newborns of all groups at birth; no significant intergroup differences in concentration of C, HDL or LDL were observed ($P>0.01$).

Conclusion. The state of the lipid metabolism in the newborns in the perinatal period depends on the gestational age and the birth weight. Low TG production is typical for small premature infants with a low and extremely low birth weight due to physiological immaturity of organs and systems. The peculiarities of the prenatal morphogenesis make an adequate lipid metabolism possible by the full-term gestational age only. An abnormal course of pregnancy impairs normal triglyceride, C, LDL and HDL production. The greatest changes of the tested parameters are typical for small immature infants with a gestational age of 25–31 weeks. This age is associated with a high incidence of the respiratory distress syndrome. Deficiency of buffer bases affects the TG production at birth; the pH value and blood oxygen tension at birth affect the C level. The production of lipid metabolism parameters increases with the increase of the gestational age. There are certain individual characteristics in newborns who may have perinatal disorders of the lipid metabolism at the full-term gestational age.

Keywords: newborns; gestational age; triglycerides; cholesterol; low- and high-density lipids

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-13-24

Введение

В настоящее время уделяется большое внимание изучению липидного обмена при беременности и у новорожденных в раннем неонатальном периоде. Холестерин и триглицериды являются важнейшими компонентами липидного обмена, обеспечивающие необходимый липидный метаболизм, полноценное развитие эмбриона и плода. Изучение транспорта липидов от матери к плоду позволяет выяснить, способна ли дислипидемия матери вызывать нарушение функции органов у новорожденных в раннем постнатальном периоде.

Некоторые авторы считают плаценту транспортным каналом для липидов от матери к плоду, на этот транспорт могут влиять материнские заболевания, в том числе связанные с липидным обменом. Отношения материнского липидного профиля с липидным профилем новорожденного до сих пор недостаточно изучены. Некоторые авторы сообщают о наличии переноса липидов через плаценту, но этого недостаточно, чтобы влиять на концентрацию липидов в плазме плода. Физиологические и биохимические механизмы переноса питательных веществ через плаценту довольно сложны. По мнению некоторых авторов, триглицериды не переносятся от матери к плоду [1]. В ранних сроках гестации длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ДПНЖК) могут накапливаться в материнском организме и становятся доступными для транспорта через плаценту в поздние сроки беременности. В это время скорость роста плода максимальна и требуется достаточное количество ДПНЖК для обеспечения его полноценного роста и развития. При этом возникает физиологическая гиперлипидемия, триацилглицеридемия у матери, обусловленная повышенной липолитической активностью в жировой ткани. Наличие

Introduction

Currently, much attention is paid to the study of the lipid metabolism during pregnancy and in newborns in the early neonatal period. Cholesterol and triglycerides are essential components of the lipid metabolism ensuring the required lipid metabolism and the adequate development of the embryo and fetus. The evaluation of the transport of lipids from mother to fetus permits to find out whether mother's dyslipidemia associates with dysfunction of organs in newborns in the early postnatal period.

Some authors consider the placenta a transport channel for lipids from mother to fetus; this transport may be affected by maternal diseases, including those related to the lipid metabolism. The relationship of the maternal lipid profile with the newborn's lipid profile has not been thoroughly studied to date. Several studies have reported on the passage of lipids through the placenta, but not enough to affect the concentration of lipids in the fetal plasma. Physiological and biochemical mechanisms of the passage of nutrients through the placenta are quite complex. According to studies, triglycerides do not pass from mother to fetus [1]. In earlier gestational ages long chain polyunsaturated fatty acids (LCPs) may be accumulated in the maternal body and are available to transport through the placenta in the later stages of pregnancy. At that, the fetal growth rate is maximum and requires enough amount of LCPs to ensure its adequate growth and development. At that, a physiological maternal hyperlipidemia and triacylglycerolemia occur caused by increased lipolytic activity in the adipose tissue. The presence of lipoprotein receptors in the placenta allows lipoproteins transfer through placenta. The selected fatty acids can be metabolized and diffuse into fetal plasma [2].

Cholesterol is crucial for the development of the fetus throughout pregnancy because it is an integral

липопротеиновых рецепторов в плаценте позволяет осуществлять их плацентарный перенос. Выделенные жирные кислоты могут метаболизироваться и диффундировать в плазму плода [2].

Холестерин имеет решающее значение для развития плода на протяжении всей беременности, т.к. он является неотъемлемой частью каждой клеточной мембраны. Поскольку большинство путей передачи сигналов необходимы для роста, пролиферации и метаболизма, ХС, обеспечивая мембранную функцию, необходим для нормального развития плода. Биосинтез фетального холестерина, а не перенос холестерина из материнских липопротеинов, по-видимому, является основным механизмом для удовлетворения потребностей плода в поздние сроки беременности [3,4]. После того, как ХС секретируется, он вытекает с базальной стороны трофобласта и должен достичь, а затем проникнуть в эндотелиальные клетки фетоплацентарной сосудистой сети и попасть в плодовую циркуляцию крови. Используя человеческие плацентарные эндотелиальные клетки, было показано, что экзогенный ХС секретируется различными акцепторами. Этот процесс жестко регулируется клеточным ХС и активностью различных специфических рецепторов [5]. Изменение материнского липидного профиля существенно не связано со средними концентрациями общего ХС, липопротеидов низкой и высокой плотности, а также ТГ у новорожденных [6].

Триглицериды переносятся в кровь плода как липопротеины [7]. Для этого необходим их гидролиз в свободные жирные кислоты, прежде чем они могут быть перенесены через синцитиотрофобласт плаценты. В плазматической мембране плаценты идентифицированы два типа гидролаз ТГ: специфическая для плаценты гидролаза и липопротеиновая липаза [8–11].

При гестозе выражены изменения липидного метаболизма в тканевых структурах плаценты. Развитие гестоза вызывает нарушение тканевых структур хориона, в частности, его липидного спектра. Гестоз средней степени тяжести сопровождается дисбалансом липидов в ткани хориона: снижением уровня фосфолипидов (ФЛ) и холестерина, повышением удельного веса свободных жирных кислот. Изменения касаются не только общего ХС, но и моноацилглицеролов, диацилглицеролов и суммарных ФЛ [12]. Аналогичные изменения выявлены в плазме крови, эритроцитах беременных с гестозом. Чем тяжелее протекает заболевание, тем больше выражены расстройства липидного обмена не только в плазме крови, но и эритроцитах, плаценте, что обусловлено усилением процессов липопероксидации и активации фосфолипазы A_2 [13].

Содержание липопротеидов в плазме крови здоровых новорожденных значительно ниже, чем у взрослых. Характерной особенностью является отсутствие хиломикрон и уменьшенное содержание липопротеинов низкой плотности (ЛПНП).

part of every cell membrane. Since most of the signaling pathways are needed for growth, proliferation and metabolism, cholesterol is required for normal development of the fetus ensuring the membrane function. The biosynthesis of fetal cholesterol, rather than the transfer of cholesterol from maternal lipoproteins, presumably is the primary mechanism of satisfying the fetal requirements during the later stages of pregnancy [3, 4]. When cholesterol is synthesized, it derives from the basal side of the trophoblast and should reach and then penetrate the endothelial cells of the fetoplacental vascular network and get into the fetal circulation. Using human placental endothelial cells, it has been shown that exogenous cholesterol is secreted by various acceptors. This process is strictly regulated by cellular cholesterol and by the activity of specific receptors [5]. Changes in the maternal lipid profile are not significantly associated with average concentrations of total cholesterol, low and high density lipoproteins, as well as TG in newborns [6].

Triglycerides are transported into the fetal bloodstream as lipoproteins [7]. This requires their hydrolysis into free fatty acids before they can be transferred through the placental syncytiotrophoblast. Two types of TG hydrolases are identified in the plasma membrane of the placenta: placenta-specific hydrolase and lipoprotein lipase [8–11].

Changes in the lipid metabolism in the placental tissue structures are marked in gestosis. The development of gestosis causes impairment of chorion tissue structures, in particular, its lipid profile. Moderate gestosis is accompanied by lipid imbalance in chorion tissue: decreased levels of phospholipids (PL) and cholesterol, increased proportion of free fatty acids. The changes are related not only to total cholesterol, but also monoacylglycerols, diacylglycerols and total PLs [12]. Similar changes were detected in the blood plasma and erythrocytes of pregnant women with gestosis. The more severe disease is, the more significant alteration of lipid metabolism may be found not only in blood plasma, but also in erythrocytes, placenta due to increased lipid peroxidation and activation of phospholipase A_2 [13].

The concentration of lipoproteins in the blood plasma of healthy newborns is significantly lower than that in adults. The lack of chylomicrons and decreased low density lipoproteins (LDL) concentration constitute a typical feature of healthy newborn lipoprotein fraction. High density lipoproteins (HDL) are the main class of lipoproteins. There are congenital dyslipidemias diagnosed from the first months of the infant's life and caused by the influence of adverse factors in the perinatal period [14].

Critical pH and lactate values, blood buffer base deficiency, hypotriglyceridemia, and hypocholesterolemia are pathognomonic for development of perinatal shock in newborns. Rapidly emerging respiratory failure combined with severe impairment of the metabolism (hyperlactatemia, base deficiency,

Основной класс липопротеинов — это липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Выделяют врожденные дислипидемии, которые выявляются с первых месяцев жизни ребенка и обусловлены воздействием неблагоприятных факторов в перинатальном периоде [14].

Критические показатели рН, лактата, дефицит буферных оснований крови гипотриглицеридемия, гипохолестеринемия являются патогномоничными для развития шока у новорожденных. Быстро формирующаяся дыхательная недостаточность, в сочетании с глубокими нарушениями метаболизма (гиперлактатемия, дефицит оснований, гипотриглицеридемия, гипохолестеринемия), резистентная к проводимой терапии, свидетельствует о тяжести и длительности антенатальной гипоксии, и являются показаниями для раннего проведения высокочастотной осцилляторной (ВЧО) искусственной вентиляции легких (ИВЛ). При выборе режима ИВЛ необходимо учитывать степень декомпенсации метаболизма, обмена триглицеридов и холестерина у новорожденных [15–17].

В настоящее время мало научных исследований, посвященных состоянию липидного обмена у новорожденных в перинатальном периоде. Не сформулированы общие закономерности их изменений у новорожденных в зависимости от гестационного возраста.

Цель работы — исследование показателей липидного обмена у новорожденных для выявления общих закономерностей в зависимости от гестационного возраста

Материал и методы

Провели анализ течения беременности и ее исхода у 286 женщин, от которых родилось 323 новорожденных ребенка, из них 89 детей от многоплодной беременности. Детей, в зависимости от их гестационного возраста, разделили на 4 группы:

- группа «А» — от 54 матерей родилось 62 новорожденных с гестационным возрастом 25–30 недель;
- группа «В» — от 87 матерей родилось 99 детей со сроком гестации 31–33 недели;
- группа «С» — от 81 матери родилось 104 ребенка со сроком гестации 34–36 недель;
- группа «D» — от 56 матерей родилось 57 новорожденных с гестационным возрастом 37–41 неделя.

Основные клинические характеристики новорожденных представлены в табл. 1.

Новорожденные групп «А» и «В», по сравнению с детьми групп «С» и «D», имели достоверно меньшие гестационный возраст, массу тела при рождении ($p < 0,01$). Оценка по шкале Апгар была достоверно ниже у новорожденных групп «А», по сравнению с детьми групп «С» и «D» ($p < 0,01$). В группе «D» отмечали минимальную частоту оперативных родов, имелись достоверные отличия по сравнению с новорожденными других групп ($p < 0,01$). У большинства новорожденных были светлые околоплодные воды. Меконияльные околоплодные воды достоверно чаще встречались у новорожденных групп «D» ($p < 0,01$). В проведении ИВЛ достоверно чаще нуж-

hypotriglyceridemia, hypocholesterolemia) resistant to the therapy indicates the severity and the long duration of prenatal hypoxia, and are indications for early high frequency oscillatory (HFOV) mechanical ventilation (MV). While selecting the MV mode, it is necessary to take into account the degree of metabolic decompensation, metabolism of triglycerides and cholesterol in infants [15–17].

There are currently few scientific researches of the state of the lipid metabolism in newborns during the perinatal period. General principles of their changes in newborns depending on gestational age were not formulated.

The purpose of the study. To study parameters of the lipid metabolism in newborn infants to identify general patterns depending on the gestational age.

Materials and Methods

The course of pregnancy and its outcome was analyzed in 286 women who gave birth to 323 infants; 89 of them were born in multiple pregnancies. The infants were divided into 4 groups depending on the gestational age:

- Group A: 62 newborns with a gestational age of 25–30 weeks born to 54 mothers;
- Group B: 99 infants with a gestational age of 31–33 weeks born to 87 mothers;
- Group C: 104 newborns with a gestational age of 34–36 weeks born to 81 mothers;
- Group D: 57 newborns with a gestational age of 37–41 weeks born to 56 mothers;

The main clinical characteristics of the newborns are presented in table 1.

Newborns of groups A and B had a significantly lower gestational age and birth weight as compared to infants of groups C and D ($P < 0.01$). The Apgar score was significantly lower in infants of group A as compared to infants of groups C and D ($P < 0.01$). In group D, the minimum incidence of operational delivery was registered; there were no reliable differences as compared with infants of other groups ($P < 0.01$). In most newborns, amniotic fluid was clear. Meconium amniotic fluid was more common in newborns of Group D ($P < 0.01$). Newborns in Group A required the MV more often as compared with children of groups B and C ($P < 0.01$). About 10% of infants in each group required HFOV; no significant inter-group differences were observed ($P > 0.01$). There were also no significant differences in the duration of the MV and HFOV ($P > 0.01$).

Inclusion criteria: adverse pregnancy, expected poor state of an infant at birth.

Exclusion criteria: congenital malformations in the newborn.

Perinatal risk factors for the newborn: preterm, accelerated delivery or oxytocia, abnormalities of labor activities, operational delivery; abnormalities of placentation and its complications; pre-eclampsia and eclampsia; oligohydramnios, polyhydramnios, amniotic fluid with meconium or stained with blood; multiple pregnancy, including those occurred through in vitro fertilization [18].

All newborns received professional primary or urgent care in accordance with the procedure for rendering medical care in neonatology [18]. All pregnant women received professional care in accordance with the procedure for rendering medical care in obstetrics and gynecology [19].

Таблица 1. Основные клинические характеристики новорожденных ($M \pm \sigma$, Me , $LQ-UQ$).Table 1. The main clinical characteristics of newborns ($M \pm \sigma$; I).

Parameters	Values of parameters in groups			
	Group A, $n=62/54$ mothers	Group B, $n=99/87$ mothers	Group C, $n=104/81$ mothers	Group D, $n=57/56$ mothers
Gestational age, weeks	28.6 $\pm$ 1.4 [#]	32 $\pm$ 0.8 [#]	34.9 $\pm$ 0.8	38.8 $\pm$ 1.0
Body weight, grams	1313.4 $\pm$ 342 [#]	1851.2 $\pm$ 391 [#]	2319.2 $\pm$ 494.8	3372.8 $\pm$ 619.6
Apgar score at the 1st minute	3 [#]	4	5	5
Apgar score at the 5th minute	6	6	7	7
Characteristics of amniotic fluid: Light-coloured	47 (75.8%)	80 (80.8%)	95 (91.3%)	32 (56.2%)
Stained with blood	10 (11.3%)	13 (13.1%)	9 (8.7%)	1 (1.8%)
Meconium	8 (12.9%)	6 (6.1%)	—	24 (42%) [#]
Operative delivery	37 (68.5%)	64 (73.6%)	74 (91.4%)	27 (48.2%) [#]
Natural childbirth	17 (31.5%)	21 (26.4%)	10 (8.6%)	30 (51.8%) [#]
Mechanical ventilation	60 (96.8%) [#]	79 (79.8%)	61 (58.7%)	50 (87.7%)
Duration of the MV, h	113 [40; 168]	90 [47; 168]	108 [50; 192]	91 [57; 136]
HFOV	7 (11.2%)	14 (14.2%)	10 (9.6%)	4 (7%)
Duration HFOV, h	33 [14; 36]	30 [50; 192]	23 [10.5; 46]	32 [21; 64]

Note. [#] — $P < 0.01$ — significance of differences as compared with infants of other groups.

Примечание. Для табл. 1, 2: Parameters — параметры; Values of ... in groups — значения в группах; mothers — матери; Gestational age, weeks — срок гестации, недель; Body weight, grams — масса тела, грамм; Apgar score at the 1st minute — шкала Апгар на 1-й/5-й мин., балл; Characteristics of amniotic fluid — характер ОВ; Light-coloured — светлые; Stained with blood — окрашены кровью; Meconium — мекониальные; Operative delivery — оперативные роды; Natural childbirth — естественные роды; Mechanical ventilation — ИВЛ; Duration of the MV, h — длительность ИВЛ, ч; HFOV — ВЧО ИВЛ; Duration HFOV, h — длительность ВЧО ИВЛ, ч. [#] — $p < 0,01$ — достоверность отличий по сравнению с новорожденными других групп.

дались новорожденные группы «А», по сравнению с детьми групп «В» и «С» ($p < 0,01$). В проведении ВЧО ИВЛ нуждалось около 10% новорожденных каждой группы, достоверных межгрупповых отличий не выявили ($p > 0,01$). Также не выявили достоверных отличий в длительности ИВЛ и ВЧО ИВЛ ($p > 0,01$).

Критерии включения в исследование: неблагоприятное течение беременности, прогнозируемое тяжелое состояние ребенка при рождении.

Критерий исключения: врожденные пороки развития у новорожденного.

Факторы перинатального риска для новорожденного: преждевременные, стремительные или быстрые роды, аномалии родовой деятельности, оперативное родоразрешение; аномалии плацентации и ее осложнения; преэклампсия и эклампсия; олигогидрамнион, полигидрамнион, мекониальные или окрашенные кровью околоплодные воды; многоплодная беременность, в том числе полученная с помощью экстракорпорального оплодотворения [18].

При рождении новорожденным была оказана первичная или реанимационная помощь, в соответствии с порядком оказания медицинской помощи по профилю «неонатология» [18]. Всем беременным оказана квалифицированная медицинская помощь, в соответствии с порядком оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» [19].

В работе применяли следующие методы исследования:

1. Анализ анамнестических данных течения беременности, на основании которых выставляли высокий риск развития интранатальной гипоксии и рождения ребенка в тяжелом состоянии;

2. Клиническая оценка состояния ребенка при рождении, включающая оценку по шкале Апгар (ОА) на 1-й и 5-й минутах после рождения;

3. Через 15–20 минут после оказания реанимационной помощи новорожденных переводили в отделение реанимации. Для проведения инфузионной терапии и лабораторных исследований, в асептических условиях

The following methods were used in the study:

1. Analysis of the pregnancy history, on the basis of which a high risk of intranatal hypoxia and delivery of a child in a poor condition is diagnosed;

2. Clinical assessment of the baby's birth status, including Apgar scoring (AS) at the 1st and 5th minute after the birth;

3. Newborns were transferred to the intensive care unit 15–20 minutes after the resuscitation care. Catheterization of v. umbilicalis using a thermoplastic catheter was performed under aseptic conditions for the infusion therapy and lab tests. 2 ml of blood was sampled for a complete blood chemistry test including tests for the concentration of cholesterol and triglycerides;

4. The tests for triglyceride levels in the central venous blood of newborns during the first hours of life and on Day 5 were performed using the 400 Sapphir unit, version 1.8 (Tokyo Boeki LTD, Japan). The enzymatic photometric test with glycerol-3-phosphate oxidase and a reagent kit Triglycerides DiaS were used;

5. The tests for triglyceride levels in the central venous blood of newborns during the first hours of life and on Day 5 were performed using the 400 Sapphir unit, version 1.8 (Tokyo Boeki LTD, Japan). The enzymatic photometric test CHOD-PAP and a reagent kit Cholesterol DiaS were used.

6. The tests for low-density lipoproteins (LDL) levels in the central venous blood of 47 newborns during the first hours of life and on Day 5 were performed using the Sapphir 400 unit, version 1.8 (Tokyo Boeki LTD, Japan). The enzymatic photometric test CHOD-PAP and a reagent kit BioSystems S.A. were used;

7. The tests for high-density lipoproteins (HDL) levels in the central venous blood of 47 newborns during the first hours of life and on Day 5 were performed using the Sapphir 400 unit, version 1.8 (Tokyo Boeki LTD, Japan). The enzymatic photometric test CHOD-PAP and a reagent kit HDL-C Immuno FS*DiaS were used;

8. Statistical data processing was carried out using the Statistica 6 software (USA). The differences were con-

Таблица 2. Динамика показателей липидного обмена у новорожденных ($M \pm \sigma$).
Table 2. The dynamics of lipid metabolism parameters in newborn infants ($M \pm \sigma$).

Parameters	Values of parameters in groups			
	Group A, n=62	Group B, n=99	Group C, n=104	Group D, n=57
TG, Day 1, mmol/l	0.3±0.2	0.31±0.2	0.4±0.2 [#]	0.7±0.4 [#]
TG, Day 5, mmol/l	0.8±0.2 ^{***}	0.9±0.2 [*]	1.2±0.5 [*]	1.5±0.7 [*]
Cholesterol, Day 1, mmol/l	1.6±0.5	1.7±0.7	1.6±0.6	1.4±0.5
Cholesterol, Day 5, mmol/l	2.6±0.8 ^{***}	3.1±1 [*]	3.2±1.0 [*]	3.6±1.0 [*]
HDL, Day 1, mmol/l	0.7±0.2	0.7±0.3	0.7±0.3	0.6±0.3
HDL, Day 5, mmol/l	1±0.02	1.0±0.3 [*]	1±0.3 [*]	1.0±0.4 [*]
LDL, Day 1, mmol/l	1.0±0.01	1.0±0.6	0.8±0.4	0.8±0.4
LDL, Day 5, mmol/l	1.5±0.7	2.0±0.8 [*]	2.2±0.6 [*]	2.0±0.6 [*]

Note. * — $P < 0.01$ — significance of differences as compared with the 1st day of life; # — $P < 0.01$ — significance of differences as compared with newborns in groups A and B; ** — $P < 0.01$ — significance of differences as compared with infants of other groups.

Примечание. Для табл. 2, рис. 2: TG — ТГ; Day — сутки; Cholesterol — ХС. * — $p < 0,01$ — достоверность отличий по сравнению с 1-ми сутками жизни; # — $p < 0,01$ — достоверность отличий по сравнению с новорожденными групп А и В; ** — $p < 0,01$ — достоверность отличий по сравнению с новорожденными других групп.

выполняли катетеризацию v. Umbilicalis термопластичным катетером. Для полного биохимического исследования, включающего определение концентрации холестерина и триглицеридов, осуществляли забор крови в объеме 2 мл;

4. Определение концентрации триглицеридов в центральной венозной крови новорожденных в первые часы постнатальной жизни и на 5-е сутки жизни проводили на аппарате SAPPHIR 400, версия 1.8 (Tokyo Boeki LTD, Japan). Использовали ферментативный фотометрический тест с глицерол-3-фосфатоксидазой, набор реагентов Triglycerides DiaS;

5. Определение концентрации холестерина в центральной венозной крови новорожденных в первые часы постнатальной жизни и на 5-е сутки жизни проводили на аппарате SAPPHIR 400, версия 1.8 (Tokyo Boeki LTD, Japan). Использовали ферментативный фотометрический тест «CHOD-PAP», набор реагентов Cholesterol DiaS;

6. Определение концентрации липопротеидов низкой плотности (ЛПНП, LDL) в центральной венозной крови 47 новорожденных в первые часы постнатальной жизни и на 5-е сутки жизни проводили на аппарате SAPPHIR 400, версия 1.8 (Tokyo Boeki LTD, Japan). Использовали ферментативный фотометрический тест «CHOD-PAP», набор реагентов BioSystems S.A.;

7. Определение концентрации липопротеидов высокой плотности (ЛПВП, HDL) в центральной венозной крови 47 новорожденных в первые часы постнатальной жизни и на 5-е сутки жизни проводили на аппарате SAPPHIR 400, версия 1.8 (Tokyo Boeki LTD, Japan). Использовали ферментативный фотометрический тест «CHOD-PAP», набор реагентов HDL-C Immuno FS*DiaS;

8. Статистическую обработку данных провели с помощью программы Statistica 6 (USA). Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Данные лабораторных исследований у новорожденных представлены в таблице 2. При рождении у новорожденных всех групп отмечали гипотриглицеридемию, достоверно низкое содержание ТГ в крови у детей групп «А» и «В», по сравнению с пациентами групп «С» и «D» ($p < 0,01$).

сидеро значим, когда уровень статистической значимости был $P < 0.01$.

Results and Discussion

Lab test findings of newborns are presented in Table 2. At birth, newborns of all groups presented hypotriglyceridemia, significantly low TG concentration in the blood of infants of groups A and B compared with patients in groups C and D ($P < 0.01$).

A detailed analysis of the TG blood concentration was carried out (Fig. 1). The most important reference values for the TG blood concentration were determined:

- less than 0.2 mmol/l; 0.21–0.5 mmol/l;
- 0.51–0.99 mmol/l;
- more than 1.0 mmol/l.

A critically low TG level (less than 0.2 mmol/l) was typical for 50% of newborns in group A; in 30.6 % of infants in this group, the TG concentration was within 0.21–0.5 mmol/l; in 16.1% of newborns, the tested parameter was determined within 0.51–0.99 mmol/l and in 3.2% of infants the TG blood concentration was more than 1.0 mmol/l.

In group B, the TG concentration of less than 0.2 mmol/l was typical for 42.4% of infants; in 43.4% children, the TG concentration was within the range of 0.21–0.5 mmol/l; in 13.1% of patients it was within 0.51–0.99 mmol/l, and in 1% of cases the TG level was more than 1.0 mmol/l.

In group C, the TG level of less than 0.2 mmol/l was registered in 25% of newborns; in 51% of cases, the value of the analyzed parameter was 0.21–0.5 mmol/l; in 21.2% of infants, triglyceridemia was within the range of 0.51–0.99 mmol/l and in 2.8% it was more than 1.0 mmol/l.

In the group D, critically low TG levels were found only in 3.5% of newborns; in 43.9% of infants, the TG level was within 0.21–0.5 mmol/l; for 35.1% of infants, the TG concentration of 0.51–0.99 mmol/l was typical; and in 17.5% of infants the TG level was more than 1.0 mmol/l. Hypotriglyceridemia below 0.2 mmol/l was typical for 31.3% of the newborns; a TG

Провели подробный анализ содержания ТГ в крови у детей (рис. 1). Выделили наиболее значимые референсные значения содержания ТГ в крови:

- менее 0,2 ммоль/л; 0,21–0,5 ммоль/л;
- 0,51–0,99 ммоль/л;
- более 1,0 ммоль/л.

Критически низкое содержание ТГ (менее 0,2 ммоль/л) характерно для 50% новорожденных группы «А», у 30,6% детей этой группы концентрация ТГ находилась в пределах 0,21–0,5 ммоль/л, у 16,1% новорожденных исследуемый показатель определяли в пределах 0,51–0,99 ммоль/л и у 3,2% детей содержание ТГ в крови составляло более 1,0 ммоль/л.

В группе «В» концентрация ТГ менее 0,2 ммоль/л была характерна для 42,4% детей, у 43,4% содержание ТГ находилось в пределах 0,21–0,5 ммоль/л, у 13,1% пациентов – 0,51–0,99 ммоль/л и в 1% случаев содержание ТГ было более 1,0 ммоль/л.

В группе «С» содержание ТГ менее 0,2 ммоль/л зарегистрировали у 25% новорожденных, в 51% случаев величина исследуемого показателя составляла 0,21–0,5 ммоль/л, у 21,2% – триглицеридемия находилась в пределах 0,51–0,99 ммоль/л и у 2,8% – более 1,0 ммоль/л.

В группе «D» критически низкое содержание ТГ отметили только у 3,5% новорожденных, у 43,9% детей содержание ТГ находилось в пределах 0,21–0,5 ммоль/л, для 35,1% детей было характерно содержание ТГ от 0,51 до 0,99 ммоль/л и у 17,5% содержание ТГ было более 1,0 ммоль/л. Выявили также, что для 31,3% новорожденных характерна гипотриглицеридемия менее 0,2 ммоль/л, содержание ТГ в крови в пределах 0,21–0,5 ммоль/л выявили у 43,3% детей, т.е. у 76,6% была снижена перинатальная продукция ТГ.

Проведенный корреляционный анализ показал наличие прямой связи средней силы между сроком гестации, массой тела и содержанием ТГ в крови новорожденных при рождении ($r=0,35$; $p=0,0000$).

Исследование показало, что перинатальная продукция ТГ зависит от гестационного возраста ребенка, чем он меньше, тем ниже содержание ТГ в крови у новорожденных при рождении. При сроках гестации 25–33 недели перинатальная продукция ТГ низкая у большинства новорожденных. С увеличением срока гестации увеличивается перинатальная продукция исследуемого показателя липидного обмена. Содержание ТГ в крови быстро возрастает при достижении гестационного возраста 37 недель (рис. 2).

Течение раннего неонатального периода характеризовалось увеличением продукции ТГ (табл. 2). К 5-м суткам постнатального возраста у новорожденных всех групп произошел достоверный рост ТГ, по сравнению с 1-ми сутками жизни ($p<0,01$). Скорость прироста была различной. Наибольший прирост был характерен для новорожденных групп «В» и «С», у них содержание ТГ в крови увеличилось в 2,9 раза, у детей группы «А» кон-

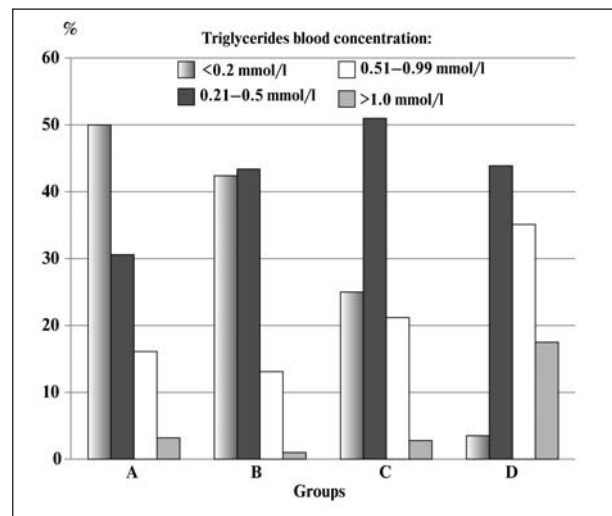


Рис. 1. Распределение новорожденных в группах, в зависимости от содержания триглицеридов в крови.

Fig. 1. Distribution of newborns in groups depending on the triglycerides blood concentration.

Примечание. Для рис. 1, 3: Groups – группы. Triglycerides blood concentration – концентрация триглицеридов в крови.

level within the range of 0.21–0.5 mmol/l was found in 43.3% of infants, i.e. the perinatal production of TG was decreased in 76.6% of infants.

The correlation analysis showed a direct moderate correlation between the gestational age, birth weight and the TG blood level in newborn infants at birth ($r=0.35$; $P=0.0000$).

The study demonstrated that the perinatal TG production depends on the infant's gestational age: the smaller it is, the lower TG blood level is in infants at birth. At the gestational age of 25–33 weeks, the perinatal TG production is low in most newborns. The perinatal production of the lipid metabolism parameter increases with the increase of the gestational age. The TG blood level increases rapidly at the gestational age of 37 weeks (Fig. 2).

The early neonatal period was characterized by an increase in the production of TG. (Table 2). By the 5th day after birth, there was a significant increase of the TG level in infants of all groups as compared with the 1st day of life ($P<0.01$). The rate of increase varied. The maximum gain was typical for newborns in groups B and C; the TG blood concentration increased by 2.9-fold; in infants of group A, the TG concentration increased by 2.6-fold; the smallest increase was observed in patients of group D (by 2.1-fold). A significantly low TG level was typical for infants of group A as compared with children of other groups ($P<0.01$). The postnatal TG production in the blood of newborn babies has no dependence on the gestational age at the gestational age from 31 weeks or more.

Hypercholesterolemia, low LDL and HDL levels were found in newborns of all groups at birth; no significant difference in the tested parameters between groups was found ($P>0.01$). By the 5th day after birth,

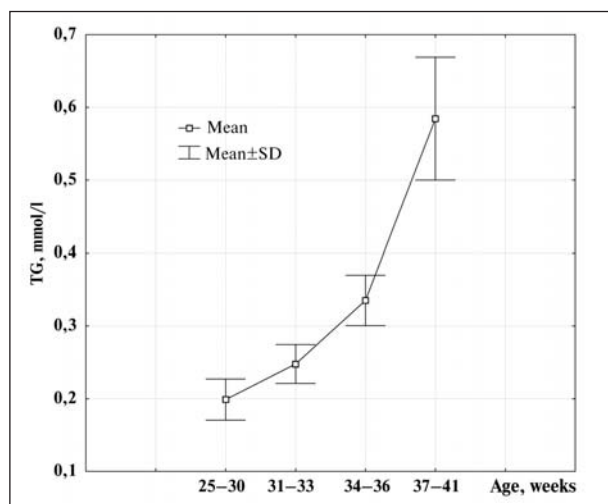


Рис. 2. Средние значения концентрации триглицеридов в зависимости от гестационного возраста.

Fig. 2. Average values of triglycerides depending on the gestational age.

Примечание. Age, w – недели.

центрация ТГ увеличилась в 2,6 раза, наименьший прирост был у пациентов группы «D» – 2,1 раза. Для новорожденных группы «A» было характерно достоверно низкое содержание ТГ по сравнению с детьми других групп ($p < 0,01$). Постнатальная продукция ТГ в крови новорожденных не имеет зависимости от гестационного возраста при сроке гестации от 31 недели и более.

При рождении у новорожденных всех групп определяли гипохолеsterинемию, низкое содержание ЛПНП и ЛПВП, достоверных отличий исследуемых показателей между группами не выявили (табл. 2) ($p > 0,01$). К 5-м суткам постнатального возраста у новорожденных всех групп произошел достоверный рост ХС, по сравнению с 1-ми сутками жизни ($p < 0,01$). В конце раннего неонатального периода произошел достоверный рост ЛПНП и ЛПВП у новорожденных групп «B», «C» и «D» ($p < 0,01$). Для новорожденных группы «A» характерна сниженная продукция ХС, ЛПНП и ЛПВП, выявлены достоверные отличия исследуемых показателей, по сравнению с детьми других групп ($p < 0,01$).

При проведении корреляционного анализа у новорожденных группы «A» выявлены корреляционные связи и получено уравнение регрессии:

- отрицательная корреляционная связь средней силы между длительностью ИВЛ и содержанием ТГ в плазме крови при рождении: $r = -0,3032$; $p = 0,0185$; $y = 0,402943861 - 0,00079223749 \cdot x$

- прямая корреляционная связь средней силы между дефицитом буферных оснований и уровнем ТГ при рождении: $r = 0,2806$; $p = 0,0419$; $y = -7,27276485 + 4,70646887 \cdot x$

- прямая корреляционная связь средней силы между уровнем ХС и парциальным напряже-

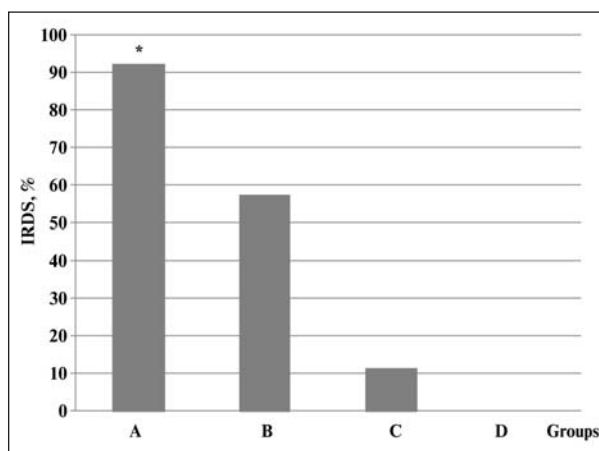


Рис. 3. Заболеваемость РДСН среди новорожденных.

Fig. 3. The incidence of IRDS among newborns.

Note. * – $P < 0,01$ – significance of differences as compared with infants of other groups.

Примечание. IRDS – РДСН. * – $p < 0,01$ – достоверность отличий по сравнению с новорожденными других групп.

there was a significant increase of the cholesterol level in infants of all groups as compared to the 1st day of life ($P < 0,01$). At the end of the early neonatal period, there was a significant increase of LDL and HDL levels in newborns of groups B, C and D ($P < 0,01$). For infants in group A, a reduced production of LDL and HDL and cholesterol are typical; significant differences between the studied parameters were found as compared with children of other groups ($P < 0,01$).

The correlation analysis identified correlations in newborn infants of group A and a regression equation was obtained:

- a moderate negative correlation between the duration of the MV and the TG concentration in plasma at birth: $r = -0,3032$; $P = 0,0185$; $y = 0,402943861 - 0,00079223749 \cdot x$

- a moderate direct correlation between the buffer base deficiency and TG levels at birth: $r = 0,2806$; $P = 0,0419$; $y = -7,27276485 + 4,70646887 \cdot x$

- a moderate direct correlation between the level of cholesterol and partial oxygen tension in blood at birth: $r = 0,4669$; $P = 0,0004$; $y = 13,8847761 + 32,8288816 \cdot x$;

- a moderate direct correlation between the cholesterol levels and pH at birth: $r = 0,3105$; $P = 0,0251$; $y = 7,22037229 + 0,0573416261 \cdot x$.

The incidence of IDRS is presented in Fig. 3. The infant respiratory distress syndrome (IDRS) developed in the overwhelming majority of infants of group A; other diseases comprised only 8.1%. In group B, the IDRS was also most common (57/8%); but children of these group also presented cerebral ischemia of various degrees of severity, congenital pneumonia, and other diseases. The IDRS loses its topicality with the increase of the gestational age; in group C, it comprised only 11.5%; the incidence of other diseases increased.

нием кислорода в крови при рождении: $r=0,4669$; $p=0,0004$; $y=13,8847761+32,8288816 \cdot x$;

- прямая корреляционная связь средней силы между уровнем ХС и рН крови при рождении: $r=0,3105$; $p=0,0251$; $y=7,22037229+0,0573416261 \cdot x$.

Заболеваемость новорожденных РДСН представлена на рис. 3. У подавляющего большинства новорожденных группы «А» развился респираторный дистресс-синдром (РДСН), другие заболевания составили лишь 8,1%. В группе «В» наиболее распространенным также был РДСН (57,8%), но у детей этой группы встречались и церебральная ишемия различной степени тяжести, врожденная пневмония, другие заболевания. С увеличением гестационного возраста РДСН теряет свою актуальность, в группе «С» на его долю приходилось только 11,5%, увеличивалась частота заболеваемости другими нозологическими формами. В группе «D» заболеваемость РДСН отсутствовала, в структуре заболеваемости преобладали: церебральная ишемия, неонатальный аспирационный синдром, другие болезни неонатального периода. Таким образом, заболеваемость РДСН достоверно снижалась от группы «А» к группе «D» ($p<0,01$). Если в группе «А» заболеваемость РДСН в группе «А» составила 91,9%, то у детей группы «D» данная нозологическая форма не встречалась (рис. 3).

Пренатальный морфогенез ребенка происходит по определенным закономерностям, согласно которым развивается перинатальный обмен веществ. Физиологически трансплацентарный переход липидов от матери к плоду ограничен, в связи с чем, в норме плод с ранних сроков гестации начинает синтезировать собственные липиды. Для чего плод использует ацетаты, которые свободно проникают от матери через плацентарный барьер. Антенатально синтез холестерина или диффузия свободного холестерина не происходит через плаценту. Относительные концентрации свободного холестерина и липопротеидов матери и плода не подтверждают наличие градиента концентрации, благоприятствующего диффузии свободного холестерина через плаценту. Этерификация свободного холестерина значительно снижена у матери и плода [2, 3, 20, 21]. Интенсивный синтез липидов происходит в конце нормально протекающей беременности, в связи с чем, недоношенные новорожденные испытывают дефицит липидов в раннем неонатальном периоде, что обусловлено высокими потребностями и низкими возможностями их синтеза [4, 22].

Малый гестационный возраст связан с низким содержанием в крови новорожденных ЛПНП и ЛПВН. На состояние липидного обмена плода и новорожденного влияют соматические заболевания матери. В остаточной пуповинной крови новорожденных, рожденных от матерей с гипертензией, наблюдаются повышенные уровни ТГ, обусловлен-

In Group D, the incidence of IDRS was absent; in the morbidity structure, the following diseases prevailed: cerebral ischemia, neonatal aspiration syndrome, other disorders of the neonatal period. Therefore, the incidence of IDRS significantly decreased from Group A to Group D ($P<0.01$). Whereas in Group A the morbidity of IDRS was 91.9%, in Group D this disease was not observed (Fig. 3).

Prenatal infant morphogenesis occurs in accordance with certain patterns according to which the perinatal metabolism develops. Physiologically, the transplacental passage of lipids from mother to fetus is limited; therefore, normally, the fetus begins to synthesize its own lipids starting from the early gestation period. For this purpose, the fetus uses acetates, which freely penetrate from the mother through the placental barrier. In the antenatal period, transplacental transport of free cholesterol does not occur through the placenta. The relative concentrations of free cholesterol and lipoproteins in mother and fetus do not confirm the existence of a concentration gradient, which is favorable for the diffusion of free cholesterol through the placenta. Etherification of free cholesterol is significantly decreased in the mother and fetus [2, 3, 20, 21]. The intensive lipid synthesis occurs at the end of a normal pregnancy, therefore, premature newborns lack the lipids in the early neonatal period due to high demands and low potential for their synthesis [4, 22].

A small gestational age is associated with low LDL and HDL blood concentrations. The features of the lipid metabolism of the fetus and the newborn are affected by maternal somatic diseases. In residual umbilical cord blood of newborns born to mothers with hypertension, elevated TG levels resulting from adverse perinatal conditions were observed. Elevated levels of LDL and TG in the residual umbilical cord blood are typical for children born by mothers with pre-eclampsia [23, 24].

Hypotriglyceridemia and hypocholesterolemia are typical for small premature infants with severe perinatal hypoxia. In addition, decompensated lactate acidosis in combination with a low TG and cholesterol production are pathognomonic for the development of shock in newborns. A correlation between the concentration of studied parameters of the lipid metabolism and the duration of MV was found [15]. Placental detachment and discoordination of the labor activity resulting in an emergency surgical delivery affect perinatal production of TG and cholesterol. Other factors affecting the TG blood concentration in newborns are the gestational age and the birth weight. The lowest levels of TG are typical to newborns with the gestational age of 22–29 weeks and extremely low birth weight [17].

It is known that neutral lipids and cholesterol account for 10–20% of the total number of pulmonary surfactant lipids; phospholipids comprise 80–90% of the total amount of the lipids [25–28], and cholesterol and TG are important components of the surfactant. Cholesterol plays an important role in the lateral dif-

ные неблагоприятным перинатальным состоянием. Повышенные уровни ЛПНП и ТГ в остаточной пуповинной крови характерны для детей, рожденных от матерей с преэклампсией [23, 24].

Гипотриглицеридемия и гипохолестеринемия характерны для глубоконедоношенных новорожденных, перенесших тяжелую перинатальную гипоксию. Кроме того, декомпенсированный лактат-ацидоз в сочетании с низкой продукцией ТГ и ХС являются патогномоничными для развития шока у новорожденных. Выявлена взаимосвязь между содержанием исследуемых показателей липидного обмена и длительностью ИВЛ [15]. Отслойка плаценты, дискоординация родовой деятельности, повлекшие экстренное оперативное родоразрешение, влияют на перинатальную продукцию ТГ и ХС. Другим фактором, влияющим на концентрацию ТГ крови у новорожденных, являются гестационный возраст и масса тела при рождении. Наиболее низкие показатели ТГ характерны для новорожденных с гестационным возрастом 22–29 недель и экстремально низкой массой тела [17].

Известно, что нейтральные липиды и холестерин составляют 10–20% от общего количества липидов легочного сурфактанта, фосфолипиды – 80–90% [25–28], а ХС и ТГ являются важными компонентами сурфактанта. Холестерин играет важную роль в латеральной диффузии липидов и белков и в фазовой организации легочного сурфактанта [29, 30]. Так называемая «зрелость легких», связана с функцией легочного сурфактанта в ранний неонатальный период, что особенно актуально для недоношенных детей, ведь у них структура и функции сурфактанта еще не созрели. Респираторный дистресс-синдром новорожденного является наиболее частым заболеванием у недоношенных новорожденных, ассоциирован с первичным (качественным и количественным) дефицитом сурфактанта [17, 31, 32].

Заключение

Состояние липидного обмена у новорожденных в перинатальном периоде зависит от гестационного возраста и массы тела при рождении. Низкая продукция ТГ характерна для глубоконедоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении, что обусловлено физиологической незрелостью органов и систем. Особенности пренатального морфогенеза таковы, что полноценный липидный обмен возможен только в доношенном сроку гестации. Патологическое течение беременности нарушает нормаль-

ную продукцию триглицеридов, холестерина, липидов низкой и высокой плотности. Наблюдаемые изменения исследуемых показателей характерны для глубоконедоношенных детей с гестационным возрастом 25–31 неделя. Это возраст ассоциирован с высокой частотой развития респираторного дистресс-синдрома. На продукцию ТГ при рождении влияют дефицит буферных оснований, на содержание холестерина – величина рН и парциальное напряжение кислорода в крови при рождении. При увеличении срока гестации продукция показателей липидного обмена увеличивается. Имеются индивидуальные особенности новорожденных, у которых при доношенном сроке беременности возможны перинатальные нарушения липидного обмена.

Conclusion

The state of the lipid metabolism in the newborns in the perinatal period depends on the gestational age and the birth weight. Low TG production is typical for small premature infants with a low and extremely low birth weight due to physiological immaturity of organs and systems. The peculiarities of the prenatal morphogenesis make an adequate lipid metabolism possible by the full-term gestational age only. An abnormal course of pregnancy impairs normal triglyceride, cholesterol, LDL and HDL production. The maximum changes of the tested parameters are typical for small immature infants with a gestational age of 25–31 weeks. This age is associated with a high incidence of the respiratory distress syndrome. Deficiency of buffer bases affects the TG production at birth; the pH value and blood oxygen tension at birth affect the cholesterol level. The production of lipid metabolism parameters increases with the increase of the gestational age. There are certain individual characteristics in newborns who may have perinatal disorders of the lipid metabolism at the full-term gestational age.

ную продукцию триглицеридов, холестерина, липидов низкой и высокой плотности. Наблюдаемые изменения исследуемых показателей характерны для глубоконедоношенных детей с гестационным возрастом 25–31 неделя. Это возраст ассоциирован с высокой частотой развития респираторного дистресс-синдрома. На продукцию ТГ при рождении влияют дефицит буферных оснований, на содержание холестерина – величина рН и парциальное напряжение кислорода в крови при рождении. При увеличении срока гестации продукция показателей липидного обмена увеличивается. Имеются индивидуальные особенности новорожденных, у которых при доношенном сроке беременности возможны перинатальные нарушения липидного обмена.

Литература

1. Herrera E., Amusquivar E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2000; 16 (3): 202-210. DOI: 10.1002/1520-7560(200005/06)16:3%3C202::AID-DMRR116%3E3.3.CO;2-R. PMID: 10867720
2. Magnusson-Olsson A.L., Lager S., Jacobsson B., Jansson T., Powell T.L. Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in

References

1. Herrera E., Amusquivar E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2000; 16 (3): 202-210. DOI: 10.1002/1520-7560(200005/06)16:3%3C202::AID-DMRR116%3E3.3.CO;2-R. PMID: 10867720
2. Magnusson-Olsson A.L., Lager S., Jacobsson B., Jansson T., Powell T.L. Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in

- cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007; 293 (1): 24-30. DOI: 10.1152/ajpendo.00571.2006. PMID: 17299085
3. Herrera E., Amusquivar E., López-Soldado I., Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm. Res.* 2006; 65 (Suppl 3): 59-64. DOI: 10.1159/000091507. PMID: 16612115
 4. Woollett L.A. Review: transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. *Placenta.* 2011; 32 (Suppl 2): S218-S221. DOI: 10.1016/j.placenta.2011.01.011. PMID: 21300403
 5. Sfefuji J., Panzenboeck U., Becker T., Hirschmugl B., Schweinzer C., Lang I., Marsche G., Sadjak A., Lang U., Desoye G., Wadsack C. Human endothelial cells of the placental barrier efficiently deliver cholesterol to the fetal circulation via ABCA1 and ABCG1. *Circ. Res.* 2009; 104 (5): 600-608. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.185066. PMID: 19168441
 6. Sales W.B., Silleno Junior J.D., Kroll C., Mastroeni S.S., Silva J.C., Mastroeni M.F. Influence of altered maternal lipid profile on the lipid profile of the newborn. *Arch. Endocrinol. Metab.* 2015; 59 (2): 123-128. DOI: 10.1590/2359-3997000000024. PMID: 25993674
 7. Fielding B.A., Frayn K.N. Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br. J. Nutr.* 1998; 80 (6): 495-502. DOI: 10.1017/S0007114598001585. PMID: 10211047
 8. Waterman I.J., Emmison N., Dutta-Roy A.K. Characterisation of triacylglycerol hydrolase activities in human placenta. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; 1394 (2-3): 169-176. PMID: 9795201
 9. Waterman I.J., Emmison N., Sattar N., Dutta-Roy A.K. Further characterization of a novel triacylglycerol hydrolase activity (pH 6.0 optimum) from microvillous membranes from human term placenta. *Placenta.* 2000; 21 (8): 813-823. DOI: 10.1053/plac.2000.0572. PMID: 11095931
 10. Campbell F.M., Bush P.G., Veerkamp J.H., Dutta-Roy A.K. Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta. *Placenta.* 1998; 19 (5-6): 409-415. DOI: 10.1016/S0143-4004(98)90081-9. PMID: 9699962
 11. Madsen E.M., Lindegaard M.L., Andersen C.B., Damm P., Nielsen L.B. Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (53): 55271-55276. DOI: 10.1074/jbc.M411404200. PMID: 15504742
 12. Тюркина Е.П., Котлова Е.В., Власов А.П., Ледяйкина Л.В., Гордеева Ю.В. Изменение липидного метаболизма плаценты у беременных с гестозом. *Мед. науки. Клиническая медицина.* 2011; 4 (20): 89-96.
 13. Тюркина Е.П., Порошина О.В., Котлова Е.В., Гордеева Ю.В. Модификация липидного обмена у беременных с гестозом. *Вестн. РГМУ. Спец. выпуск.* 2011; S2: 50-52.
 14. Туркина Т.И., Щербаклова М.Ю. Особенности дислипидемий у детей. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии.* 2011; 7 (1): 65 - 69.
 15. Перепелица С.А. Комплексная оценка кислородного статуса и показателей липидного обмена у новорожденных с перинатальной гипоксией и гиповолемическим шоком. *Общая реаниматология.* 2017; 13 (3): 25-34. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-3-25-34
 16. Перепелица С.А., Алексеева С.В., Лучина А.А. Влияние перинатальных нарушений метаболизма на выбор режима искусственной вентиляции легких у новорожденных. *Анестезиология и реаниматология.* 2016; 61 (4): 275-280. DOI: 10.18821/0201-7563-2016-61-4-275-280
 17. Перепелица С.А., Седнев О.В. Перинатальные нарушения обмена триглицеридов и холестерина у новорожденных. *Общая реаниматология.* 2015; 11 (6): 28-37. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-6-28-37
 18. Володин Н.Н. (ред.). Неонатология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008: 749.
 19. Айламазян Э.К., Кулаков В.И., Радзинский В.Е., Савельева Г.М. (ред.). Акушерство. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009: 1200.
 20. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия. 6-е изд. М.: БИНОМ; 2015: 408.
 21. Neary R.H., Kilby M.D., Kumpatula P., Game F.L., Bhatnagar D., Durrington P.N., O'Brien P.M. Fetal and maternal lipoprotein metabolism in human pregnancy. *Clin. Sci. (Lond.)*. 1995; 88 (3): 311-318. DOI: 10.1042/cs0880311. PMID: 7736700
 22. Favrais G., Tourneux P., Lopez E., Durrmeyer X., Gascoin G., Ramful D., Zana-Taieb E., Baud O. Impact of common treatments given in the perinatal period on the developing brain. *Neonatology.* 2014; 106 (3): 163-172. DOI: 10.1159/000363492. PMID: 25012048
 23. Brizzi P., Tonolo G., Esposito F., Puddu L., Dessole S., Maioli M., Milia S. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007; 293 (1): 24-30. DOI: 10.1152/ajpendo.00571.2006. PMID: 17299085
 3. Herrera E., Amusquivar E., López-Soldado I., Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm. Res.* 2006; 65 (Suppl 3): 59-64. DOI: 10.1159/000091507. PMID: 16612115
 4. Woollett L.A. Review: transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. *Placenta.* 2011; 32 (Suppl 2): S218-S221. DOI: 10.1016/j.placenta.2011.01.011. PMID: 21300403
 5. Sfefuji J., Panzenboeck U., Becker T., Hirschmugl B., Schweinzer C., Lang I., Marsche G., Sadjak A., Lang U., Desoye G., Wadsack C. Human endothelial cells of the placental barrier efficiently deliver cholesterol to the fetal circulation via ABCA1 and ABCG1. *Circ. Res.* 2009; 104 (5): 600-608. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.185066. PMID: 19168441
 6. Sales W.B., Silleno Junior J.D., Kroll C., Mastroeni S.S., Silva J.C., Mastroeni M.F. Influence of altered maternal lipid profile on the lipid profile of the newborn. *Arch. Endocrinol. Metab.* 2015; 59 (2): 123-128. DOI: 10.1590/2359-3997000000024. PMID: 25993674
 7. Fielding B.A., Frayn K.N. Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br. J. Nutr.* 1998; 80 (6): 495-502. DOI: 10.1017/S0007114598001585. PMID: 10211047
 8. Waterman I.J., Emmison N., Dutta-Roy A.K. Characterisation of triacylglycerol hydrolase activities in human placenta. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; 1394 (2-3): 169-176. PMID: 9795201
 9. Waterman I.J., Emmison N., Sattar N., Dutta-Roy A.K. Further characterization of a novel triacylglycerol hydrolase activity (pH 6.0 optimum) from microvillous membranes from human term placenta. *Placenta.* 2000; 21 (8): 813-823. DOI: 10.1053/plac.2000.0572. PMID: 11095931
 10. Campbell F.M., Bush P.G., Veerkamp J.H., Dutta-Roy A.K. Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta. *Placenta.* 1998; 19 (5-6): 409-415. DOI: 10.1016/S0143-4004(98)90081-9. PMID: 9699962
 11. Madsen E.M., Lindegaard M.L., Andersen C.B., Damm P., Nielsen L.B. Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (53): 55271-55276. DOI: 10.1074/jbc.M411404200. PMID: 15504742
 12. Тюркина Е.П., Котлова Е.В., Власов А.П., Ледяйкина Л.В., Гордеева Ю.В. Change in lipid metabolism of the placenta in pregnant women with gestosis. *Meditsinskie Nauki. Klinicheskaya Meditsina.* 2011; 4 (20): 89-96. [In Russ.]
 13. Тюркина Е.П., Порошина О.В., Котлова Е.В., Гордеева Ю.В. Modification of lipid metabolism in pregnant women with gestosis. *Vestnik Rossiyskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta.* 2011; S2: 50-52. [In Russ.]
 14. Turkina T.I., Shcherbakova M.Yu. Features of dyslipidemia in children. *Ratsionalnaya Farmakoterapiya v Kardiologii.* 2011; 7 (1): 65 - 69. [In Russ.]
 15. Perepelitsa S.A. Complex evaluation oxygen status and lipid metabolism indexes in newborns with perinatal hypoxia and hypovolemic shock. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology.* 2017; 13 (3): 25-34. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-3-25-34. [In Russ., In Engl.]
 16. Perepelitsa S.A., Alekseyeva S.V., Luchina A.A. The impact of perinatal metabolic disorders choice mode mechanical ventilation in newborns. *Anesteziologiya i Reanimatologiya.* 2016; 61 (4): 275-280. DOI: 10.18821/0201-7563-2016-61-4-275-280. [In Russ.]
 17. Perepelitsa S.A., Sednev O.V. Perinatal triglyceride and cholesterol metabolic disturbances in newborn infants. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology.* 2015; 11 (6): 28-37. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-6-28-37. [In Russ., In Engl.]
 18. Volodin N.N. (red.). Neonatology. National guide. Moscow: GEOTAR-Media; 2008: 749. [In Russ.]
 19. Ailamazyan E.K., Kulakov V.I., Radzinsky V.E., Savelyeva G.M. (eds.). Obstetrics. National guide. Moscow: GEOTAR-Media; 2009: 1200. [In Russ.]
 20. Marshall V.J. Clinical biochemistry. 6th ed. Moscow: BINOM; 2015: 408. [In Russ.]
 21. Neary R.H., Kilby M.D., Kumpatula P., Game F.L., Bhatnagar D., Durrington P.N., O'Brien P.M. Fetal and maternal lipoprotein metabolism in human pregnancy. *Clin. Sci. (Lond.)*. 1995; 88 (3): 311-318. DOI: 10.1042/cs0880311. PMID: 7736700
 22. Favrais G., Tourneux P., Lopez E., Durrmeyer X., Gascoin G., Ramful D., Zana-Taieb E., Baud O. Impact of common treatments given in the perinatal period on the developing brain. *Neonatology.* 2014; 106 (3): 163-172. DOI: 10.1159/000363492. PMID: 25012048

- 1999; 181 (2): 430-434. DOI: 10.1016/S0002-9378(99)70574-0. PMID: 10454696
24. Rodie V.A., Caslake M.J., Stewart F., Sattar N., Ramsay J.E., Greer I.A., Freeman D.J. Fetal cord plasma lipoprotein status in uncomplicated human pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Atherosclerosis*. 2004; 176 (1): 181-187. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.04.026. PMID: 15306192
 25. Розенберг О.А. Препараты легочного сурфактанта при острых и хронических заболеваниях легких (часть I). *Общая реаниматология*. 2014; 10 (4): 51-73. DOI: 10.15360/1813-9779-2014-4-51-73
 26. Гребенников В.А., Миленин О.Б., Рюмина И.И. Результаты клинических испытаний синтетического сурфактанта "Exosurf Neonatal" в России. *Педиатрия*. 1995; 3: 65-68.
 27. Hildebran J.N., Goerke J., Clements J.A. Surfactant released in excised rat lung is stimulated by air inflation. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 1981; 51 (4): 905-910. PMID: 6895369
 28. Lewis J.F., Veldhuizen R. The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. *Annu. Rev. Physiol.* 2003; 65: 613-642. DOI: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142434. PMID: 12517997
 29. Orgeig S., Daniels C.B. The roles of cholesterol in pulmonary surfactant: insights from comparative and evolutionary studies. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2001; 129 (1): 75-89. DOI: 10.1016/S1095-6433(01)00307-5. PMID: 11369535
 30. Orgeig S., Daniels C.B., Johnston S.D., Sullivan L.C. The pattern of surfactant cholesterol during vertebrate evolution and development: does ontogeny recapitulate phylogeny? *Reprod. Fertil. Dev.* 2003; 15 (1-2): 55-73. DOI: 10.1071/RD02087. PMID: 12729504
 31. Эммануилидис Г.К., Байлен Б.Г. Сердечно-легочный дистресс у новорожденных. М.: Медицина; 1994: 400.
 32. Whitsett J.A., Weaver T.E. Alveolar development and disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2015; 53 (1): 1-7. DOI: 10.1165/rcmb.2015-0128PS. PMID: 25932959
 23. Brizzi P., Tonolo G., Esposito F., Puddu L., Dessole S., Maioli M., Milia S. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999; 181 (2): 430-434. DOI: 10.1016/S0002-9378(99)70574-0. PMID: 10454696
 24. Rodie V.A., Caslake M.J., Stewart F., Sattar N., Ramsay J.E., Greer I.A., Freeman D.J. Fetal cord plasma lipoprotein status in uncomplicated human pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Atherosclerosis*. 2004; 176 (1): 181-187. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.04.026. PMID: 15306192
 25. Rozenberg O.A. Pulmonary surfactants for acute and chronic lung diseases (part I). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2014; 10 (4): 51-73. DOI: 10.15360/1813-9779-2014-4-51-73. [In Russ., In Engl.]
 26. Grebennikov V.A., Milenin O.B., Ryumina I.I. Results of clinical trials of the synthetic surfactant «Exosurf Neonatal» in Russia. *Pediatrics*. 1995; 3: 65-68. [In Russ.]
 27. Hildebran J.N., Goerke J., Clements J.A. Surfactant released in excised rat lung is stimulated by air inflation. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 1981; 51 (4): 905-910. PMID: 6895369
 28. Lewis J.F., Veldhuizen R. The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. *Annu. Rev. Physiol.* 2003; 65: 613-642. DOI: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142434. PMID: 12517997
 29. Orgeig S., Daniels C.B. The roles of cholesterol in pulmonary surfactant: insights from comparative and evolutionary studies. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2001; 129 (1): 75-89. DOI: 10.1016/S1095-6433(01)00307-5. PMID: 11369535
 30. Orgeig S., Daniels C.B., Johnston S.D., Sullivan L.C. The pattern of surfactant cholesterol during vertebrate evolution and development: does ontogeny recapitulate phylogeny? *Reprod. Fertil. Dev.* 2003; 15 (1-2): 55-73. DOI: 10.1071/RD02087. PMID: 12729504
 31. Emmanuilidis G.K., Bailen B.G. Cardiopulmonary distress in newborns. Moscow: Meditsina Publishers; 1994: 400. [In Russ.]
 32. Whitsett J.A., Weaver T.E. Alveolar development and disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2015; 53 (1): 1-7. DOI: 10.1165/rcmb.2015-0128PS. PMID: 25932959

Поступила 26.07.17

Received 26.07.17

ПЛАН МЕРОПРИЯТИЙ – 2018

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» (ФНКЦ РР),
НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского

1–2 июня

XIV Всероссийская конференция с международным участием
«Проблема инфекции при критических состояниях»

12 сентября

IV Национальная конференция «Инструментальная и клиническая диагностика дисфагии»
с логопедической школой

18–19 октября

XX Всероссийская конференция с международным участием
«Жизнеобеспечение при критических состояниях»

Подробнее о мероприятиях можно узнать по телефону +7 (495) 650-25-17, на сайтах:

<http://www.fnkcr.ru>

<http://www.niiorramn.ru>

E-mail: niiorramn@niiorramn.ru

Экстракорпоральная детоксикация при абдоминальном сепсисе у онкологических больных

Н. Д. Ушакова, О. И. Кит, А. А. Маслов, А. П. Меньшенина,

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России,
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

Extracorporeal Detoxification in Abdominal Sepsis in Cancer Patients

Natalia D. Ushakova, Oleg I. Kit, Andrey A. Maslov, Anna P. Men'shenina

Rostov Scientific Research Oncological Institute, Ministry of Health of Russia,
63 14th Line Str., 344037 Rostov-na-Donu, Russia

Цель исследования – оценить детоксикационные эффекты использования колонок с полимиксиновой сорбентом и фильтрационной детоксикации с использованием мембраны из полиметилметакрилата при абдоминальном сепсисе у онкологических больных.

Материал и методы. Обследовали 226 больных онкологическими заболеваниями органов брюшной полости, послеоперационный период у которых осложнился абдоминальным сепсисом. В 50-и случаях регистрировали развитие септического шока. У 173-х больных в структуре органных нарушений диагностировали острое почечное повреждение (ОПП), у 61-го – в сочетании с острым респираторным дистресс синдромом (ОРДС). Тяжесть состояния по шкале АРАСНЕ-II была $26,3 \pm 3,3$ балла, SOFA – $10,2 \pm 2,5$ баллов, qSOFA – $4,3 \pm 1,8$ балла. Микробиологическую идентификацию получили в 155-и (68,6%) случаях. Полимиксиновую сорбцию применили у 86-и больных через 2–6 часов после диагностики сепсиса при ЕАА выше 0,5. Скорость кровотока – 80–150 мл/мин, длительность – 120–240 мин, кратность – 2–3 сеанса с интервалом 24 часа. При развитии ОПП и ОРДС 144-м больным в комплекс лечения включали фильтрационную детоксикацию с использованием диализатора с мембраной из полиметилметакрилата. Детоксикацию проводили в течение 8–12 часов со сменой диализатора каждые 4 часа.

Результаты. После завершения сорбционного лечения отметили статистически значимое снижение гипертермии, лейкоцитоза, нейтрофилии, прокальцитонина, показателей ЕАА-теста. Регистрировали нормализацию гемодинамики, увеличение индекса оксигенации, снижение SOFA на $5,6 \pm 2,1$ баллов ($p < 0,05$). Через 60 минут после завершения фильтрационной детоксикации РСТ и IL-6 в крови снизились от $6,7 \pm 2,7$ нг/мл до $2,3 \pm 0,6$ нг/мл и от 7300 ± 7700 пг/мл до 860 ± 180 пг/мл соответственно ($p < 0,05$). Индекс SOFA уменьшился на $4,1 \pm 1,1$ балла ($p < 0,05$).

Заключение. Применение полимиксиновой сорбции и фильтрационной детоксикации с использованием мембраны из полиметилметакрилата способствует улучшению результатов лечения абдоминального сепсиса у онкологических больных.

Ключевые слова: абдоминальный сепсис; полимиксиновая сорбция; диализная мембрана из полиметилметакрилата

The purpose is to evaluate the detoxification effects of the polymyxin sorption columns and filtration detoxification using polymethyl methacrylate membranes in abdominal sepsis in cancer patients.

Materials and Methods. We examined 226 patients with oncological diseases of abdominal organs complicated by abdominal sepsis postsurgery. In 50 cases, septic shock was reported. In 173 patients an acute renal injury (ARI) was diagnosed in the structure of organ failures, of which a combination with acute respiratory distress syndrome (ARDS) was diagnosed in 61 patients. The severity was 26.3 ± 3.3 points (APACHE-II scale), 10.2 ± 2.5 points (SOFA scale), and 4.3 ± 1.8 points (qSOFA scale). Microbiological identification was obtained in 155 (68.6%) cases. The polymyxin column sorption was used in 86 patients 2–6 hours after sepsis was diagnosed with the EAA greater than 0.5. The blood flow rate was 80–150 mL/min; the duration was 120–240 min; the sorption frequency was 2–3 sessions at a 24-hour interval. If ARI and ARDS were developed, detoxification by filtration using a dialyzer with a BK-1.6F polymethylmethacrylate membrane was included in the complex treatment of 144 patients. The detoxification was carried out for 8–12 hours changing the dialyzer every 4 hours.

Results. A statistically significant decreases of hyperthermia, leukocytosis, neutrophilia, procalcitonin, and the EAA test values were revealed after the completion of the sorption treatment. Normalization of hemodynamic parameters, increase of the oxygenation index, and SOFA scoring decrease by 5.6 ± 2.1 points ($P < 0.05$) were found. PCT and IL-6 blood levels decreased from 6.7 ± 2.7 ng/mL to 2.3 ± 0.6 ng/mL and from 7300 ± 7700 pg/mL to 860 ± 180 pg/mL,

Адрес для корреспонденции:

Наталья Ушакова
E-mail: ndu2000@rambler.ru

Correspondence to:

Nataliya Ushakova
E-mail: ndu2000@rambler.ru

respectively, as determined 60 minutes after completion of filtration detoxification procedure ($P<0.05$). The SOFA index decreased by 4.1 ± 1.1 points ($P<0.05$).

Conclusion. The use of polymyxin column sorption and filtration detoxification using a polymethyl methacrylate membrane improves the results of treatment of abdominal sepsis in cancer patients.

Keywords: *abdominal sepsis; polymyxin sorption; polymethyl methacrylate dialysis membrane*

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-25-34

Введение

«Сепсис – угрожающая жизни органная дисфункция, причиной которой является дисрегуляторный ответ организма на инфекцию...» [1]. Развитие сепсиса сопровождается неконтролируемым каскадом изменений в системах воспаления, коагуляции и фибринолиза, происходящих одновременно, как цикл автоматического наложения взаимобусловленных процессов с последующими нарушениями микроциркуляции и тканевой оксигенации, развитием митохондриальной дисфункции и метаболических расстройств. В результате комбинации клеточных, сосудистых, метаболических нарушений формируется полиорганная недостаточность [2, 3]. В этих условиях при угнетении функций физиологических защитных систем организма экстракорпоральная детоксикация становится одним из основных компонентов интенсивного лечения сепсиса [4–6].

Липополисахарид (LPS) является важным инфекционным триггером воспаления. Доказана корреляция между концентрацией LPS в системном кровотоке, частотой и степенью выраженности органных нарушений, а также уровнем летальности при грамтрицательном сепсисе [7, 8]. В последние годы в целях купирования системного воздействия LPS применяют методы его избирательного экстракорпорального удаления, к которым относится полимиксиновая сорбция [9–12]. В ряде многоцентровых исследований показано, что включение в комплекс лечения абдоминального сепсиса сорбции с использованием колонок с полимиксином способствовало снижению активности индуцированного эндотоксином воспаления, росту выживаемости у данной категории больных. Вместе с тем, в разных исследованиях существуют расхождения в оценке клинических эффектов метода, что может быть связано с разнородностью групп больных [13, 14].

Формирование органных нарушений при генерализованном воспалении сопровождается накоплением и распространением по водным секторам организма токсических эндогенных субстанций при неспособности их адекватного выведения физиологическими системами детоксикации. Это определяет необходимость включения в комплекс лечения фильтрационных методов детоксикации [4]. Особый интерес при этом представляет использование диализной мембраны из полуволоконного полимера полиметилметакрилата (PMMA). Струк-

Introduction

«Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by the body's dysregulatory response to infection...» [1]. The development of sepsis is accompanied by an uncontrolled cascade of changes in the systems of inflammation, coagulation and fibrinolysis occurring simultaneously as a cycle of automatic overlapping of interdependent processes with subsequent disorders of microcirculation and tissue oxygenation, development of mitochondrial dysfunction and metabolic disorders. Multiple organ failure develops as a result of a combination of cellular, vascular, and metabolic disorders [2, 3]. Under these conditions, when the functions of physiological protective systems of the organism are suppressed, the extracorporeal detoxification becomes one of the main components of the intensive care of sepsis [4–6].

Lipopolysaccharide (LPS) is an important infectious trigger of inflammation. The correlation between the concentration of LPS in the systemic circulation, the incidence and severity of organ dysfunctions, as well as the mortality rate in Gram-negative sepsis have been confirmed [7, 8]. Over recent years, in order to inhibit the systemic effects of LPS, methods of its selective extracorporeal removal are used including polymyxin sorption [9–12]. Various multicenter studies have shown that the inclusion of the polymyxin sorption in the complex treatment of abdominal sepsis contributes to a decrease of the activity of endotoxin-induced inflammation, and an increase in the survival rate in these patients. However, in different studies, there were discrepancies in the evaluation of clinical effects of column sorption presumably due to heterogeneity of patient groups [13, 14].

The development of organ dysfunctions in generalized inflammation is accompanied by the accumulation and spreading of toxic endogenous substances in the aquatic sectors of the body because of inability of adequate removal of toxic molecules by physiological detoxification systems. This determines the urgent need to include methods of detoxification by filtration into the complex treatment of sepsis [4]. The use of dialysis membranes of hollow-fiber polymer polymethyl methacrylate (PMMA) is of a special interest. The structure of a PMMA membrane is symmetrical and constant over its entire thickness that ensures the participation of the entire surface of the membrane in the detoxification and the implementation of the following three mechanisms: diffusion, convection and sorption [15]. The effectiveness of the

тура мембраны РММА симметрична и одинакова по всей толщине, что обеспечивает участие в детоксикации всей поверхности мембраны и реализации трех механизмов: диффузии, конвекции и сорбции [15]. Эффективность мембраны РММА при сепсисе и септическом шоке отмечена в ряде исследований. Так О. Nishida et al. (2011) представили результаты применения фильтрационной детоксикации с использованием мембраны РММА у 55 больных. Показано снижение IL-6 после перфузии через фильтр одного объема циркулирующей крови, значительное уменьшение дозы прессорных аминов в случаях развития септического шока, увеличение $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ при сепсис-индуцированном остром респираторном дистресс-синдроме (ОРДС) [16]. Taka-aki Nakada et al. (2011) при использовании мембраны РММА у больных сепсисом регистрировали уменьшение концентрации IL-6 в крови, улучшение показателей гемодинамики, купирование гипоксии, увеличение диуреза [17]. В ряде исследований показана эффективность удаления провоспалительных цитокинов из системного кровотока, что приводило к скорейшему восстановлению гомеостаза при септическом шоке, а также противовоспалительных цитокинов (IL-10), что способствовало оптимизации цитокинового баланса, в том числе, и при «иммунном параличе», ассоциирующемся со снижением моноцитарного HLA-DR. Эти данные имеют рациональное объяснение с точки зрения «гипотезы пиковой концентрации», «цитокиновой теории» сепсиса и «цепной реакции повреждения» [16, 18, 19].

В настоящее время сепсис признан наиболее частой причиной нозокомиального ОПП. Госпитальная летальность при сепсисе и ОПП достигает 70%, что почти в 2 раза выше, чем у больных без ОПП [20, 21]. В последние годы на основании экспериментальных и клинических исследований уточнены патогенетические механизмы ОПП при сепсисе. Развитие ОПП является следствием нарушения гемодинамики почек с формированием корковой гипоперфузии и медуллярного переполнения; прямого взаимодействия LPS с клеточными структурами почек; активации иммунных клеток, сопровождающейся массивным выбросом воспалительных цитотоксических молекул; эндокринной дисрегуляции; взаимоотягощающих перекрестных воздействий системного воспаления, полиорган-ных нарушений и ОПП [22–26]. Это определяет патогенетическую обоснованность начала применения фильтрационной детоксикации на ранних этапах сепсис-ассоциированного ОПП, а также выбора метода и диализной мембраны с учетом патогенетических механизмов его развития. Однако в настоящее время эти вопросы остаются предметом научных дискуссий, а их решение требует дальнейших научных исследований.

Цель исследования – оценить детоксикационные эффекты использования колонок с полимик-

РММА мембраны в сепсисе и септическом шоке было reported в ряде исследований. Например, О. Nishida et al. (2011) представили результаты использования фильтрационной детоксикации с использованием мембраны РММА у 55 пациентов. Уменьшение уровня IL-6 после перфузии одного объема циркулирующей крови, значительное уменьшение дозы прессорных аминов в случаях септического шока, увеличение $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ при сепсис-индуцированном остром респираторном дистресс-синдроме (ARDS) были продемонстрированы [16]. Taka-aki Nakada et al. (2011) сообщили об уменьшении концентрации IL-6 в крови, улучшении гемодинамических параметров, купировании гипоксии, увеличении диуреза при использовании мембраны РММА у пациентов с сепсисом [17]. Ряд исследований показал эффективность удаления (а) провоспалительных цитокинов из системного кровотока, что привело к раннему восстановлению гомеостаза при септическом шоке, и (б) противовоспалительных цитокинов (IL-10), что способствовало оптимизации цитокинового баланса, в том числе, и при «иммунном параличе», ассоциирующемся со снижением моноцитарного HLA-DR. Эти данные имеют рациональное объяснение с точки зрения «гипотезы пиковой концентрации», «цитокиновой теории», «цепной реакции повреждения» [16, 18, 19].

В настоящее время сепсис считается наиболее частой причиной нозокомиального ОПП. Госпитальная летальность при сепсисе и ОПП достигает 70%, что почти в 2 раза выше, чем у больных без ОПП [20, 21]. В последние годы на основании экспериментальных и клинических исследований уточнены патогенетические механизмы ОПП при сепсисе. Развитие ОПП является следствием нарушения гемодинамики почек с формированием корковой гипоперфузии и медуллярного переполнения; прямого взаимодействия LPS с клеточными структурами почек; активации иммунных клеток, сопровождающейся массивным выбросом воспалительных цитотоксических молекул; эндокринной дисрегуляции; взаимоотягощающих перекрестных воздействий системного воспаления, полиорган-ных нарушений и ОПП [22–26]. Это определяет патогенетическую обоснованность начала применения фильтрационной детоксикации на ранних этапах сепсис-ассоциированного ОПП, а также выбора метода и диализной мембраны с учетом патогенетических механизмов его развития. Однако в настоящее время эти вопросы остаются предметом научных дискуссий, а их решение требует дальнейших научных исследований.

Цель исследования – оценить детоксикационные эффекты использования колонок с полимик-

Materials and Methods

В исследование включено 226 пациентов (136 мужчин и 90 женщин) с онкологическими заболеваниями органов брюшной полости, у которых послеоперационный период был осложнен абдоминальным сепсисом. В 50 случаях был зарегистрирован септический шок.

синовым сорбентом и фильтрационной детоксикации с использованием мембраны из полиметилметакрилата при абдоминальном сепсисе у онкологических больных.

Материал и методы

В исследование включили 226 больных (136 мужчин и 90 женщин) онкологическими заболеваниями органов брюшной полости в возрасте $54,3 \pm 8,7$ лет, послеоперационный период у которых осложнился абдоминальным сепсисом. У 50 больных регистрировали развитие септического шока. В 173 случаях в структуре органических нарушений диагностировали острое почечное повреждение (ОПП), в 61 – в сочетании с острым респираторным дистресс синдромом (ОРДС). Тяжесть исходного состояния по шкале APACHE-II была $26,3 \pm 3,3$ балла, SOFA – $10,2 \pm 2,5$ баллов, qSOFA – $4,3 \pm 1,8$ балла.

Микробиологическую идентификацию получили в 155-и (68,6%) случаях. Грамотрицательная инфекция была представлена *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*. У 146 (64,6%) больных диагностировали инфекционный процесс смешанной этиологии. В 82 (36,3%) случаях были выделены проблемные штаммы.

Все больные получали стандартизированную терапию [1]. Дополнительно 86 больным в комплекс лечения была включена полимиксиновая сорбция с использованием колонки с иммобилизованным полимиксином-B «Toraymyxin PMX-20 R» («Toray Industries», Япония). Полимиксиновую сорбцию проводили через 2–6 часов после диагностики сепсиса при ЕАА выше 0,5. Скорость кровотока была 80–150 мл/мин, длительность – 120–240 мин, кратность 2–3 сеанса с интервалом 24 часа.

При развитии ОПП и ОРДС 144-м больным в комплекс лечения была включена фильтрационная детоксикация (гемодиализ, гемофильтрация, гемodiaфильтрация) с использованием диализатора с мембраной из полиметилметакрилата серии «BK-1,6 F», диаметр пор 100A («Toray Industries», Япония). Детоксикацию проводили на аппарате Мультифильтрат («Fresenius», Германия). Сосудистый доступ – v. subclavia/v. femoralis. Скорость перфузии – 150 мл/час. Скорости потоков субституата и диализата составляли 1000–1200 мл/час. Гепаринизация – нефракционированный гепарин в дозе, рассчитанной с учетом показателей активированного частичного тромбопластинного времени. Детоксикацию проводили в течение 8–12 часов со сменой диализатора каждые 4 часа, что было связано с высокой, но ограниченной временем сорбционной активностью и появлением признаков тромбоза диализатора.

Наряду с общеклиническим обследованием исследовали прокальцитонин (PCT) и активность эндотоксина в крови. Прокальцитонин определяли количественным методом (Brahms Diagnostica GmbH, Германия). Тест на активность эндотоксина (ЕАА) выполняли хемилюминесцентным методом на люменометре Smart Line Tube Illuminometer («Berthold Detection Systems GmbH», Германия) с использованием набора иммунодиагностических реагентов ЕААTM. Исследования проводили при диагностике сепсиса, до начала экстракорпоральной детоксикации, через 1 и 24 часа после завершения детоксикационного лечения.

Дополнительно в целях изучения детоксикационных эффектов диализной мембраны PMMA серии «BK-1,6 F»

В 173 пациентах, острая почечная недостаточность (ОПН) была диагностирована в структуре органной недостаточности, в 61 пациенте она была диагностирована в сочетании с острым респираторным дистресс синдромом (ARDS). Базисная тяжесть была $26,3 \pm 3,3$ баллов по шкале APACHE-II, $10,2 \pm 2,5$ баллов по шкале SOFA, и $4,3 \pm 1,8$ баллов по шкале qSOFA.

Микробиологическая идентификация была получена в 155 (68,6%) случаях. Грамотрицательная инфекция была представлена *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*. Инфекционный процесс смешанной этиологии был диагностирован в 146 (64,6%) пациентах. Проблемные штаммы были идентифицированы в 82 (36,3%) случаях.

Все пациенты получали стандартную терапию сепсиса [1]. Дополнительно, полимиксин сорбция с использованием колонки с иммобилизованным полимиксином-B («Toray Industries», Япония) была дополнительно включена в комплексное лечение 86 пациентов. Полимиксин сорбция проводилась в течение 2–6 часов после диагностики сепсиса при ЕАА значениях выше 0,5. Скорость кровотока была 80–150 мл/мин; длительность была 120–240 мин; частота была 2–3 сеанса с интервалом 24 часа.

С развитием ОПН и ARDS, фильтрационная детоксикация (гемодиализ, гемофильтрация, гемodiaфильтрация) с использованием диализатора с мембраной из полиметилметакрилата, диаметр пор 100A («Toray Industries», Япония) была включена в комплексное лечение 144 пациентов. Детоксикация проводилась с использованием Мультифильтрат аппарата («Fresenius», Германия). Вascular access осуществлялся по v. subclavia/ v. femoralis. Скорость перфузии была 150 мл/ч. Скорости потоков субституата и диализата были 1000–1200 мл/ч. Гепаринизация – нефракционированный гепарин в дозе, рассчитанной с учетом параметров активированного частичного тромбопластинного времени. Детоксикация проводилась в течение 8–12 часов с заменой диализатора каждые 4 часа, что было связано с высокой, но ограниченной временем сорбционной активностью и появлением признаков тромбоза в диализере.

Вместе с общим клиническим обследованием, прокальцитонин (PCT) уровни и эндотоксин активность в крови исследовались. Прокальцитонин определялся количественным методом (Brahms Diagnostica GmbH, Германия). Эндотоксин активность тест (ЕАА) проводился хемилюминесцентным методом на люменометре Smart Line Tube Illuminometer («Berthold Detection Systems GmbH», Германия) с использованием набора иммунодиагностических реагентов ЕААTM. Исследования проводили при диагностике сепсиса, до начала экстракорпоральной детоксикации, и 1 и 24 часов после детоксикационного лечения.

Вдобавок, ретроспективный анализ фильтрационной детоксикации асцитической жидкости у пациентов с раком яичников проводился для получения ее белкового концентрата как биологической среды для интраперитонеальной химиотерапии. Для определения детоксикационных эффектов мембраны «BK-1,6 F» PMMA диализной мембраны. Результаты биохимических и иммунологических исследований асцитической жидкости и ее компонентов (белкового концентрата и фильтрата, полученного в результате фильтрационной детоксикации) и морфологической структуры белковой пленки-подобной структуры асцитической жидкости и ее белкового концентрата также исследовались [27–29].

Средняя молекулярная масса (MMM₂₅₄ и MMM₂₈₀) была исследована с помощью прямой спектроскопии депротеинизированного супернатанта, полученного после осаждения белка с раствором трихлоруксусной кислоты при длинах волн 254 и 280 нм.

провели ретроспективный анализ фильтрационной детоксикации асцитической жидкости больных раком яичников, которая была выполнена для получения ее белкового концентрата, как биосреды для внутрибрюшинной химиотерапии. Изучили результаты биохимического, иммунологического исследований асцитической жидкости и ее компонентов – белкового концентрата и фильтрата, полученных путем ее фильтрационной детоксикации; морфологической структуры белковых фаций асцитической жидкости и ее белкового концентрата [27–29].

Содержание молекул средней массы (M_{254} и M_{280}) изучили методом прямой спектрометрии депротенизированного супернатанта, полученного после осаждения белков раствором трихлоруксусной кислоты, при длинах волн 254 и 280 нм [30]. Общую (ОКА) и эффективную концентрацию альбумина (ЭКА) с вычислением резервной связывающей способности альбумина ($ЭКА/ОКА \cdot 100\%$), позволяющей судить о степени сорбции токсических лигандов, определяли флуориметрическим методом. Коэффициент интоксикации, отражающий баланс между накоплением и связыванием токсических лигандов, рассчитывали по формуле: $КИ_{ММ/ЭКА} = (M_{254}/ЭКА) \cdot 1000$ [31]. Концентрацию цитокинов IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-10, IFN- γ исследовали иммуноферментным методом с использованием тест-систем («Цитокин», Санкт-Петербург). Общее количество белка определяли биуретовым методом. Цитокины являются веществами белковой природы с более низкой молекулярной массой, чем альбумин и глобулины, и содержатся в биологических жидкостях в значительно меньших количествах (измеряются в пг/мл, тогда как альбумин и глобулины в г/л). Учитывая тот факт, что общее количество белка в асцитической жидкости больных в значительной мере индивидуально и может варьировать в широких пределах, в каждой пробе асцитической жидкости, белкового концентрата и фильтрата провели пересчет концентрации цитокинов на общее количество белка и получили значения их удельного содержания.

Морфологическое исследование структуропостроения твердотельных фаций (пленок) выполнили методом клиновидной дегидратации [312]. Микроскопирование провели в световом и поляризационном режимах микроскопом Leica DMLS2.

Статистическую обработку результатов провели с использованием программы «Statistica 6.0» с вычислением критерия достоверности Стьюдента (t). Достоверным считали различие при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полимиксиновую сорбцию включили в комплекс интенсивного лечения у 86-и больных. В основу метода положена нейтрализация при полимиксиновой сорбции биологической активности эндотоксина путем связывания липида А, который является облигатным компонентом молекулы LPS, а также сорбции активированных нейтрофилов и проапоптотических факторов. У 78-и больных провели 2 сеанса сорбции с интервалом 24 часа, в 8 случаях – 3, что было обусловлено сохранением выраженности эндотоксемии.

Анализ клинических результатов свидетельствовал о положительном воздействии полимиксиновой сорбции на течение генерализованного

[30]. The total (TAC) and effective albumin concentration (EAC) with the calculation of reserve binding capacity of albumin ($EAC/TAC \cdot 100\%$), which allows to conclude on the degree of sorption of toxic ligands, was determined by a fluorimetric method. The intoxication coefficient reflecting the balance between accumulation and binding of toxic ligands was calculated using the following formula: $IC_{MMM/EAC} = (MMM_{254}/EAC) \cdot 1000$ [31]. The concentration of cytokines IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-10, and IFN- γ was determined by ELISA using test-systems («Cytokine», St. Petersburg). The total amount of protein was determined by the biuret test. Cytokines are substances of a protein nature with a molecular weight lower than that of albumin and globulins and are contained in biological fluids in much smaller quantities (measured in pg/ml, whereas albumin and globulins are measured in g/l). Taking into account the fact that the total amount of protein in the ascetic fluid of patients is largely individual and can vary widely, in each sample of ascetic fluid, protein concentrate and filtrate, the cytokine concentration was recalculated by the total amount of protein and the values of their specific content were obtained.

The morphological study of solid-state film-like structures was performed by wedge-shaped dehydration [32]. The microscopy was carried out in the light and polarization modes by the Leica DMLS2 microscope.

The statistical processing of the results was carried out using the Statistica 6.0 software and Student's t -test. The difference at $P < 0.05$ was considered significant.

Results and Discussion

Polymyxin column sorption was included in the complex intensive care in 86 patients. The method is based on neutralization of endotoxin biological activity during the polymyxin sorption by binding lipid A, which is an obligatory component of the LPS molecule, as well as sorption of activated neutrophils and proapoptotic factors. In 78 patients, 2 sorption sessions were conducted at intervals of 24 hours, in 8 cases 3 sessions were performed, which was due to the persistence of endotoxemia.

Analysis of clinical results showed a positive effect of polymyxin sorption on the course of generalized inflammation in abdominal sepsis in cancer patients. When it was included in the main treatment, in 68 (79.1%) cases, a decrease in the daily febrile state from $38.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$ to $37.4 \pm 0.4^\circ\text{C}$, WBC count from $18.9 \pm 8.3 \cdot 10^9/\text{l}$ to $11.2 \pm 2.4 \cdot 10^9/\text{l}$, neutrophil blood count from $88.1 \pm 3.2\%$ to $74.1 \pm 3.2\%$, and SOFA index by 5.6 ± 2.1 points ($P < 0.05$) were observed in 24 hours after the completion of the procedure. At that time-point, there was a decrease in the PCT level from 7.1 ± 2.6 ng/ml to 2.2 ± 0.4 ng/ml and EAA from 0.62 ± 0.10 to 0.36 ± 0.01 ($P < 0.05$).

After completion of a sorption treatment, in 37 (88.1%) of 42 patients with initially detected disorders of the cardiovascular system, improvement of hemodynamic parameters was diagnosed. In 21 cases, no further use of vasopressor drugs was required; in 16 cases, doses of pressor amines were reduced: dopamine by 68%, noradrenaline+adrenaline by 75% ($P < 0.05$).

воспаления при абдоминальном сепсисе у онкологических больных. При ее включении в основное лечение в 68-и (79,1%) случаях через 24 часа после завершения отмечали снижение суточного фебрилитета от $38,7 \pm 0,3^\circ\text{C}$ до $37,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$, лейкоцитов от $18,9 \pm 8,3 \cdot 10^9/\text{л}$ до $11,2 \pm 2,4 \cdot 10^9/\text{л}$, нейтрофилов крови от $88,1 \pm 3,2\%$ до $74,1 \pm 3,2\%$, индекса SOFA на $5,6 \pm 2,1$ баллов ($p < 0,05$). При этом наблюдали уменьшение РСТ от $7,1 \pm 2,6$ нг/мл до $2,2 \pm 0,4$ нг/мл, ЕАА от $0,62 \pm 0,10$ до $0,36 \pm 0,01$ ($p < 0,05$).

После завершения сорбционного лечения у 37-и (88,1%) из 42-х больных при исходно выявленных нарушениях со стороны сердечно-сосудистой системы диагностировали улучшение гемодинамических показателей. В 21-м случае дальнейшего применения вазопрессорных препаратов не требовалось, в 16-и – дозы прессорных аминов были снижены: допамин – на 68%, норадреналин+адреналин – на 75% ($p < 0,05$). Только у 5-и больных инотропную/вазоактивную поддержку осуществляли в прежнем режиме.

Включение в комплекс интенсивного лечения полимиксиновой сорбции оказывало положительное влияние на состояние метаболизма. У 63-х (73,3%) больных отмечали нормализацию лактата, а также значений РН и ВЕ крови, что свидетельствовало об улучшении клеточной оксигенации и нормализации клеточного метаболизма.

После экстракорпоральной элиминации эндотоксина наблюдали улучшение оксигенирующей функции легких. Диагностировали увеличение индекса оксигенации ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) от $239,3 \pm 46,2$ до $317,3 \pm 14$ ($p < 0,05$). В 23-х (37,7%) из 61-го случая после окончания сорбционного лечения больные, которым проводили ИВЛ, были переведены на спонтанное дыхание.

Применение в комплексе лечения абдоминального сепсиса полимиксиновой сорбции приводило к улучшению функционального состояния почек. Так у 49-и (92,5%) из 53-х больных при исходной олигоанурии более 6-и часов и повышении креатинина крови в среднем до 246 мкмоль/л ($210\text{--}270$) наблюдали восстановление объема почасового диуреза с последующим снижением креатинина. Только в 4-х (7,5%) случаях отмечали прогрессирование ОПП и необходимость применения заместительной почечной терапии. Полученные результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о выраженном нефропротекторном эффекте полимиксиновой сорбции, связанном с подавлением системной проапоптозной активности путем удаления липополисахарида грамотрицательных бактерий [31].

Через 60 минут после окончания фильтрационной детоксикации содержание РСТ и IL-6 в крови снизилось с $6,7 \pm 2,7$ нг/мл до $2,3 \pm 0,6$ нг/мл и с 7300 ± 7700 пг/мл до 860 ± 180 пг/мл соответственно ($p < 0,05$). Показатели ЕАА-теста статистически значимых изменений не претерпевали.

Only in 5 patients, inotropic / vasoactive support was carried out as previously.

The inclusion of the polymyxin column sorption into the complex intensive treatment provided a positive effect on the state of metabolism. In 63 (73.3%) patients, the normalization of lactate, blood pH and blood BE values was observed indicating the improvement of cellular oxygenation and normalization of cellular metabolism.

After extracorporeal elimination of endotoxin, improvement of lung oxygenation function was observed. Increased oxygenation index ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) from 239.3 ± 46.2 to 317.3 ± 14 ($P < 0.05$) was diagnosed. In 23 (37.7%) of 61 cases, patients on mechanical ventilation were transferred to spontaneous breathing after the completion of the sorption treatment.

The use of the polymyxin sorption in the complex of treatment of abdominal sepsis led to an improvement in the functional state of the kidneys. For example, in 49 of 53 patients (92.5%) with initial oligoanuria for more than 6 hours and an increased blood creatinine level up to an average of 246 $\mu\text{mol/l}$ ($210\text{--}270$), the recovery of hourly urine output followed by a decreased creatinine level was observed. Only in 4 cases (7.5%), the progression of ARI and the need for renal replacement therapy was found. The obtained results correspond to the literature data indicating the significant nephroprotective effect of the polymyxin column sorption associated with the abrogation of systemic proapoptotic activity through removing the lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria [31].

PCT and IL-6 blood levels decreased from 6.7 ± 2.7 ng/ml to 2.3 ± 0.6 ng/ml and from 7300 ± 7700 pg/ml to 860 ± 180 pg/ml, respectively were registered 60 minutes after completion of filtration detoxification ($P < 0.05$). The parameters of the EAA test did not undergo statistically significant changes. There was a decrease in the blood lactate level from 5.6 ± 2.3 mg/ml to 1.9 ± 0.9 mg/ml ($P < 0.05$). The SOFA index in these patients decreased by 4.1 ± 1.1 points ($P < 0.05$).

While diagnosing septic shock, in 22 (73.3%) of 30 patients, values of catecholamine index decreased from 5.2 ± 1.2 to 2.1 ± 0.6 after the filtration detoxification. At the same time, in 12 cases (40.0%), normalization of hemodynamics was observed and the administration of pressor amines was canceled. In 123 (85.4%) of 144 patients, the frequency of filtration detoxification was from 1 to 4 sessions. Only in 21 (14.6%) cases, the course of ARI required a long-term dialysis treatment.

The effects of detoxification activity of the PMMA dialysis membrane were also studied retrospectively on the basis of previously obtained data of filtration detoxification of ascetic fluid in patients with ovarian cancer (Table) [27–29]. The analysis of results of this study demonstrated a high activity of excretion of substances of medium molecular weight and the exposed active centers of albumin molecules

Показатели эндогенной интоксикации и содержание цитокинов в биологической среде, полученной при фильтрационной детоксикации у больных раком яичников ($n=30$).

Parameters of endogenous intoxication and cytokine level in biological medium of patients with ovarian cancer, obtained by filtration detoxification ($n=30$).

Biological medium	Values of parameters ($M\pm\sigma$)										
	TAC	EAC	ABA	MMM ₂₅₄	MMM ₂₈₀	IC	Cytokines, pg/ml				
	g/l	g/l		conven- tional units	conven- tional units		IL-1 α	TNF- α	IL-6	IFN- γ	IL-10
Ascitic fluid	28,3 $\pm$ 2,58	21,69 $\pm$ 2,57	45,9 $\pm$ 4,6	0,304 $\pm$ 0,017	0,258 $\pm$ 0,03	17,02 $\pm$ 1,89	9,11 $\pm$ 3,98	500,7 $\pm$ 0,56	44,02 $\pm$ 1,37	4,9 $\pm$ 3,43	94,25 $\pm$ 3,28
Protein concentrate	48,6 $\pm$ 3,42*	37,7 $\pm$ 3,5*	72,7 $\pm$ 4,7*	0,098 $\pm$ 0,02*	0,089 $\pm$ 0,03*	2,7 $\pm$ 1,56*	1,57 $\pm$ 0,85	—	10,06 $\pm$ 1,33*	—	0,08 $\pm$ 0,05*
Filtrate	—	—		0,340 $\pm$ 0,044	0,235 $\pm$ 0,034		—	309,9 $\pm$ 309	14,4 $\pm$ 24,3	9,0 $\pm$ 11,35	62,9 $\pm$ 24,9

Note. EAC — effective albumin concentration; TAC — total albumin concentration; ABA — albumin binding ability; IC — intoxication coefficient. * — $P < 0.05$ compared to ascitic fluid.

Примечание. Biological medium — биологическая среда; ascitic fluid — асцитическая жидкость; protein concentrate — белковый концентрат; filtrate — фильтрат; values of parameters — значения параметров; TAC — общая концентрация альбумина, г/л; EAC — эффективная концентрация альбумина, г/л; ABA — связывающая способность альбумина; conventional units — условные единицы; IC — коэффициент интоксикации; cytokines, pg/ml — цитокины, пг/мл. * — различия достоверны в сравнении с асцитической жидкостью, $p < 0,05$.

Отмечали уменьшение концентрации лактата крови от 5,6 $\pm$ 2,3 мг/мл до 1,9 $\pm$ 0,9 мг/мл ($p < 0,05$). Индекс SOFA у этих больных снизился на 4,1 $\pm$ 1,1 балла ($p < 0,05$).

При диагностике септического шока у 22-х (73,3%) из 30-и больных после проведения фильтрационной детоксикации значения катехоламинового индекса уменьшились с 5,2 $\pm$ 1,2 до 2,1 $\pm$ 0,6. При этом в 12-и случаях (40,0%) отмечали нормализацию гемодинамики и введение прессорных аминов было отменено. У 123-х (85,4%) из 144-х больных кратность проведения фильтрационной детоксикации составила от 1 до 4 сеансов. Только в 21-м (14,6%) случае характер течения ОПП потребовал длительного применения диализного лечения.

Эффекты детоксикационного воздействия диализной мембраны РММА также изучили ретроспективно на основании полученных ранее данных фильтрационной детоксикации асцитической жидкости больных раком яичников (таблица) [27–29]. Анализ результатов этого исследования выявил высокую активность выведения при фильтрации субстанций средней молекулярной массы и деблокирование активных центров молекул альбумина, участвующих в физиологических механизмах детоксикации. В белковом концентрате содержание МСМ₂₅₄ и МСМ₂₈₀ было в 30 раз ниже, ЭКА альбумина и его связывающая способность в 1,7 раз выше, а коэффициент интоксикации — в 6,4 раза меньше, чем в асцитической жидкости и фильтрате ($p < 0,05$).

Содержание цитокинов в асцитической жидкости больных раком яичников и ее компонентах — белковом концентрате и фильтрате, полученных при фильтрации, представлено в таблице.

В белковом концентрате регистрировали значительно более низкие концентрации в сравнении с асцитической жидкостью и фильтратом IFN- γ , IL-1 α , IL-6, IL-10 и отсутствие TNF- α . В фильтрате содержание IFN- γ , IL-6, IL-10 было значительно

involved in physiological mechanisms of detoxification. In the protein concentrate, the content of MMM₂₅₄ and MMM₂₈₀ was 30 times lower; the EAC and the albumin binding capacity was 1.7 times higher, and the intoxication coefficient was 6.4 times less than those in the ascitic fluid and filtrate ($P < 0.05$).

The content of cytokines in the ascetic fluid of patients with ovarian cancer and its components, protein concentrate and filtrate obtained during filtration, is presented in Table.

Significantly lower concentrations of IFN- γ , IL-1 α , IL-6, IL-10 and the absence of TNF- α were found in the protein concentrate as compared to ascitic fluid and filtrate. In the filtrate, the content of IFN- γ , IL-6, IL-10 was significantly lower than that in the ascetic fluid, and IL-1 α was not determined. At the same time, the total concentration of cytokines in the protein concentrate and filtrate obtained during filtration was significantly lower than those in the ascitic fluid, which indirectly confirms the presence of the mechanism of their sorption by a dializer membrane.

The morphological structure of film-like structures (facies) of the ascitic fluid and its protein concentrate obtained after the filtration detoxification using PMMA membranes was studied in 15 samples.

The study of the morphological pattern of solid-state facies makes it possible to make the molecular organization of biological fluids visible and to detect conformational changes in albumin in various pathological conditions. During the transition of biological liquids into the solid phase, a dry film, facies, is formed (Fig. a). Evaporation of protein-bound water leads to the coagulation of protein molecules, stretching, compression of the film and the formation of «cracks». In biological fluids of healthy people, the formation of «cracks» occurs at regular intervals from the periphery to the center, and the ends of radial «cracks» are rounded and form «arcades» and «sec-

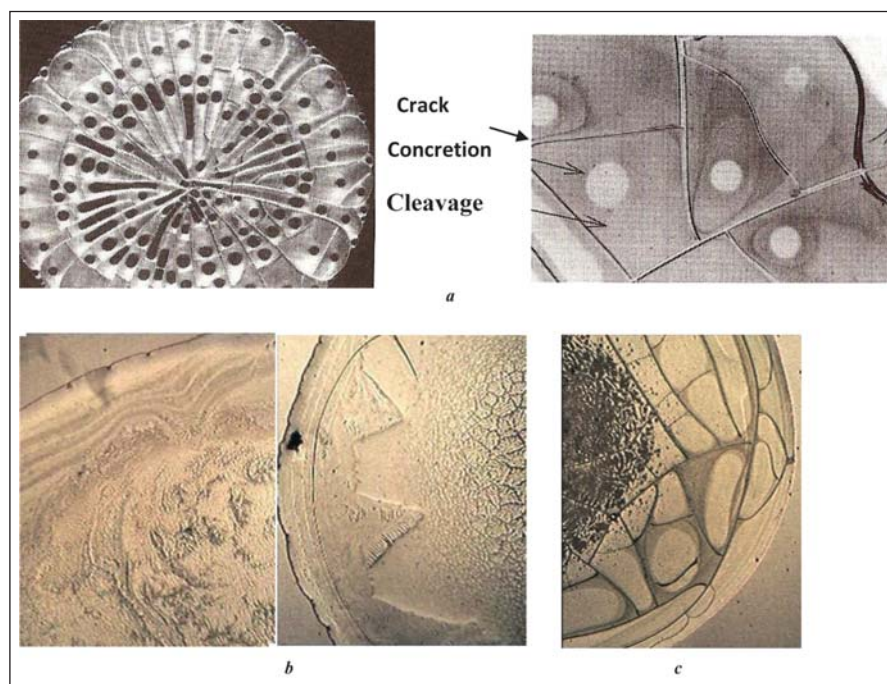


Рис. Морфологическая картина структуропостроения фаций биологических жидкостей.
Fig. Morphological image of the structure formation of protein film-like structures of biological liquid specimens.

Note. *a* — healthy person, serum; *b* — patient with ovarian cancer, ascitic fluid during filtration detoxification; *c* — ovarian cancer, ascitic fluid, during filtration detoxification. Magnification $\times 10$.

Примечание. Crack — трещина; concretion — конкреция; cleavage — отдельность. *a* — сывотка крови здорового человека; *b* — асцитическая жидкость больных раком яичников; *c* — белковый концентрат асцитической жидкости больных раком яичников, *b* и *c* получены при фильтрационной детоксикации. Увеличение $\times 10$.

ниже, чем в асцитической жидкости, а IL-1 α не определялся. При этом суммарная концентрация цитокинов в белковом концентрате и фильтрате, полученных при фильтрации, была статистически значимо меньше, чем в асцитической жидкости, что косвенно подтверждает присутствие механизма их сорбции мембраной диализатора.

Морфоструктура фации асцитической жидкости и ее белкового концентрата, полученного после фильтрационной детоксикации с использованием мембраны РММА, была изучена в 15 пробах.

Исследование морфологической картины твердотельных фаций позволяет делать видимой молекулярную организацию биологических жидкостей и выявлять конформационные изменения альбумина при различных патологических состояниях. При переходе биологической жидкости в твердую фазу формируется сухая пленка — фация (рис. *a*). Испарение связанной с белками воды приводит к свертыванию молекул белка, растяжению, сжатию пленки и образованию «трещин». В биологических жидкостях здоровых людей формирование «трещин» происходит через равные промежутки от периферии к центру, а концы радиальных «трещин», закругляясь, образуют «аркады» и «сектора», чем и завершается системный уровень самоорганизации. Подсистемная организация связана с

tors», thus completing the system level of self-organization. The subsystem organization is associated with further small breaks of the protein base and the formation of «cleavages», i.e. sections of facies limited by «cracks». In the central part of the «cleavage», a circular zone of salts surrounded by a protein ring, «concretion». Therefore, facies, a dry film with fixed circular «concentration waves», «cracks», «cleavages», «concretions», is a structural norm of a biological fluid in the solid phase [32].

Morphological changes in facies of ascitic fluid were characterized by pronounced disorders of the system and subsystem structure, accumulation of pathological proteins, toxic metabolic products. After filtration in the protein concentrate of the ascitic fluid, the restorative dynamics in both system types of film-like structures and stability of the physio-

logical rhythm of self-recovery (recovery of circular autorhythms, radial or partially radial symmetry of «cracks») were observed (Fig. *b*, *c*). These data clearly show the detoxification effects of the PMMA membrane.

Conclusion

Inclusion of polymyxin column sorption in the complex treatment of abdominal sepsis in cancer patients contributes to prevention of the hyperactivation of immune responses at an early stage of the development, which determines the need for its timely application immediately after surgical debridement and initiation of antibiotic therapy. In the development of multiple organ failure, the polymyxin column sorption should be combined with the filtration detoxification providing extracorporeal removal of excessively produced inflammatory reaction mediators and endogenous toxic substances.

Timely and joint carrying out of therapeutic measures (objective diagnostics, rational surgery, pathophysiologically justified basic drug therapy, individually selected extracorporeal detoxification) contribute to the improvement of the results and outcomes of treatment of abdominal sepsis in cancer patients.

дальнейшими мелкими разрывами белковой основы и формированием «отдельностей» – участков фации, ограниченных «трещинами». В центральной части «отдельности» формируется круговая зона солей, окруженная белковым кольцом – «конкреция». Таким образом, фация – сухая пленка с фиксированными круговыми «концентрационными волнами», «трещинами», «отдельностями», «конкрециями» является структурной нормой биологической жидкости в твердой фазе [32].

Морфологические изменения фаций асцитической жидкости изученных проб характеризовались выраженными нарушениями системного и подсистемного структурного построения, накоплением патологических белков, токсических продуктов метаболизма. После фильтрации в белковом концентрате асцитической жидкости наблюдали восстановительную динамику как по системным типам фаций, так и по устойчивости физиологического ритма самоорганизации – восстановление круговых ауторитмов, радиальной и частично-радиальной симметрии «трещин» (рис. б, с). Эти данные отчетливо демонстрируют детоксикационные эффекты мембраны РММА.

Заключение

Включение в комплекс лечения абдоминального сепсиса у онкологических больных полимиксиновой сорбции способствует предупреждению активации иммунных реакций на раннем этапе развития, что определяет необходимость своевременного ее применения непосредственно после хирургической санации и начала антибактериальной фармакотерапии. При развитии полиорганной дисфункции полимиксиновую сорбцию следует сочетать с фильтрационной детоксикацией, обеспечивающей экстракорпоральное выведение чрезмерно продуцируемых медиаторов воспалительной реакции и эндогенных токсических субстанций.

Своевременное и содружественное проведение лечебных мероприятий – объективной диагностики, рациональной хирургии, патофизиологически обоснованной базовой медикаментозной терапии, индивидуально подобранной экстракорпоральной детоксикации способствует улучшению результатов и исходов лечения абдоминального сепсиса у онкологических больных.

Литература

1. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper-Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
2. Мороз В.В., Голубев А.М. Сепсис: принципы диагностики. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (6): 5-10. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-6-5
3. Тюрин И.Н., Раутбарт С.А., Козлов И.А. Ранние особенности кровообращения у больных с неблагоприятным исходом абдоминального сепсиса (предварительное сообщение). *Общая реаниматология*. 2017; 13 (3): 13-24. DOI:10.15360/1813-9779-2017-3-13-24
4. Хорошилов С.Е., Никулин А.В. Детоксикация при критических состояниях: понимание научной проблемы в XXI веке (обзор). *Общая реаниматология*. 2017; 13 (5): 85-108. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-5-85-108
5. Yarousovsky M., Abramyan M., Komardina E., Nazarova H. Blood purification in intensive care patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis after cardiac surgery. *Vessel Plus*. 2017; 1: 49-60. DOI: 10.20517/2574-1209.2017.11
6. Хорошилов С.Е., Марухов А.В., Никулин А.В. Применение плазмафереза в ферментативной фазе тяжелого острого панкреатита: новый взгляд на испытанный метод. *Медицина (Алматы)*. 2017; 4: 287-292.
7. Murugan R., Karajala-Subramanyam V., Lee M., Yende S., Kong L., Carter M., Angus D.C., Kellum J.A.; Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) investigators. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int*. 2010; 77 (6): 527-535. DOI: 10.1038/ki.2009.502. PMID: 20032961
8. Glodowski S.D., Wagener G. New insights into the mechanisms of acute kidney injury in the intensive care unit. *J. Clin. Anesth*. 2015; 27 (2): 175-180. DOI: 10.1016/j.jclinane.2014.09.011. PMID: 25480306
9. Ушакова Н.Д., Шевченко А.Н., Четвериков М.В., Златник Е.Ю., Зыкова Т.А. Результаты применения селективной адсорбции эндотоксина при сепсисе у онкологических больных. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (6): 32-38. DOI: 10.15360/1813-9779-2014-6-32-38
10. Holthoff J.H., Wang Z., Seely K.A., Gokden N., Mayeux P.R. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney Int*. 2012; 81 (4): 370-378. DOI: 10.1038/ki.2011.347. PMID: 21975863
11. Legrand M., Dupuis C., Simon C., Gayat E., Mateo J., Lukaszewicz A.C., Payen D. Association between systemic hemodynamics and septic acute kidney injury in critically ill patients: a retrospective observational study. *Crit. Care*. 2013; 17 (6): R278. DOI: 10.1186/cc13133. PMID: 24289206
12. Boomer J.S., To K., Chang K.C., Takasu O., Osborne D.F., Walton A.H., Bricker T.L., Jarman S.D. 2nd, Kreisel D., Krupnick A.S., Srivastava A., Swanson P.E., Green J.M., Hotchkiss R.S. Immunosuppression in patients

References

1. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper-Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
2. Moroz V.V., Golubev A.M. Sepsis: principles of diagnosis. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2013; 9 (6): 5-10. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-6-5. [In Russ., In Engl.]
3. Tyurin I.N., Rautbart S.A., Kozlov I.A. Early characteristics of circulation in patients with poor outcome of abdominal sepsis (preliminary report). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2017; 13 (3): 13-24. DOI:10.15360/1813-9779-2017-3-13-24. [In Russ., In Engl.]
4. Khoroshilov S.E., Nikulin A.V. Detoxication in critical conditions: an insight into the scientific problem in the XXI century (review). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2017; 13 (5): 85-108. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-5-85-108. [In Russ., In Engl.]
5. Yarousovsky M., Abramyan M., Komardina E., Nazarova H. Blood purification in intensive care patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis after cardiac surgery. *Vessel Plus*. 2017; 1: 49-60. DOI: 10.20517/2574-1209.2017.11
6. Khoroshilov S.E., Marukhov A.V., Nikulin A.V. Plasmaferesis in enzymatic stage of severe acute pancreatitis: new look at the well tested method. *Medicine (Almaty)*. 2017; 4: 287-292.
7. Murugan R., Karajala-Subramanyam V., Lee M., Yende S., Kong L., Carter M., Angus D.C., Kellum J.A.; Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) investigators. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int*. 2010; 77 (6): 527-535. DOI: 10.1038/ki.2009.502. PMID: 20032961
8. Glodowski S.D., Wagener G. New insights into the mechanisms of acute kidney injury in the intensive care unit. *J. Clin. Anesth*. 2015; 27 (2): 175-180. DOI: 10.1016/j.jclinane.2014.09.011. PMID: 25480306
9. Ushakova N.D., Shevchenko A.N., Chetverikov M.V., Zlatnik E.Y., Zytkova T.A. Results of using selective endotoxin adsorption in cancer patients with sepsis. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2014; 10 (6): 32-38. DOI: 10.15360/1813-9779-2014-6-32-38. [In Russ., In Engl.]
10. Holthoff J.H., Wang Z., Seely K.A., Gokden N., Mayeux P.R. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney Int*. 2012; 81 (4): 370-378. DOI: 10.1038/ki.2011.347. PMID: 21975863
11. Legrand M., Dupuis C., Simon C., Gayat E., Mateo J., Lukaszewicz A.C., Payen D. Association between systemic hemodynamics and septic acute kidney injury in critically ill patients: a retrospective observational study. *Crit. Care*. 2013; 17 (6): R278. DOI: 10.1186/cc13133. PMID: 24289206
12. Boomer J.S., To K., Chang K.C., Takasu O., Osborne D.F., Walton A.H., Bricker T.L., Jarman S.D. 2nd, Kreisel D., Krupnick A.S., Srivastava A., Swanson P.E., Green J.M., Hotchkiss R.S. Immunosuppression in patients

- who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011; 306 (23): 2594–2605. DOI: 10.1001/jama.2011.1829. PMID: 22187279
13. Shimizu T., Miyake T., Tani M. History and current status of polymyxin B-immobilized fiber column for treatment of severe sepsis and septic shock. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 2017; 1 (2): 105–113. DOI: 10.1002/ags3.12015
 14. Lee C.T., Tu Y.K., Yeh Y.C., Chang T., Shih P.Y., Chao A., Huang H.H., Cheng Y.J., Yeh Y.C.; Behalf of the NTUH Center of Microcirculation Medical Research (NCMMR). Effects of polymyxin B hemoperfusion on hemodynamics and prognosis in septic shock patients. *J. Crit. Care*. 2018; 43: 202–206. DOI: 10.1016/j.jccr.2017.04.035. PMID: 28915395
 15. Aoike I. Clinical significance of protein adsorbable membranes – long-term clinical effects and analysis using a proteomic technique. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007; 22 (Suppl 5): v13–v19. DOI: 10.1093/ndt/gfm295. PMID: 17586841
 16. Nishida O., Nakamura T., Kuriyama N., Hara Y., Yumoto M., Shimomura Y., Morioka K. Sustained high-efficiency daily diafiltration using a mediator-adsorbing membrane (SHEDD-fA) in the treatment of patients with severe sepsis. *Contrib. Nephrol.* 2011; 173: 172–181. DOI: 10.1159/000329057. PMID: 21865790
 17. Nakada T.A., Oda S., Matsuda K., Sadahiro T., Nakamura M., Abe R., Hirasawa H. Continuous hemodiafiltration with PMMA Hemofilter in the treatment of patients with septic shock. *Mol. Med.* 2008; 14 (5-6): 257–263. DOI: 10.2119/2007-00108. Nakada. PMID: 18327291
 18. Nakamura M., Oda S., Sadahiro T., Hirayama Y., Watanabe E., Tateishi Y., Nakada T.A., Hirasawa H. Treatment of severe sepsis and septic shock by CHDF using a PMMA membrane hemofilter as a cytokine modulator. *Contrib. Nephrol.* 2010; 166: 73–82. DOI: 10.1159/000314855. PMID: 20472994
 19. Oshihara W., Fujieda H., Ueno Y. A new poly(methyl methacrylate) membrane dialyzer, NF with adsorptive and antithrombotic properties. *Contrib. Nephrol.* 2017; 189: 230–236. DOI: 10.1159/000450806. PMID: 27951573
 20. Cantaluppi V., Quercia A.D., Dellepiane S., Ferrario S., Camussi G., Biancone L. Interaction between systemic inflammation and renal tubular epithelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2014; 29 (11): 2004–2011. DOI: 10.1093/ndt/gfu046. PMID: 24589723
 21. Cho E., Lee J.H., Lim H.J., Oh S.W., Jo S.K., Cho W.Y., Kim H.K., Lee S.Y. Soluble CD25 is increased in patients with sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrology. (Carlton)*. 2014; 19 (6): 318–324. DOI: 10.1111/nep.12230. PMID: 24646167
 22. Yang R., Wang X., Liu D., Liu S. Energy and oxygen metabolism disorder during septic acute kidney injury. *Kidney Blood Press. Res.* 2014; 39 (4): 240–251. DOI: 10.1159/000355801. PMID: 25171106
 23. Goce I., Koch M., Renner P., Zeman F., Graf B.M., Dahlke M.H., Nerlich M., Schlitt H.J., Kellum J.A., Bein T. Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0120863. DOI: 10.1371/journal.pone.0120863. PMID: 25798585
 24. Ronco C., Ricci Z., De Backer D., Kellum J.A., Taccone F.S., Joannidis M., Pickkers P., Cantaluppi V., Turani F., Saudan P., Bellomo R., Joannes-Boyau O., Antonelli M., Payen D., Prowle J.R., Vincent J.L. Renal replacement therapy in acute kidney injury: controversy and consensus. *Crit. Care*. 2015; 19: 146. DOI: 10.1186/s13054-015-0850-8. PMID: 25887923
 25. Mariano F., Cantaluppi V., Stella M., Romanazzi G.M., Assenzio B., Cairo M., Bianco L., Triolo G., Ranieri V.M., Camussi G. Circulating plasma factors induce tubular and glomerular alterations in septic burns patients. *Crit. Care*. 2008; 12 (2): R42. DOI: 10.1186/cc6848. PMID: 18364044
 26. Dellepiane C., Marengo M., Cantaluppi V. Detrimental cross-talk between sepsis and acute kidney injury: new pathogenic mechanisms, early biomarkers and targeted therapies. *Crit. Care*. 2016; 20: 61. DOI: 10.1186/s13054-016-1219-3. PMID: 26976392
 27. Сидоренко Ю.С., Неродо Г.А., Меньшенина А.П., Голотина Л.Ю., Ушакова Н.Д. Опыт применения внутрибрюшинной химиотерапии с использованием асцитической жидкости в качестве растворителя химиопрепаратов в лечении рака яичников. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2009; 1: 6–12.
 28. Златник Е.Ю., Горюшинская И.А., Меньшенина А.П., Неродо Г.А., Голотина Л.Ю., Ушакова Н.Д., Никителова Е.А. Состав цитокинов асцитической жидкости и ее компонентов, полученных методом фильтрационной детоксикации, у больных раком яичников. *Рос. иммунол. журнал*. 2008; 2-3 (11): 316.
 29. Шихлярова А.И., Неродо Г.А., Меньшенина А.П., Куркина Т.А. Морфоструктура асцитической жидкости как критерий прогноза эффективности химиотерапии распространенного рака яичников. *Вопросы онкологии*. 2013; 59 (53): 810–811.
 30. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателей средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей. *Лаб. дело*. 1984; 3: 138–140. PMID: 6200672
 31. Матвеев С.Б., Спиридонова Т.Г., Клычкова Е.В., Николаева Н.Ю., Смирнов С.В., Голиков П.П. Критерии оценки эндогенной интоксикации при ожоговой травме. *Клини. лаб. диагностика*. 2003; 10: 3–6. PMID: 14663873
 32. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М.: Наука; 2001: 135.
 - Swanson P.E., Green J.M., Hotchkiss R.S. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011; 306 (23): 2594–2605. DOI: 10.1001/jama.2011.1829. PMID: 22187279
 13. Shimizu T., Miyake T., Tani M. History and current status of polymyxin B-immobilized fiber column for treatment of severe sepsis and septic shock. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 2017; 1 (2): 105–113. DOI: 10.1002/ags3.12015
 14. Lee C.T., Tu Y.K., Yeh Y.C., Chang T., Shih P.Y., Chao A., Huang H.H., Cheng Y.J., Yeh Y.C.; Behalf of the NTUH Center of Microcirculation Medical Research (NCMMR). Effects of polymyxin B hemoperfusion on hemodynamics and prognosis in septic shock patients. *J. Crit. Care*. 2018; 43: 202–206. DOI: 10.1016/j.jccr.2017.04.035. PMID: 28915395
 15. Aoike I. Clinical significance of protein adsorbable membranes – long-term clinical effects and analysis using a proteomic technique. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007; 22 (Suppl 5): v13–v19. DOI: 10.1093/ndt/gfm295. PMID: 17586841
 16. Nishida O., Nakamura T., Kuriyama N., Hara Y., Yumoto M., Shimomura Y., Morioka K. Sustained high-efficiency daily diafiltration using a mediator-adsorbing membrane (SHEDD-fA) in the treatment of patients with severe sepsis. *Contrib. Nephrol.* 2011; 173: 172–181. DOI: 10.1159/000329057. PMID: 21865790
 17. Nakada T.A., Oda S., Matsuda K., Sadahiro T., Nakamura M., Abe R., Hirasawa H. Continuous hemodiafiltration with PMMA Hemofilter in the treatment of patients with septic shock. *Mol. Med.* 2008; 14 (5-6): 257–263. DOI: 10.2119/2007-00108. Nakada. PMID: 18327291
 18. Nakamura M., Oda S., Sadahiro T., Hirayama Y., Watanabe E., Tateishi Y., Nakada T.A., Hirasawa H. Treatment of severe sepsis and septic shock by CHDF using a PMMA membrane hemofilter as a cytokine modulator. *Contrib. Nephrol.* 2010; 166: 73–82. DOI: 10.1159/000314855. PMID: 20472994
 19. Oshihara W., Fujieda H., Ueno Y. A new poly(methyl methacrylate) membrane dialyzer, NF with adsorptive and antithrombotic properties. *Contrib. Nephrol.* 2017; 189: 230–236. DOI: 10.1159/000450806. PMID: 27951573
 20. Cantaluppi V., Quercia A.D., Dellepiane S., Ferrario S., Camussi G., Biancone L. Interaction between systemic inflammation and renal tubular epithelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2014; 29 (11): 2004–2011. DOI: 10.1093/ndt/gfu046. PMID: 24589723
 21. Cho E., Lee J.H., Lim H.J., Oh S.W., Jo S.K., Cho W.Y., Kim H.K., Lee S.Y. Soluble CD25 is increased in patients with sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrology. (Carlton)*. 2014; 19 (6): 318–324. DOI: 10.1111/nep.12230. PMID: 24646167
 22. Yang R., Wang X., Liu D., Liu S. Energy and oxygen metabolism disorder during septic acute kidney injury. *Kidney Blood Press. Res.* 2014; 39 (4): 240–251. DOI: 10.1159/000355801. PMID: 25171106
 23. Goce I., Koch M., Renner P., Zeman F., Graf B.M., Dahlke M.H., Nerlich M., Schlitt H.J., Kellum J.A., Bein T. Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0120863. DOI: 10.1371/journal.pone.0120863. PMID: 25798585
 24. Ronco C., Ricci Z., De Backer D., Kellum J.A., Taccone F.S., Joannidis M., Pickkers P., Cantaluppi V., Turani F., Saudan P., Bellomo R., Joannes-Boyau O., Antonelli M., Payen D., Prowle J.R., Vincent J.L. Renal replacement therapy in acute kidney injury: controversy and consensus. *Crit. Care*. 2015; 19: 146. DOI: 10.1186/s13054-015-0850-8. PMID: 25887923
 25. Mariano F., Cantaluppi V., Stella M., Romanazzi G.M., Assenzio B., Cairo M., Bianco L., Triolo G., Ranieri V.M., Camussi G. Circulating plasma factors induce tubular and glomerular alterations in septic burns patients. *Crit. Care*. 2008; 12 (2): R42. DOI: 10.1186/cc6848. PMID: 18364044
 26. Dellepiane C., Marengo M., Cantaluppi V. Detrimental cross-talk between sepsis and acute kidney injury: new pathogenic mechanisms, early biomarkers and targeted therapies. *Crit. Care*. 2016; 20: 61. DOI: 10.1186/s13054-016-1219-3. PMID: 26976392
 27. Sidorenko Yu.S., Nerodo G.A., Menshenina A.P., Golotina L.Yu., Ushakova N.D. Experience in the use of intraperitoneal chemotherapy with ascitic fluid as a solvent for chemotherapy in the treatment of ovarian cancer. *Opukhli Zhenskoi Reprodukivnoi Sistemy*. 2009; 1: 6–12. [In Russ.]
 28. Zlatnik E.Yu., Goroshinskaya I.A., Menshenina A.P., Nerodo G.A., Golotina L.Yu., Ushakova N.D., Nikipelova E.A. The composition of cytokines of ascitic fluid and its components, obtained by filtration detoxification, in patients with ovarian cancer. *Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal*. 2008; 2-3 (11): 316. [In Russ.]
 29. Shikhlyarova A.I., Nerodo G.A., Menshenina A.P., Kurkina T.A. Mordan A.Yu. Morphostructure of ascitic fluid as a criterion for predicting the effectiveness of chemotherapy for advanced ovarian cancer. *Voprosy Onkologii*. 2013; 59 (53): 810–811. [In Russ.]
 30. Gabrielyan N.I., Lipatova V.I. Experience in the use of the median molecule index of blood to diagnose kidney diseases in children. *Laboratornoe Delo*. 1984; 3: 138–140. PMID: 6200672. [In Russ.]
 31. Matveyev S.B., Spiridonova T.G., Klychikova E.V., Nikolaeva N.Yu., Smirnov S.V., Golikov P.P. The evaluation criteria for endogenous intoxication in burn trauma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2003; 10: 3–6. PMID: 14663873. [In Russ.]
 32. Shabalin V.N., Shatokhina S.N. Morphology of human biological fluids. Moscow: Nauka; 2001: 135. [In Russ.]

Поступила 25.09.17

Received 25.09.17

Клозапин: механизмы токсичности и побочных эффектовА. С. Бабкина^{1,2}, А. М. Голубев^{1,2}, Д. В. Сундуков², А. Р. Баширова², М. А. Голубев³¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, ФНКЦ реаниматологии и реабилитации

Россия, 10703, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Российский университет дружбы народов

Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

³ Корпорация «Медицинские электронные данные»,
Россия, 107045, г. Москва, Сретенский тупик, д. 4**Clozapine: Mechanisms of Toxicity and Side Effects**Anastasiya S. Babkina^{1,2}, Arkady M. Golubev^{1,2}, Dmitry V. Sundukov²,
Asiya R. Bashirova², Mikhail A. Golubev³¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow
6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia³ Corporation «Medical electronic data»,
4 Sretensky tupik, Moscow 107045, Russia

Клозапин – атипичное антипсихотическое средство с доказанной эффективностью, которое широко используется в клинической практике. Однако, его применение сопряжено с высоким риском развития серьезных побочных эффектов. Угрожающие жизни состояния при приеме клозапина могут быть следствием идиосинкразии, острого отравления в результате непреднамеренной передозировки назначенного препарата, суицидального поведения, криминальных действий. В обзоре представили современные данные о механизмах терапевтического и токсического действия клозапина. Описали воздействие клозапина на клеточные рецепторы и ультраклеточные структуры. Рассмотрели роль основных и промежуточных метаболитов данного лекарственного средства в развитии токсических эффектов.

Ключевые слова: клозапин; лекарственный метаболизм; острые отравления; кардиотоксичность; агранулоцитоз; клозапин-индуцированный миокардит

Clozapine is an atypical antipsychotic agent with a confirmed effectiveness which is widely used in the clinical practice. However, its administration is associated with a high risk of serious adverse events. Life-threatening conditions related to administration of clozapine may be a result of idiosyncrasy, acute poisoning resulting from unintentional overdose of the prescribed drug, suicidal behavior, and criminal actions. The review presents current data on the mechanism of therapeutic and toxic effect of clozapine. It describes the effect of clozapine on cell receptors and ultracellular structures. It dwells on the contribution of major and intermediate metabolites of this medicinal agent to the development of toxic effects.

Keywords: clozapine, drug metabolism, acute poisoning, cardiotoxicity, agranulocytosis, clozapine-induced myocarditis

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-35-45

Введение

Клозапин — высокоэффективный атипичный нейролептик, который широко применяется в клинической практике. Клозапин практически не вызывает экстрапирамидные нарушения, улучшает состояние больных шизоаффективными расстройствами, резистентными формами шизофрении, что значительно увеличивает группу пациентов, которым он может быть назначен [1–3].

Introduction

Clozapine is a highly effective atypical antipsychotic drug which is widely used in the clinical practice. Clozapine practically does not cause extrapyramidal disorders; it improves the state of patients with schizoaffective disorders and resistant types of schizophrenia, thus increasing the group of patients to whom it may be prescribed [1–3].

Адрес для корреспонденции:Аркадий Голубев
E-mail: arkadygolubev@mail.ru**Correspondence to:**Arkady Golubev
E-mail: arkadygolubev@mail.ru

В то же время, такие особенности препарата, как дозозависимый эффект и низкий терапевтический индекс, сильное холиноблокирующее, периферическое альфа-адренолитическое действие обуславливают высокий риск возникновения опасных для жизни состояний при его применении. Острое отравление клозапином, как правило, сопряжено с высоким риском летального исхода, может быть результатом непреднамеренной передозировки препарата, идиосинкразии, суицидального поведения. Выраженный и быстрый седативный эффект объясняет высокую частоту случаев использования данного лекарственного средства в криминальных целях [4–6].

Патогенез острых отравлений клозапином изучен недостаточно [7, 8]. Следовательно, не до конца понятен танатогенез фатальных отравлений, что существенно снижает качество судебно-медицинской диагностики, которая в настоящее время основывается только на результатах судебно-химического исследования.

Для выяснения пато- и танатогенеза острых отравлений клозапином целесообразно тщательное изучение его цитогенетических и молекулярных механизмов действия.

На сегодняшний момент данные исследований, подробно раскрывающих терапевтические и токсические эффекты клозапина, разрознены. Возникает необходимость систематизировать имеющуюся на настоящий момент информацию, что позволит сформировать более ясное представление о пато- и танатогенезе острых отравлений клозапином.

История введения клозапина в клиническую практику

Клозапин был синтезирован в 1959 году швейцарской фармакологической компанией Wander [9–12]. Путь от разработки лекарственного средства до начала использования в клинической практике был длительным и сложным. Так как в то время эффективность антипсихотических препаратов проверялась способностью вызывать катаlepsию у крыс, существовало представление о том, что антипсихотическое действие обязательно сопровождается экстрапирамидными нарушениями [10–12]. При исследовании клозапина на доклиническом этапе была доказана его эффективность при отсутствии экстрапирамидной симптоматики, что было нетипично для антипсихотических лекарственных средств того времени. По этой причине клозапину было дано определение атипичного нейролептика [9, 11]. В течение 13 лет проводились исследования препарата, в ходе которых была доказана его эффективность. Впервые он появился под торговым названием «Leponex» в Швейцарии и Австрии в 1972 году. Изначально препарат не пользовался большой

Several features of the drug that include At the same time, the characteristics of the drug as a dose-dependent effect, and a low therapeutic index, as well as a potent anticholinergic peripheral alpha-adrenolytic activity explain a the high risk of life-threatening conditions due to following its administration. Acute clozapine poisoning usually related to a high risk of a lethal outcome may be a result of an unintentional drug overdose, idiosyncrasia, and suicidal behaviour. A pronounced and rapid sedative effect explains the high frequency of the use of this drug for criminal purposes [4–6].

The pathogenesis of acute clozapine poisoning has been studied insufficiently [7, 8]. Therefore, the tanatogenesis of fatal poisoning is not completely clear; it significantly reduces the quality of forensic diagnostics which is currently based only on the results of forensic chemical research.

To clarify the pathogenesis and tanatogenesis of acute poisoning with clozapine, a thorough study of its cytogenetic and molecular mechanisms of action is expedient.

At present, data from studies that reveal in detail the therapeutic and toxic effects of clozapine are disembodied. There is a need to systematize the currently available information that will ensure a more clear understanding of pathogenesis and tanatogenesis of acute poisoning with clozapine.

The history of the introduction of clozapine into clinical practice

Clozapine was synthesized by a Swiss pharmacological company Wander in 1959 [9–12]. The way from the development of the drug to the beginning of its use in clinical practice was long and difficult. Since at that time the efficacy of antipsychotic drugs was tested by the ability to cause catalepsy in rats, there was an idea that an antipsychotic action is necessarily accompanied by extrapyramidal disorders [10–12]. In the study of clozapine at the preclinical stage, its effectiveness was confirmed in the absence of extrapyramidal symptoms, which was atypical for antipsychotic drugs of that time. For this reason, clozapine was defined as an atypical antipsychotic drug [9, 11]. The drug has been studied for 13 years; these studies have confirmed its efficacy. It appeared under the trade name «Leponex» in Switzerland and Austria for the first time in 1972. Initially, the drug was not very popular in clinical practice, as preference was given to the first typical antipsychotic drug chlorpromazine used since 1954. [9–11]

In 1975, The Lancet journal published a letter from Finnish scientists reporting eighteen cases of agranulocytosis, nine of which were fatal, among patients taking clozapine [11]. Taking into account this information, clozapine was withdrawn from sale in a number of European countries, with the exception of Switzerland and the USSR [9].

популярностью в клинической практике, так как предпочтение отдавалось первому типичному антипсихотику хлорпромазину, используемому с 1954 года [9–11].

В 1975 в журнале *The Lancet* было опубликовано письмо ученых из Финляндии, в которой сообщалось о восемнадцати случаях агранулоцитоза, девять из которых были смертельны, среди пациентов, принимающих клозапин [11]. В связи с данной информацией, клозапин был изъят из продажи в ряде европейских стран, за исключением Швейцарии и СССР [9].

Нарастающая проблема тяжелых экстрапирамидных нарушений при применении различных представителей типичных нейролептиков в клинической практике, вновь возродила интерес к клозапину [11].

В 1988 г. J. Kane и коллективом ведущих психиатров в США было проведено двойное слепое мультицентровое исследование эффективности терапии хлорпромазином и клозапином на 286 пациентах, не отвечавших на лечение галоперидолом в течение 6 недель. В результате у 30% пациентов, получавших клозапин было отмечено улучшение состояния, в то время как на хлорпромазин отреагировало лишь 4 % исследуемых [13].

В 90-х годах H.Y. Meltzer и соавт. провели ряд исследований в ходе которых было доказано снижение частоты суицидов, улучшение качества жизни больных шизофренией при применении клозапина [10, 11, 14].

Позже были доказаны преимущества клозапина по сравнению с другими атипичными нейролептиками в ходе двух исследований: *Clinical antipsychotic Trials for Intervention Effectiveness (CATIE)* и *Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drug in Schizophrenia Study (CUtLASS 2)* [11].

С 1990 года клозапин стал широко использоваться в США, странах Европы. С целью снижения риска развития агранулоцитоза, во всех странах мира обязательным стало динамическое исследование показателей крови пациентов, получающих клозапин [1, 9–11].

За многолетний опыт применения клозапина в клинической практике был зарегистрирован ряд побочных эффектов, таких как миокардит, кардиомиопатия, тромбообразование, ортостатическая гипотензия, кишечная непроходимость, метаболические нарушения [5, 6, 15–29].

В настоящее время клозапин активно используется в психиатрической практике наряду с другими, более новыми антипсихотиками. Несмотря на эффективность, клозапин не является препаратом первой линии при шизофрении, а используется, согласно большинству рекомендаций, после неадекватного ответа по крайней мере на два антипсихотических средства [1, 9, 10, 30].

The growing problem of severe extrapyramidal disorders after administration of various typical antipsychotics in clinical practice has revived interest in clozapine [11].

In 1988, J. Kane and a team of leading psychiatrists in the United States conducted a double-blind, multicenter study of the effectiveness of chlorpromazine and clozapine therapy in 286 patients who did not respond to treatment with haloperidol for 6 weeks. As a result, 30% of patients receiving clozapine had an improvement, while only 4% of the examined patients responded to chlorpromazine [13].

In the 1990s, H. Y. Meltzer et al. conducted a number of studies, in which the reduced frequency of suicides and improved quality of life of patients with schizophrenia using clozapine were confirmed [10, 11, 14].

Later, the benefits of clozapine compared to other atypical antipsychotics were proven in two studies: *Clinical antipsychotic Trials for Intervention Effectiveness (CATIE)* and *Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drug in Schizophrenia Study (CUtLASS 2)* [11].

Since 1990, clozapine has been widely used in the USA, Europe. In order to reduce the risk of agranulocytosis, in all countries all over the world, follow-up blood count tests of patients receiving clozapine became mandatory [1, 9–11].

Over the years of experience in the use of clozapine, a number of side effects, such as myocarditis, cardiomyopathy, thrombosis, orthostatic hypotension, intestinal obstruction, metabolic disorders has have been registered in clinical practice [5, 6, 15–29].

Currently, clozapine is widely used in psychiatric practice along with other, newer antipsychotics. Despite its efficacy, clozapine is not a first-line drug for schizophrenia, but is used, according to most recommendations, after an inadequate response to at least two antipsychotics [1, 9, 10, 30].

Mechanisms of the antipsychotic activity

Clozapine has a wide range of effects on receptors responsible not only for the effectiveness of the drug, but also for its side effects.

The antipsychotic efficacy is ensured by a high affinity to D₄ – receptors, and the minimum risk of extrapyramidal symptoms is due to by the ability to occupy D₂ – receptors for a short time and dissociate quickly, without disturbing the normal neurotransmission of dopamine [31, 32].

The effect on 5-(NT)₃ receptors, which according to modern concepts are the interface between the motor and limbic structures of the brain, explains the pronounced anxiolytic effect [31, 33]. As an agonist of 5-(NT)_{2A} receptors located in the central nervous system, clozapine contributes to the regression of psychotic symptoms, and its effect on 5-(NT)_{2A} platelet receptors, smooth muscle cells of blood vessels, lungs, and gastrointestinal tract, may be one of the factors

Механизмы антипсихотической активности

Клозапин обладает широким спектром действия на рецепторы, что обуславливает не только эффективность препарата, но и его побочные эффекты.

Антипсихотическая эффективность обеспечивается высоким аффинитетом к D4-рецепторам, а минимальный риск возникновения экстрапирамидной симптоматики — способностью лишь на короткое время занимать D2-рецепторы и быстро диссоциироваться, не нарушая нормальную нейротрансмиссию дофамина [31, 32].

Воздействием на 5-(HT)3 рецепторы, которые, согласно современным представлениям, являются интерфейсом между моторной и лимбическими структурами мозга, объясняется выраженный анксиолитический эффект [31, 33]. Являясь агонистом 5-(HT)2A рецепторов, находящихся в ЦНС, клозапин способствует регрессу психотических симптомов, а его влияние на 5-(HT)2A рецепторы тромбоцитов, гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, легких, ЖКТ, может оказаться одним из факторов тромбообразования, развития гипертонии, мигрени, гипокинезии желудка [34, 35].

Взаимодействием клозапина с гистаминовыми рецепторами некоторые исследователи объясняют атипичную антипсихотическую активность, а также его побочные эффекты, такие как седация и увеличение веса [36].

Являясь мощным антагонистом мускариновых холинорецепторов, клозапин способен вызывать тахикардию, вследствие блокирования эффектов блуждающего нерва, снижать перистальтику кишечника вплоть до развития непроходимости. Холинолитическое действие, по мнению большинства исследователей, является центральным механизмом отравлений [2, 4, 37, 38].

Эпигенетические аспекты антипсихотического действия клозапина

В лаборатории Е. Costa (1996–2009 г.), в ходе анализа посмертных образцов головного мозга пациентов с шизофренией и биполярным психозом, были получены данные, которые позволили сформулировать новую гипотезу об эпигенетическом механизме патогенеза шизофрении. Во всех образцах было обнаружено снижение экспрессии релина (REELIN) и глутаматдекарбоксилазы-67 (GAD 67) вследствие гиперметилирования их промоторов. В 2008 году Е. Dong и соавт. было исследовано действие клозапина на гиперметилированные участки ДНК нейронов фронтальной коры. Было установлено, что клозапин и сульпирид, но не галоперидол активируют деметилирование ДНК, что способствует нормализации секреции гамма-аминомасляной кислоты в ЦНС, чем

causing thrombosis, hypertension, migraine, and gastric hypokinesia [34, 35].

Some researchers Several studies explain atypical antipsychotic activity, as well as its side effects, such as sedation and weight gain, by interaction of clozapine with histamine receptors [36].

Being a powerful antagonist of muscarinic cholinoreceptors, clozapine can cause tachycardia, due to blocking the effects of the vagus nerve and reduce reducing the intestinal peristalsis up to complete obstruction. The cholinolytic effect, according to most researchers publications, is represents the central mechanism of poisoning [2, 4, 37, 38].

Epigenetic aspects of the antipsychotic activity of clozapine

In E. Costa's laboratory (During studies in 1996–2009 in E. Costa's laboratory), as a result a significant of an analysis of postmortem brain samples of patients with schizophrenia and bipolar psychosis was performed. The accumulated data were obtained that allowed to formulate suggest a new hypothesis about on the epigenetic pathogenetic mechanisms of schizophrenia. In all samples, Aa decreased reelin (REELIN) and glutamate decarboxylase-67 (GAD67) expression as a result of hypermethylation of their promoters was found in all samples of postmortem brain specimens studied. In 2008, E. Dong and et al. investigated the effect of clozapine on hypermethylated DNA segments of neurons of the frontal cortex. It was has been found that clozapine and sulpiride, but not haloperidol, activate DNA demethylation, which contributes to the normalization of secretion of gamma-aminobutyric acid in the central nervous system. Findings, which explains the positive response of most patients to clozapine therapy [39, 40].

Characteristics of the clozapine metabolism

Clozapine is metabolized mainly in the liver. While undergoing N-oxidation and N-demethylation, clozapine is biotransformed to desmethylclozapine (norclozapine) and clozapine-N-oxide, which are its representing main Clozapine metabolites and that almost do not differ from it in their pharmacological properties activities. P450 cytochrome isoenzyme (CYP1A2A) plays a major role in the metabolism. The following isoenzymes CYP2D6, CYP 3A4, CYP2C19 are also involved in metabolism of the drug, however, to a lesser extent: CYP2D6, CYP 3A4, CYP2C19. It has been studied that cClozapine-N-oxide is formed mainly under the action of CYP3A4 and flavine-containing monooxygenase, while whereas desmethylclozapine (norclozapine) is formed under the effect action of CYP3A4 and CYP1A2 [41, 42]. It has been proved that in addition to the liver, the biotransformation of clozapine into clozapine-N-oxide occurs in the brain under the action of flavine-containing monooxygenase [43–45].

и объясняется положительный ответ большинства пациентов на терапию клозапином [39, 40].

Особенности метаболизма клозапина

Метаболизм клозапина происходит, главным образом, в печени. Подвергаясь процессам N-окисления и N-деметилирования, клозапин биотрансформируется в десметилклозапин (норклозапин) и клозапин-N-оксид, которые являются основными его метаболитами и мало отличаются от него по своим фармакологическим свойствам. Основную роль в метаболизме играет изофермент цитохрома р450 — CYP1A2. В меньшей степени участвуют изоферменты: CYP2D6, CYP 3A4, CYP2C19. Исследовано, что клозапин-N-оксид образуется преимущественно под действием CYP3A4 и флавинодерживающей монооксигеназы, а десметилклозапин (норклозапин) — под CYP3A4 и CYP1A2 [41, 42]. Было доказано, что помимо печени биотрансформация клозапина в клозапин-N-оксид происходит в мозге под действием флавинодерживающей монооксигеназы [53–45].

Также известны неактивные метаболиты, такие как гидрокси- и метилтиопроизводные, глюкурониды. При значительном превышении пороговых концентраций в крови биотрансформация замедляется на уровне перехода активных метаболитов в неактивные, что способствует увеличению длительности токсичных проявлений [37].

Особенностью метаболизма клозапина, во многом объясняющей механизмы его токсического действия, является наличие промежуточных реактивных метаболитов. Впервые их образование в результате окисления клозапина миелопероксидазой было выявлено в нейтрофилах и их предшественниках [46].

Современные исследования, проведенные *in vitro* показали, что промежуточные реактивные метаболиты способны образовываться непосредственно под воздействием клозапина в микросомах печени при участии CYP3A4 и CYP2D6 и в миокарде [47].

Метаболизм клозапина подвержен широким индивидуальным колебаниям [48]. Скорость элиминации и другие показатели, влияющие на сынроточную концентрацию, согласно клиническим и экспериментальным исследованиям, во многом зависит от пола, возраста, наличия сопутствующих заболеваний [42]. Доказано, что курение снижает токсические эффекты клозапина из-за индукции CYP1A2, а кофеин и пропранолол, наоборот повышает, что объясняется конкурентным ингибированием CYP1A2 [43–45, 48].

Единственным генным полиморфизмом, связанным с концентрацией клозапина в крови, является ген ABCB1, который кодирует трансмембранный Р-гликопротеин, находящийся в слизистой оболочке кишечника, почках, сосудах гематоэнцефалического барьера [49].

Inactive metabolites such as hydroxy derivatives and methylthioderivatives, as well as glucuronides are also known have been recognized. In the case of a significant excess of a blood concentration threshold of the drug, blood concentrations, the biotransformation slows down at the level of transition of active metabolites into inactive ones, thus contributing to an increase in the increased duration of toxic manifestations [37].

The peculiarity of clozapine metabolism, which largely explains the mechanisms of its toxic effect, is the presence of intermediate reactive metabolites. For the first time, their formation as a result of oxidation of clozapine by myeloperoxidase was found in neutrophils and their predecessors precursors [46].

Modern studies conducted *in vitro* have shown that intermediate reactive metabolites can be formed in liver microsomes directly under the influence of clozapine in liver microsomes with the involvement of metabolized by cytochrome P450 CYP3A4 and CYP2D6, and in the myocardium [47].

Clozapine metabolism is a subject to of wide significant individual fluctuations variations [28]. According to clinical and experimental studies, elimination rates and other indicators parameters affecting serum concentrations largely depend on sex, age, and the presence of comorbidities [42]. It has been confirmed that smoking reduces the toxic effects of clozapine due to induction of CYP1A2, and whereas caffeine and propranolol, on the contrary, increase them clozapine toxicity due to competitive inhibition of CYP1A2 [43–45, 48].

The only gene polymorphism associated with the blood concentration of clozapine is the AVSV1 gene, which encodes transmembrane pP-glycoprotein located in the intestinal mucosa, kidneys, and blood vessels of the blood-brain barrier [49].

Mechanisms of the development of some life-threatening medical conditions due to administration of clozapine

Life-threatening conditions may result from an overdose of clozapine, as well as after because of administration of therapeutic doses.

Malignant neuroleptic syndrome (ICD-10 code: G21.0).

Malignant neuroleptic syndrome (MNS) is characterized by hyperthermia in the absence of infections, muscle rigidity, vegetative dysfunction, and changes in mental status. MNS is a rare complication that occurred at their response to administration of therapeutic doses of clozapine [50, 51]. However, it is MNS represents a distinctive feature of a clinical presentation of acute clozapine poisoning [4]. The pathogenesis of the neuroleptic syndrome MNS is not completely clear. It was suggested that the blockade of dopamine D2 receptors in nigrostriatal pathway, mesocortical

Механизмы возникновения некоторых угрожающих жизни состояний при применении клозапина

Угрожающие жизни состояния могут возникнуть в результате передозировки клозапина, а также развиваться на фоне приема терапевтических доз.

Злокачественный нейролептический синдром (код по МКБ-10 – G21.0).

Злокачественный нейролептический синдром, характеризующийся гипертермией при отсутствии инфекций, мышечной ригидностью, вегетативной дисфункцией, изменением психического статуса, — редкое осложнение при приеме терапевтических доз клозапина [50, 51]. Однако, он является отличительной особенностью клинических признаков острых отравлений клозапином [4]. Патогенез нейролептического синдрома до конца не выяснен. Было высказано предположение о том, что ключевым звеном патогенеза является блокада допаминовых D2-рецепторов в нигростриаторном тракте, мезокортикальном пути и ядрах гипоталамуса. Исходя из данного представления, атипичные нейролептики, в частности клозапин, связывающийся менее чем с 75% D2-рецепторов, не могут быть причиной нейролептического синдрома. Немалое количество зарегистрированных случаев развития нейролептического синдрома, связанных с приемом атипичных нейролептиков, заставило пересмотреть теорию его патогенеза. В настоящее время существуют гипотезы о серотонинергических и норадренергических механизмах нейролептического синдрома, что позволяет объяснить его возникновение при приеме клозапина [5, 51].

Согласно исследованию E. Elmorsy и соавт. неблагоприятные побочные эффекты со стороны ЦНС при приеме клозапина, в том числе и нейролептический синдром, возникают в результате находящегося в зависимости от времени и концентрации нарушения биоэнергетического статуса эндотелиальных клеток капилляров гемато-энцефалического барьера. Было показано, что клозапин ингибирует активность I и III митохондриальных комплексов [52].

Агранулоцитоз.

Существует ряд гипотез о механизме развития агранулоцитоза, индуцированного клозапином. Большая роль отводится промежуточным активным метаболитам, которые образуются непосредственно нейтрофилами периферической крови и их предшественниками в костном мозге. Было доказано, что реактивный метаболит ковалентно связывается с белками нейтрофилов. До настоящего времени не ясно, является повреждение нейтрофилов непосредственным или иммунно-опосредованным [46, 53].

Ряд исследований продемонстрировали связь агранулоцитоза с определенными гаплотипами комплекса гистосовместимости (HLA-B38, DR4, DQw3,

pathway and the nuclei of the hypothalamus is the key link to of the MNS pathogenesis. Based on this concept, atypical antipsychotics, in particularly, clozapine, which bindings to less than 75% of D2-receptors, can not be the main cause of the neuroleptic syndrome. A considerable number of reported cases of the neuroleptic syndrome MNS associated with atypical antipsychotics forced researchers to reconsider the theory of its pathogenesis.

Currently, there are hypotheses about based on serotonergic and noradrenergic mechanisms of the neuroleptic syndrome MNS which that can explain its development after the administration of clozapine [50, 51].

According to a study by E. Elmorsy and et al., the adverse side effects affecting the central nervous system (CNS) after administration of clozapine, including the neuroleptic syndrome MNS, occur as a result of impairment of the bioenergy status of endothelial cells of the blood-brain barrier capillaries depending on the dose and timetime and its concentration parameters. It was shown that clozapine inhibits the activity of the mitochondrial complexes I and III mitochondrial complexes [52].

Agranulocytosis.

There is a number of hypotheses about on the mechanism of agranulocytosis induced by clozapine. Intermediate active metabolites which are formed directly in peripheral blood neutrophils and by their predecessors in the bone marrow are of a primary importance. It has been proven that the reactive metabolites covalently binds to neutrophil proteins. However, it has had not been clear clarified to date whether it is occurred due to a direct damage of neutrophils or because of immune-mediated damage of neutrophils [46, 53].

A number of studies have demonstrated a relationship between agranulocytosis and certain haplotypes of the histocompatibility complex (HLA-B38, DR4, DQw3, DQB1), which confirms the hypothesis of the immuno-mediated mechanism. Genetic susceptibility to clozapine-induced agranulocytosis was found in a case of (a change of one amino acid in HLA-DQB1 (126Q) or HLA – B (158T) antigens due to mutant loci [54].

Cardiotoxic effect.

The cardiotoxic action of clozapine is its represents the most serious side effect. Numerous studies have proved the connection between clozapine intake and increased risk of myocarditis, cardiomyopathy, pericarditis, heart failure, and a sudden cardiac death [16, 26, 27, 55–61]. By 2010, the manufacturer of the drug registered 213 cases of myocarditis, including 50 deaths, and 178 international reports on clozapine-induced cardiomyopathy [62, 63].

Data on There are multiple data on the risk of a sudden cardiac death contain many long-term studies associated with clodipine intake [55–57]. For example, Modai and et al. concluded onfound a fourfold increased in the risk of a sudden cardiac death in patients taking clozapine [64]. The analysis of sudden

DQB1), что подтверждает гипотезу о иммуно-опосредованном механизме. Выявлена генетическая восприимчивость к индуцированному клозапином агранулоцитозу (изменение одной аминокислоты в HLA-DQB1 (126Q) HLA – В (158T) [54].

Кардиотоксическое действие.

Кардиотоксическое действие клозапина является наиболее серьезным его побочным эффектом. Многочисленными исследованиями доказана связь между приемом клозапина и повышением риска развития миокардитов, кардиомиопатий, перикардитов, сердечной недостаточности, внезапной сердечной смерти [16, 26, 27, 55–61]. К 2010 году производителем препарата было зарегистрировано 213 случаев миокардита, включая 50 смертельных случаев, 178 международных докладов о клозапин-индуцированной кардиомиопатии [62, 63].

Имеются многочисленные данные о риске внезапной сердечной смерти, ассоциированном с приемом клозапина [55–57]. Так, например, Modai и соавт. пришли к выводу о четырехкратном увеличении риска внезапной сердечной смерти у пациентов, принимающих клозапин [64]. В результате анализа случаев внезапной сердечной смерти было отмечено преобладание пациентов молодого возраста без сопутствующих заболеваний [59].

Исследование, проведенное в Австралии А.А. Khan и соавт. с 2009 по 2015 год показало, что случаи миокардита и внезапной сердечной смерти у 503 пациентов составили 3% и 2% соответственно [15].

Патогенез кардиотоксичности до настоящего времени не ясен. Отмечено повышение тропонина, КФК-МВ, интерлейкинов, фактора некроза опухоли альфа, цитокинов при применении клозапина в высоких дозах [5, 6, 65, 66]. В. А. Al-Wahab и соавт. в экспериментальном исследовании было выявлено повышение уровней катехоламинов, норадреналина и эпинефрина в плазме у мышей, получавших клозапин [5]. Из этого следует, что кардиологические побочные эффекты могут быть связаны с повреждением кардиомиоцитов вследствие накопления в них адреналина, а также с нарушением перфузии миокарда в результате длительной констрикции венечных сосудов в сочетании с тахикардией, которая отмечается у 25% пациентов, принимающих клозапин [61, 67–70].

Многие исследователи считают главным патогенетическим звеном кардиотоксических эффектов повреждающее действие реактивных метаболитов клозапина [71]. Было установлено, что клозапин подвергается биоактивации в ткани миокарда до образования химически активного метаболита – нитрения [47]. Метаболит связывается с белками в миокарде, что приводит к образованию антигенного комплекса, который стимулирует иммунный ответ и макрофаги, за этим следует высвобождение цитокинов, которые опосредуют клеточную инфильтрацию и миокардит [71].

cardiac death cases demonstrated the predominance of young patients without comorbidities [59].

A study conducted in Australia by A. A. Khan et al. from 2009 to 2015 showed that cases of myocarditis and a sudden cardiac death in 503 patients amounted to occurred in 3% and 2% of all cases, respectively [15].

The pathogenesis of cardiotoxicity is still not clear. There was an increase in troponin, CPK-MB, interleukins, tumor necrosis factor alpha, and cytokines concentrations due to when clozapine was administered at high doses [5, 6, 65, 66]. In an experimental study, B.A. Al-Wahab et al. demonstrated an increase in plasma levels of catecholamines, norepinephrine and epinephrine in mice receiving clozapine [25]. Therefore, cardiac side effects may be associated with a damage of cardiomyocytes due to the accumulation of adrenaline in them, as well as with impaired myocardial perfusion as a result of a prolonged constriction of the coronary vessels in combination with tachycardia, which is observed in 25% of patients taking clozapine [61, 67–70].

Many Various researchers consider a damaging effect of clozapine reactive metabolites as the main pathogenetic factor of the cardiotoxic effects [71]. It was found that clozapine is bioactivated in the myocardial tissue to chemically active nitrenium ion metabolite [47]. The metabolite binds with to proteins in the myocardium leading to the formation of an antigenic complex which stimulates the immune response and macrophages, followed by the release of cytokines, which mediate cellular infiltration and myocarditis [71].

Arrhythmogenic side effects of clozapine were noted. The long QT prolongation syndrome (ICD-10 code: I49.8), which is a predictor of a ventricular tachycardia of the «pirouette» type of torsade de pointes is the most common disorder. In about one of ten cases, torsade de pointes the latter leads to death [17–20, 73, 74]. The mechanism of the long QT prolongation syndrome related to the clozapine intake is associated with the blockade of repolarization of IKr potassium voltage-gated channel subfamily H member 2 channels encoded by a human KCNH₂ (or HERG, «ether-a-go-go-related related» (HERG) gene [31].

Thromboembolic complications.

The database of the International Centre for Adverse Drug Reactions Monitoring of the World Health Organization (WHO) provides information about 754 cases of venous thromboembolism in patients receiving clozapine [75]. A number of studies have revealed a high probability of thromboembolic complications of administration of second – generation antipsychotic drugs [21–24]. From 1990 to 1999, the Food and Drug Administration (USA) had received 99 reports on thromboembolic complications [76].

The pathogenesis of these complications is a multi-factorial one. A number of studies demonstrated that changes in 5HT_{2A}-receptors of platelets may mediate atherogenic and prothrombotic mechanisms [75].

Отмечены аритмогенные побочные эффекты клозапина. Наиболее частым нарушением является синдром удлинения Q–T (код по МКБ-10 – I49.8), который является предиктором желудочковой пируэт-тахикардии. Примерно в одном из десяти случаев пируэт-тахикардия приводит к смерти [17–20, 73, 74]. Механизм синдрома удлинения Q – T при приеме клозапина связывают с блокадой реполяризации калиевых каналов IKr, кодируемых геном *KCNH2* (HERG) [20].

Тромбоэмболические осложнения.

В базе международного центра контроля побочного действия лекарств Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) содержатся сведения о 754 случаях венозной тромбоэмболии у больных, получавших клозапин [75]. В ряде исследований была выявлена высокая вероятность тромбоэмболических осложнений при приеме антипсихотических препаратов второго поколения [21–24]. С 1990 по 1999 годы управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, USA) было получено 99 сообщений о тромбоэмболических осложнениях [76].

Патогенез данных осложнений — многофакторный. В ряде исследований показано, что опосредовать атерогенные и протромботические механизмы могут изменения в 5HT2A-рецепторном аппарате тромбоцитов [75].

В результате исследования S. Axelsson и соавт. было установлено, что под действием клозапина на кровь *in vitro* увеличивается адгезия и агрегация тромбоцитов, уменьшаются значения активированного частичного тромбопластинового времени – АЧТВ [25].

В исследовании М. В. Беловой и соавт. было показано, что при острых отравления психотропными средствами, в том числе и клозапином, наблюдался дисбаланс между перекисным окислением липидов и антиоксидантной системой, что сопровождалось увеличением вязкости крови и повышением агрегационных

As a result of the study of S. Axelsson et al. it was found demonstrated that under the action of clozapine on blood, the *in vitro* platelet adhesion and aggregation increased *in vitro* and whereas APPT the values of activated partial thromboplastin time are reduced [25].

A study of M. V. Belova et al. demonstrated that in acute poisoning with psychopharmacological agents, including clozapine, there was an imbalance between lipid peroxidation and the antioxidant system, which was accompanied by an increase in blood viscosity and an increase in the aggregation properties of red blood cells and platelets due to membrane damage to their membranes [77].

Conclusion

Clozapine remains a popular psychopharmacological agent in clinical practice, despite the side effects that pose a threat to life. Numerous studies do not allow to come to a consensus on the mechanisms of its toxic effects. A detailed study of the cytogenetic cellular, genetic and molecular aspects of clozapine action will allow to disclose most fully the pathogenesis of life-threatening conditions due to its administration clozapine administration.

свойств эритроцитов и тромбоцитов в следствие повреждения их мембран [77].

Заклучение

Клозапин остается популярным психофармакологическим средством в клинической практике, несмотря на побочные эффекты, представляющие угрозу для жизни. Многочисленные исследования не позволяют прийти к единому мнению о механизмах его токсического действия. Подробное изучение клеточных, генетических и молекулярных аспектов действия клозапина позволит наиболее полно раскрыть патогенез опасных для жизни состояний при его применении.

Литература

1. Тоцилов В.А., Кушнир О.Н. Клозапин – препарат выбора для лечения больных с острыми психозами. *Социальная и клин. психиатрия*. 2011; 21 (2): 37–42.
2. Campbell M., Young P.I., Bateman D.N., Smith J.M., Thomas S.H. The use of atypical antipsychotics in the management of schizophrenia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1999; 47 (1): 13–22. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1999.00849.x. PMID: 10073734
3. Green A., Tohen M., Patel J.K., Banov M., DuRand C., Berman I., Chang H., Zarate C., Posener J., Lee H., Dawson R., Richards C., Cole J.O., Schatzberg A.F. Clozapine in the treatment of refractory psychotic mania. *Am. J. Psychiatry*. 2000; 157 (6): 982–986. DOI: 10.1176/appi.ajp.157.6.982. PMID: 10831480
4. Szota A., Ogłodek E., Araszkiewicz A. Fever development in neuroleptic malignant syndrome during treatment with olanzapine and clozapine. *Pharmacol. Rep.* 2013; 65 (2): 279–287. DOI: 10.1016/S1734-1140(13)71004-1. PMID: 23744413
5. Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity: role of oxidative stress, tumour necrosis factor alpha and NF-κB. *Cardiovasc. Toxicol.* 2015; 15 (4): 355–365. DOI: 10.1007/s12012-014-9304-9. PMID: 25539628
6. Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity in rats: involvement of tumour necrosis factor alpha, NF-κB and caspase-3. *Toxicol. Rep.* 2014; 1: 1213–1223. DOI: 10.1016/j.toxrep.2014.11.012. PMID: 28962331

References

1. Tochilov V.A., Kushnir O.N. Clozapine as a first-choice medication in the treatment of patients with acute psychoses. *Sotsialnaya i Klinicheskaya Psikiatriya*. 2011; 21 (2): 37–42. [In Russ.]
2. Campbell M., Young P.I., Bateman D.N., Smith J.M., Thomas S.H. The use of atypical antipsychotics in the management of schizophrenia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1999; 47 (1): 13–22. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1999.00849.x. PMID: 10073734
3. Green A., Tohen M., Patel J.K., Banov M., DuRand C., Berman I., Chang H., Zarate C., Posener J., Lee H., Dawson R., Richards C., Cole J.O., Schatzberg A.F. Clozapine in the treatment of refractory psychotic mania. *Am. J. Psychiatry*. 2000; 157 (6): 982–986. DOI: 10.1176/appi.ajp.157.6.982. PMID: 10831480
4. Szota A., Ogłodek E., Araszkiewicz A. Fever development in neuroleptic malignant syndrome during treatment with olanzapine and clozapine. *Pharmacol. Rep.* 2013; 65 (2): 279–287. DOI: 10.1016/S1734-1140(13)71004-1. PMID: 23744413
5. Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity: role of oxidative stress, tumour necrosis factor alpha and NF-κB. *Cardiovasc. Toxicol.* 2015; 15 (4): 355–365. DOI: 10.1007/s12012-014-9304-9. PMID: 25539628
6. Abdel-Wahab B.A., Metwally M.E. Clozapine-induced cardiotoxicity in rats: involvement of tumour necrosis factor alpha, NF-κB and caspase-3. *Toxicol. Rep.* 2014; 1: 1213–1223. DOI: 10.1016/j.toxrep.2014.11.012. PMID: 28962331

7. Романова О.Л., Сундуков Д.В., Голубев А.М., Бабкина А.С., Голубев М.А. Морфологические изменения в сердце при отравлении клозапином (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2017; 13 (2): 6-13. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-2-6-13
8. Романова О.Л., Сундуков Д.В., Голубев А.М., Благодаров М.Л., Голубев М.А. Характеристика общепатологических процессов в легких при отравлении клозапином. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (4): 22-29. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-4-22-29
9. Данилов Д.С. Современный взгляд на историю атипичных антипсихотических средств. *Журн. неврол. и психиатрии им. С.С.Корсакова*. 2017; 117 (5): 85 – 93. DOI: 10.17116/jnevro.20171175185-93. PMID: 28638038
10. Crilly J. The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis. *Hist. Psychiatry*. 2007; 18 (1): 39-60. DOI: 10.1177/0957154X07070335. PMID: 17580753
11. Nucifora F.C.Jr., Mihaljevic M., Lee B., Sawa A. Clozapine as a model for antipsychotic development. *Neurotherapeutics*. 2017; 14 (3): 750-761. DOI: 10.1007/s13311-017-0552-9. PMID: 28653280
12. Hippis H. The history of clozapine. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1989; 99 Suppl: S3-S5. DOI: 10.1007/BF00442551. PMID: 2682730
13. Kane J., Honigfeld G., Singer J., Meltzer H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1988; 45 (9): 789-796. DOI: 10.1001/archpsyc.1988.01800330013001. PMID: 3046553
14. Meltzer H.Y., Cola P., Way L., Thompson P.A., Bastani B., Davies M.A., Snitz B. Cost effectiveness of clozapine in neuroleptic-resistant schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*. 1993; 150 (11): 1630-1638. DOI: 10.1176/ajp.150.11.1630. PMID: 8105705
15. Khan A.A., Ashraf A., Baker D., Al-Omary M.S., Savage L., Ekmejian A., Singh R.S.H., Brienesse S., Majeed T., Gordon T., Drinkwater V., Collins N.J. Clozapine and incidence of myocarditis and sudden death – long term Australian experience. *Int. J. Cardiol*. 2017; 238: 136-139. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.03.013. PMID: 28343762
16. Katta N., Balla S., Aggarwal K. Clozapine-induced hypersensitivity myocarditis presenting as sudden cardiac death. *Autops. Case Rep*. 2016; 6 (4): 9-13. DOI: 10.4322/acr.2016.054. PMID: 28210568
17. Acciavatti T., Martinotti G., Corbo M., Cinosi E., Lupi M., Ricci F., Di Scala R., D'Ugo E., De Francesco V., De Caterina R., di Giannantonio M. Psychotropic drugs and ventricular repolarisation: the effects on QT interval, T-peak to T-end interval and QT dispersion. *J. Psychopharmacol*. 2017; 31 (4): 453-460. DOI: 10.1177/0269881116684337. PMID: 28071178
18. Woloszyn E., Whig N., Trigoboff E., Grace J.J. Cardiac arrest with clozapine and olanzapine: revealing long QT syndrome. *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses*. 2016; Dec. 20. [Epub. ahead of print]. DOI: 10.3371/CSRP.WOWH.112316. PMID: 27996317
19. Grande I., Pons A., Baeza I., Torras Á., Bernardo M. QTc prolongation: is clozapine safe? Study of 82 cases before and after clozapine treatment. *Hum. Psychopharmacol*. 2011; 26 (6): 397-403. DOI: 10.1002/hup.1221. PMID: 21826738
20. Lee S.Y., Kim Y.J., Kim K.T., Choe H., Jo S.H. Blockade of HERG human K⁺ channels and IKr of guinea-pig cardiomyocytes by the antipsychotic drug clozapine. *Br. J. Pharmacol*. 2006; 148 (4): 499-509. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706744. PMID: 16633353
21. Shulman M., Jennifer Njoku I., Manu P. Thrombotic complications of treatment with antipsychotic drugs. *Minerva Med*. 2013; 104 (2): 175-184. PMID: 23514994
22. Hu Q., Zhang C., Zhu S. Fatal multisystem venous thrombosis associated with clozapine. *J. Clin. Psychopharmacol*. 2013; 33 (2): 256-258. DOI: 10.1097/JCP.0b013e318285683b. PMID: 23422385
23. Allenet B., Schmidlin S., Genty C., Bosson J.L. Antipsychotic drugs and risk of pulmonary embolism. *Pharmacoevid. Drug Saf*. 2012; 21 (1): 42-48. DOI: 10.1002/pds.2210. PMID: 22052683
24. Werring D., Hacking D., Losseff N., Jäger H.R., Walsh M., Foong J. Cerebral venous sinus thrombosis may be associated with clozapine. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci*. 2009; 21 (3): 343-345. DOI: 10.1176/jnp.2009.21.3.343a. PMID: 19776318
25. Axelsson S., Hägg S., Eriksson A.C., Lindahl T.L., Whiss P.A. In vitro effects of antipsychotics on human platelet adhesion and aggregation and plasma coagulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2007; 34 (8): 775-780. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04650.x. PMID: 17600556
26. Swart L.E., Koster K., Torn M., Budde R.P.J., Uijlings R. Clozapine-induced myocarditis. *Schizophr. Res*. 2016; 174 (1-3): 161-164. DOI: 10.1016/j.schres.2016.04.016. PMID: 27112636
27. Barry A.R., Windram J.D., Graham M.M. Clozapine-associated myocarditis: case report and literature review. *Can. J. Hosp. Pharm*. 2015; 68 (5): 427-429. DOI: 10.4212/cjhp.v68i5.1493. PMID: 26478592
28. Longhi S., Heres S. Clozapine-induced, dilated cardiomyopathy: a case report. *BMC Res. Notes*. 2017; 10 (1): 338. DOI: 10.1186/s13104-017-2679-5. PMID: 28750684
29. West S., Jeffery-Smith A., Brownlee W., Kenedi C. Covert clozapine overdose: Clozapine toxicity in a naive patient. *Aust. N.Z. J. Psychiatry*. 2013; 47 (12): 1208-1209. DOI: 10.1177/0004867413495926. PMID: 23817859
30. McElroy S.L., Dessain E.C., Pope H.G.Jr., Cole J.O., Keck P.E.Jr., Frankenberg F.R., Aizley H.G., O'Brien S. Clozapine in the treatment of psychotic mood disorders, schizoaffective disorder, and schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry*. 1991; 52 (10): 411-414. PMID: 1938976
31. Seeman P. Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic. *ACS Chem. Neurosci*. 2014; 5 (1): 24-29. DOI: 10.1021/cn400189s. PMID: 24219174
7. Romanova O.L., Sundukov D.V., Golubev A.M., Babkina A.S., Golubev M.A. Morphological changes in the heart with clozapine poisoning (experimental study). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2017; 13 (2): 6-13. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-2-6-13. [In Russ., In Engl.]
8. Romanova O.L., Sundukov D.V., Golubev A.M., Blagodarov M.L., Golubev M.A. Characteristics of general pathological processes in the lungs following clozapine poisoning. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2017; 13 (4): 22-29. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-4-22-29. [In Russ., In Engl.]
9. Danilov D.S. A current view on the history of atypical antipsychotics. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii Imeni S.S.Korsakova*. 2017; 117 (5): 85 – 93. DOI: 10.17116/jnevro.20171175185-93. PMID: 28638038. [In Russ.]
10. Crilly J. The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis. *Hist. Psychiatry*. 2007; 18 (1): 39-60. DOI: 10.1177/0957154X07070335. PMID: 17580753
11. Nucifora F.C.Jr., Mihaljevic M., Lee B., Sawa A. Clozapine as a model for antipsychotic development. *Neurotherapeutics*. 2017; 14 (3): 750-761. DOI: 10.1007/s13311-017-0552-9. PMID: 28653280
12. Hippis H. The history of clozapine. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1989; 99 Suppl: S3-S5. DOI: 10.1007/BF00442551. PMID: 2682730
13. Kane J., Honigfeld G., Singer J., Meltzer H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1988; 45 (9): 789-796. DOI: 10.1001/archpsyc.1988.01800330013001. PMID: 3046553
14. Meltzer H.Y., Cola P., Way L., Thompson P.A., Bastani B., Davies M.A., Snitz B. Cost effectiveness of clozapine in neuroleptic-resistant schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*. 1993; 150 (11): 1630-1638. DOI: 10.1176/ajp.150.11.1630. PMID: 8105705
15. Khan A.A., Ashraf A., Baker D., Al-Omary M.S., Savage L., Ekmejian A., Singh R.S.H., Brienesse S., Majeed T., Gordon T., Drinkwater V., Collins N.J. Clozapine and incidence of myocarditis and sudden death – long term Australian experience. *Int. J. Cardiol*. 2017; 238: 136-139. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.03.013. PMID: 28343762
16. Katta N., Balla S., Aggarwal K. Clozapine-induced hypersensitivity myocarditis presenting as sudden cardiac death. *Autops. Case Rep*. 2016; 6 (4): 9-13. DOI: 10.4322/acr.2016.054. PMID: 28210568
17. Acciavatti T., Martinotti G., Corbo M., Cinosi E., Lupi M., Ricci F., Di Scala R., D'Ugo E., De Francesco V., De Caterina R., di Giannantonio M. Psychotropic drugs and ventricular repolarisation: the effects on QT interval, T-peak to T-end interval and QT dispersion. *J. Psychopharmacol*. 2017; 31 (4): 453-460. DOI: 10.1177/0269881116684337. PMID: 28071178
18. Woloszyn E., Whig N., Trigoboff E., Grace J.J. Cardiac arrest with clozapine and olanzapine: revealing long QT syndrome. *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses*. 2016; Dec. 20. [Epub. ahead of print]. DOI: 10.3371/CSRP.WOWH.112316. PMID: 27996317
19. Grande I., Pons A., Baeza I., Torras Á., Bernardo M. QTc prolongation: is clozapine safe? Study of 82 cases before and after clozapine treatment. *Hum. Psychopharmacol*. 2011; 26 (6): 397-403. DOI: 10.1002/hup.1221. PMID: 21826738
20. Lee S.Y., Kim Y.J., Kim K.T., Choe H., Jo S.H. Blockade of HERG human K⁺ channels and IKr of guinea-pig cardiomyocytes by the antipsychotic drug clozapine. *Br. J. Pharmacol*. 2006; 148 (4): 499-509. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706744. PMID: 16633353
21. Shulman M., Jennifer Njoku I., Manu P. Thrombotic complications of treatment with antipsychotic drugs. *Minerva Med*. 2013; 104 (2): 175-184. PMID: 23514994
22. Hu Q., Zhang C., Zhu S. Fatal multisystem venous thrombosis associated with clozapine. *J. Clin. Psychopharmacol*. 2013; 33 (2): 256-258. DOI: 10.1097/JCP.0b013e318285683b. PMID: 23422385
23. Allenet B., Schmidlin S., Genty C., Bosson J.L. Antipsychotic drugs and risk of pulmonary embolism. *Pharmacoevid. Drug Saf*. 2012; 21 (1): 42-48. DOI: 10.1002/pds.2210. PMID: 22052683
24. Werring D., Hacking D., Losseff N., Jäger H.R., Walsh M., Foong J. Cerebral venous sinus thrombosis may be associated with clozapine. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci*. 2009; 21 (3): 343-345. DOI: 10.1176/jnp.2009.21.3.343a. PMID: 19776318
25. Axelsson S., Hägg S., Eriksson A.C., Lindahl T.L., Whiss P.A. In vitro effects of antipsychotics on human platelet adhesion and aggregation and plasma coagulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2007; 34 (8): 775-780. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04650.x. PMID: 17600556
26. Swart L.E., Koster K., Torn M., Budde R.P.J., Uijlings R. Clozapine-induced myocarditis. *Schizophr. Res*. 2016; 174 (1-3): 161-164. DOI: 10.1016/j.schres.2016.04.016. PMID: 27112636
27. Barry A.R., Windram J.D., Graham M.M. Clozapine-associated myocarditis: case report and literature review. *Can. J. Hosp. Pharm*. 2015; 68 (5): 427-429. DOI: 10.4212/cjhp.v68i5.1493. PMID: 26478592
28. Longhi S., Heres S. Clozapine-induced, dilated cardiomyopathy: a case report. *BMC Res. Notes*. 2017; 10 (1): 338. DOI: 10.1186/s13104-017-2679-5. PMID: 28750684
29. West S., Jeffery-Smith A., Brownlee W., Kenedi C. Covert clozapine overdose: Clozapine toxicity in a naive patient. *Aust. N.Z. J. Psychiatry*. 2013; 47 (12): 1208-1209. DOI: 10.1177/0004867413495926. PMID: 23817859
30. McElroy S.L., Dessain E.C., Pope H.G.Jr., Cole J.O., Keck P.E.Jr., Frankenberg F.R., Aizley H.G., O'Brien S. Clozapine in the treatment of psychotic mood disorders, schizoaffective disorder, and schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry*. 1991; 52 (10): 411-414. PMID: 1938976
31. Seeman P. Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic. *ACS Chem. Neurosci*. 2014; 5 (1): 24-29. DOI: 10.1021/cn400189s. PMID: 24219174

32. *Dziewczapolski G., Menalled L.B., Savino M.T., Mora M., Stefano F.J., Gershanik O.* Mechanism of action of clozapine-induced modification of motor behavior in an animal model of the «super-off» phenomenon. *Mov. Disord.* 1997; 12 (2): 159-166. DOI: 10.1002/mds.870120205. PMID: 9087973
33. *Hermann B., Wetzel C.H., Pestel E., Zieglgänsberger W., Holsboer F., Rupprecht R.* Functional antagonistic properties of clozapine at the 5-HT3 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 225 (3): 957-960. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1278. PMID: 8780717
34. *Schmid C.L., Streicher J.M., Meltzer H.Y., Bohn L.M.* Clozapine acts as an agonist at serotonin 2A receptors to counter MK-801-induced behaviors through a arrestin2-independent activation of akt. *Neuropsychopharmacology*. 2014; 39 (8): 1902-1913. DOI: 10.1038/npp.2014.38. PMID: 24531562
35. *Козлова С.Н.* Коморбидность депрессии, тревоги и ишемической болезни сердца (обзор литературы). Часть II. *Психические расстройства в общей медицине*. 2012; 3: 44-52.
36. *Humbert-Claude M., Davenas E., Gbahou F., Vincent L., Arrang J.M.* Involvement of histamine receptors in the atypical antipsychotic profile of clozapine: a reassessment *in vitro* and *in vivo*. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2012; 220 (1): 225-241. DOI: 10.1007/s00213-011-2471-5. PMID: 21912901
37. *Лужников Е.А.* Медицинская токсикология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012: 528–530.
38. *Бонитенко Ю.Ю., Бонитенко Е.Ю., Батоцыренов Б.В.* Отравления азалептином. Клиника, диагностика, лечение. *Токсикология*. 2006; 7 (2): 29–37.
39. *Guidotti A., Dong E., Tueting P., Grayson D.R.* Modeling the molecular epigenetic profile of psychosis in prenatally stressed mice. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2014; 128: 89-101. DOI: 10.1016/B978-0-12-800977-2.00004-8. PMID: 25410542
40. *Dong E., Nelson M., Grayson D.R., Costa E., Guidotti A.* Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105 (36): 13614-13619. DOI: 10.1073/pnas.0805493105. PMID: 18757738
41. *Dragovic S., Gunness P., Ingelman-Sundberg M., Vermeulen N.P., Commandeur J.N.* Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine. *Drug Metab. Dispos.* 2013; 41 (3): 651-658. DOI: 10.1124/dmd.112.050484. PMID: 23297297
42. *Leung J.G., Nelson S., Takala C.R., Gören J.L.* Infection and inflammation leading to clozapine toxicity and intensive care: a case series. *Ann. Pharmacother.* 2014; 48 (6): 801-805. DOI: 10.1177/1060028014526701. PMID: 24619948
43. *Fang J.* Metabolism of clozapine by rat brain: the role of flavin-containing monooxygenase (FMO) and cytochrome P450 enzymes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2000; 25 (2): 109-114. DOI: 10.1007/BF03190076. PMID: 11112091
44. *Fang J., Coutts R.T., McKenna K.F., Baker G.B.* Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998; 358 (5): 592-599. DOI: 10.1007/PL00005298. PMID: 9840430
45. *Urichuk L., Prior T.I., Dursun S., Baker G.* Metabolism of atypical antipsychotics: involvement of cytochrome p450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. *Curr. Drug Metab.* 2008; 9 (5): 410-418. DOI: 10.2174/138920008784746373. PMID: 18537577
46. *Regen F., Herzog I., Hahn E., Ruehl C., Le Bret N., Dettling M., Heuser I., Hellmann-Regen J.* Clozapine-induced agranulocytosis: evidence for an immune-mediated mechanism from a patient-specific *in vitro* approach. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017; 316: 10-16. DOI: 10.1016/j.taap.2016.12.003. PMID: 27939987
47. *Williams D.P., O'Donnell C.J., Maggs J.L., Leeder J.S., Utrecht J., Pirmohamed M., Park B.K.* Bioactivation of clozapine by murine cardiac tissue *in vivo* and *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.* 2003; 16 (10): 1359-1364. DOI: 10.1021/tx034035z. PMID: 14565776
48. *Shad M.U.* Clozapine toxicity: a discussion of pharmacokinetic factors. *Asian J. Psychiatr.* 2008; 1 (2): 47-49. DOI: 10.1016/j.ajp.2008.09.001. PMID: 23050996
49. *Krivoy A., Gaughran F., Weizman A., Breen G., MacCabe J.* Gene polymorphisms potentially related to the pharmacokinetics of clozapine: a systematic review. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2016; 31 (4): 179-184. DOI: 10.1097/YIC.000000000000065. PMID: 25563806
50. *Khaldi S., Kornreich C., Choubani Z., Gourevitch R.* Neuroleptic malignant syndrome and atypical antipsychotics: a brief review. *Encephale*. 2008; 34 (6): 618-624. DOI: 10.1016/j.encep.2007.11.007. PMID: 19081460
51. *Farver D.* Neuroleptic malignant syndrome induced by atypical antipsychotics. *Expert. Opin. Drug Saf.* 2003; 2 (1): 21-35. DOI: 10.1517/14740338.2.1.21. PMID: 12904122
52. *Elmorsy E., Smith P.A.* Bioenergetic disruption of human micro-vascular endothelial cells by antipsychotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 460 (3): 857-862. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.122. PMID: 25824037
53. *Pirmohamed M., Park K.* Mechanism of clozapine-induced agranulocytosis: current status of research and implications for drug development. *CNS Drugs*. 1997; 7 (2): 139-158. DOI: 10.2165/00023210-199707020-00005. PMID: 23338132
54. *Girardin F.R., Poncet A., Perrier A., Vernaz N., Pletscher M., Samer C., Lieberman J.A., Villard J.* Cost-effectiveness of HLA-DQB1/HLA-B pharmacogenetic-guided treatment and blood monitoring in US patients taking clozapine. *Pharmacogenomics J.* 2018 Jan. 3; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1038/s41397-017-0004-2. PMID: 29298994
55. *Youssef D.L., Narayanan P., Gill N.* Incidence and risk factors for clozapine-induced myocarditis and cardiomyopathy at a regional mental health
32. *Dziewczapolski G., Menalled L.B., Savino M.T., Mora M., Stefano F.J., Gershanik O.* Mechanism of action of clozapine-induced modification of motor behavior in an animal model of the «super-off» phenomenon. *Mov. Disord.* 1997; 12 (2): 159-166. DOI: 10.1002/mds.870120205. PMID: 9087973
33. *Hermann B., Wetzel C.H., Pestel E., Zieglgänsberger W., Holsboer F., Rupprecht R.* Functional antagonistic properties of clozapine at the 5-HT3 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 225 (3): 957-960. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1278. PMID: 8780717
34. *Schmid C.L., Streicher J.M., Meltzer H.Y., Bohn L.M.* Clozapine acts as an agonist at serotonin 2A receptors to counter MK-801-induced behaviors through a arrestin2-independent activation of akt. *Neuropsychopharmacology*. 2014; 39 (8): 1902-1913. DOI: 10.1038/npp.2014.38. PMID: 24531562
35. *Козлова С.Н.* Коморбидность депрессии, тревоги и ишемической болезни сердца (литературный обзор). Часть II. *Психические расстройства в Общей Медицине*. 2012; 3: 44-52. [In Russ.]
36. *Humbert-Claude M., Davenas E., Gbahou F., Vincent L., Arrang J.M.* Involvement of histamine receptors in the atypical antipsychotic profile of clozapine: a reassessment *in vitro* and *in vivo*. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2012; 220 (1): 225-241. DOI: 10.1007/s00213-011-2471-5. PMID: 21912901
37. *Luzhnikov E.A.* Medical toxicology. National guide. Moscow: GEOTAR-Media; 2012: 528 – 530. [In Russ.]
38. *Bonitenko Yu.Yu., Bonitenko E.Yu., Batotsyrenov B.V.* Poisoning with aza-leptin. Clinic, diagnosis, treatment. *Toksikologiya*. 2006; 7 (2): 29–37. [In Russ.]
39. *Guidotti A., Dong E., Tueting P., Grayson D.R.* Modeling the molecular epigenetic profile of psychosis in prenatally stressed mice. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2014; 128: 89-101. DOI: 10.1016/B978-0-12-800977-2.00004-8. PMID: 25410542
40. *Dong E., Nelson M., Grayson D.R., Costa E., Guidotti A.* Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105 (36): 13614-13619. DOI: 10.1073/pnas.0805493105. PMID: 18757738
41. *Dragovic S., Gunness P., Ingelman-Sundberg M., Vermeulen N.P., Commandeur J.N.* Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine. *Drug Metab. Dispos.* 2013; 41 (3): 651-658. DOI: 10.1124/dmd.112.050484. PMID: 23297297
42. *Leung J.G., Nelson S., Takala C.R., Gören J.L.* Infection and inflammation leading to clozapine toxicity and intensive care: a case series. *Ann. Pharmacother.* 2014; 48 (6): 801-805. DOI: 10.1177/1060028014526701. PMID: 24619948
43. *Fang J.* Metabolism of clozapine by rat brain: the role of flavin-containing monooxygenase (FMO) and cytochrome P450 enzymes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2000; 25 (2): 109-114. DOI: 10.1007/BF03190076. PMID: 11112091
44. *Fang J., Coutts R.T., McKenna K.F., Baker G.B.* Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998; 358 (5): 592-599. DOI: 10.1007/PL00005298. PMID: 9840430
45. *Urichuk L., Prior T.I., Dursun S., Baker G.* Metabolism of atypical antipsychotics: involvement of cytochrome p450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. *Curr. Drug Metab.* 2008; 9 (5): 410-418. DOI: 10.2174/138920008784746373. PMID: 18537577
46. *Regen F., Herzog I., Hahn E., Ruehl C., Le Bret N., Dettling M., Heuser I., Hellmann-Regen J.* Clozapine-induced agranulocytosis: evidence for an immune-mediated mechanism from a patient-specific *in vitro* approach. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017; 316: 10-16. DOI: 10.1016/j.taap.2016.12.003. PMID: 27939987
47. *Williams D.P., O'Donnell C.J., Maggs J.L., Leeder J.S., Utrecht J., Pirmohamed M., Park B.K.* Bioactivation of clozapine by murine cardiac tissue *in vivo* and *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.* 2003; 16 (10): 1359-1364. DOI: 10.1021/tx034035z. PMID: 14565776
48. *Shad M.U.* Clozapine toxicity: a discussion of pharmacokinetic factors. *Asian J. Psychiatr.* 2008; 1 (2): 47-49. DOI: 10.1016/j.ajp.2008.09.001. PMID: 23050996
49. *Krivoy A., Gaughran F., Weizman A., Breen G., MacCabe J.* Gene polymorphisms potentially related to the pharmacokinetics of clozapine: a systematic review. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2016; 31 (4): 179-184. DOI: 10.1097/YIC.000000000000065. PMID: 25563806
50. *Khaldi S., Kornreich C., Choubani Z., Gourevitch R.* Neuroleptic malignant syndrome and atypical antipsychotics: a brief review. *Encephale*. 2008; 34 (6): 618-624. DOI: 10.1016/j.encep.2007.11.007. PMID: 19081460
51. *Farver D.* Neuroleptic malignant syndrome induced by atypical antipsychotics. *Expert. Opin. Drug Saf.* 2003; 2 (1): 21-35. DOI: 10.1517/14740338.2.1.21. PMID: 12904122
52. *Elmorsy E., Smith P.A.* Bioenergetic disruption of human micro-vascular endothelial cells by antipsychotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 460 (3): 857-862. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.122. PMID: 25824037
53. *Pirmohamed M., Park K.* Mechanism of clozapine-induced agranulocytosis: current status of research and implications for drug development. *CNS Drugs*. 1997; 7 (2): 139-158. DOI: 10.2165/00023210-199707020-00005. PMID: 23338132
54. *Girardin F.R., Poncet A., Perrier A., Vernaz N., Pletscher M., Samer C., Lieberman J.A., Villard J.* Cost-effectiveness of HLA-DQB1/HLA-B pharmacogenetic-guided treatment and blood monitoring in US patients taking clozapine. *Pharmacogenomics J.* 2018 Jan. 3; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1038/s41397-017-0004-2. PMID: 29298994
55. *Youssef D.L., Narayanan P., Gill N.* Incidence and risk factors for clozapine-induced myocarditis and cardiomyopathy at a regional mental health service in Australia. *Australas. Psychiatry*. 2016; 24 (2): 176-180. DOI: 10.1177/1039856215604480. PMID: 26400457

- service in Australia. *Australas. Psychiatry*. 2016; 24 (2): 176-180. DOI: 10.1177/1039856215604480. PMID: 26400457
56. Hatton J.L., Bhat P.K., Gandhi S. Clozapine-induced myocarditis: recognizing a potentially fatal adverse reaction. *Tex. Heart Inst. J.* 2015; 42 (2): 155-157. DOI: 10.14503/THIJ-13-3633. PMID: 25873829
 57. Nemani K.L., Greene M.C., Ulloa M., Vincenzi B., Copeland P.M., Al-Khadari S., Henderson D.C. Clozapine, diabetes mellitus, cardiovascular risk and mortality: results of a 21-year naturalistic study in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses*. 2017; Nov. 22. [Epub ahead of print]. DOI: 10.3371/CSRP.KNMG.111717. PMID: 29164928
 58. Hyde N., Dodd S., Venugopal K., Purdie C., Berk M., O'Neil A. Prevalence of cardiovascular and metabolic events in patients prescribed clozapine: a retrospective observational, clinical cohort study. *Curr. Drug Saf.* 2015; 10 (2): 125-131. DOI: 10.2174/157488631002150515120209. PMID: 25986036
 59. Haas S.J., Hill R., Krum H., Liew D., Tonkin A., Demos L., Stephan K., McNeil J. Clozapine-associated myocarditis: a review of 116 cases of suspected myocarditis associated with the use of clozapine in Australia during 1993-2003. *Drug Saf.* 2007; 30 (1): 47-57. PMID: 17194170
 60. Markovic J., Momcilov-Popin T., Mitrovic D., Ivanovic-Kovacevic S., Sekuli S., Stojic-Milosavljevic A. Clozapine-induced pericarditis. *Afr. J. Psychiatry (Johannesbg)*. 2011; 14 (3): 236-238. DOI: 10.4314/ajpsy.v14i3.7. PMID: 21863209
 61. Wehmeier P.M., Heiser P., Remschmidt H. Myocarditis, pericarditis and cardiomyopathy in patients treated with clozapine. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2005; 30 (1): 91-96. DOI: 10.1111/j.1365-2710.2004.00616.1.x. PMID: 15659009
 62. Kelly D.L., McMahon R.P., Liu F., Love R.C., Wehring H.J., Shim J.C., Warren K.R., Conley R.R. Cardiovascular disease mortality in patients with chronic schizophrenia treated with clozapine: a retrospective cohort study. *J. Clin. Psychiatry*. 2010; 71 (3): 304-311. DOI: 10.4088/JCP.08m04718yel. PMID: 20079332
 63. Wooltorton E. Antipsychotic clozapine (Clozaril): myocarditis and cardiovascular toxicity. *CMAJ*. 2002; 166 (9): 1185-1186. PMID: 12000254
 64. Modai I., Hirschmann S., Rava A., Kurs R., Barak P., Lichtenberg P., Ritsner M. Sudden death in patients receiving clozapine treatment: a preliminary investigation. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2000; 20 (3): 325-327. DOI: 10.1097/00004714-200006000-00006. PMID: 10831019
 65. Gioda C.R., de Oliveira Barreto T., Primola-Gomes T.N., de Lima D.C., Campos P.P., CapetiniLdos S., Lauton-Santos S., Vasconcelos A.C., Coimbra C.C., Lemos V.S., Pesquero J.L., Cruz J.S. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 298 (6): H2039-H2045. DOI: 10.1152/ajpheart.00820.2009. PMID: 20304817
 66. Pollmächer T., Hinze-Selch D., Mullington J. Effects of clozapine on plasma cytokine and soluble cytokine receptor levels. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1996; 16 (5): 403-409. DOI: 10.1097/00004714-199610000-00011. PMID: 8889915
 67. Ronaldson K.J. Cardiovascular disease in clozapine-treated patients: evidence, mechanisms and management. *CNS Drugs*. 2017; 31 (9): 777-795. DOI: 10.1007/s40263-017-0461-9. PMID: 28808933
 68. Wang J.F., Min J.Y., Hampton T.G., Amende I., Yan X., Malek S., Abelman W.H., Green A.I., Zeind J., Morgan J.P. Clozapine-induced myocarditis: role of catecholamines in a murine model. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 592 (1-3): 123-127. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.06.088. PMID: 18627770
 69. Elman I., Goldstein D.S., Eisenhofer G., Folio J., Malhotra A.K., Adler C.M., Pickar D., Breier A. Mechanism of peripheral noradrenergic stimulation by clozapine. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 20 (1): 29-34. DOI: 10.1016/S0893-133X(98)00047-5. PMID: 9885782
 70. Simons M., Downing S.E. Coronary vasoconstriction and catecholamine cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 1985; 109 (2): 297-304. DOI: 10.1016/0002-8703(85)90597-6. PMID: 3966346
 71. Ishiyama S., Hiroe M., Nishikawa T., Abe S., Shimojo T., Ito H., Ozasa S., Yamakawa K., Matsuzaki M., Mohammed M.U., Nakazawa H., Kasajima T., Marumo F. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*. 1997; 95 (2): 489-496. DOI: 10.1161/01.CIR.95.2.489. PMID: 9008468
 72. Patel J.J., Lisi P.A., Lathara Z., Lipchik R.J. Clozapine-induced peripheral and pleural fluid eosinophilia. *Ann. Pharmacother.* 2012; 46 (2): e4. DOI: 10.1345/aph.1Q642. PMID: 22274140
 73. Krämer I., Rauber-Lüthy C., Kupferschmidt H., Krähenbühl S., Ceschi A. Minimal dose for severe poisoning and influencing factors in acute human clozapine intoxication: a 13-year retrospective study. *Clin. Neuropharmacol.* 2010; 33 (5): 230-234. DOI: 10.1097/WNF.0b013e3181f0ec55. PMID: 20689404
 74. Kim D.D., White R.F., Barr A.M., Honer W.G., Procyshyn R.M. Clozapine, elevated heart rate and QTc prolongation. *J. Psychiatry Neurosci.* 2018; 43 (1):71-72. PMID: 29252168
 75. Hägg S., Jönsson A.K., Spigset O. Risk of venous thromboembolism due to antipsychotic drug therapy. *Expert. Opin. Drug Saf.* 2009; 8 (5): 537-547. DOI: 10.1517/14740330903117271. PMID: 19569978
 76. Kortepeter C., Chen M., Knudsen J.F., Dubitsky G.M., Ahmad S.R., Beitz J. Clozapine and venous thromboembolism. *Am. J. Psychiatry*. 2002; 159 (5): 876-877. DOI: 10.1176/appi.ajp.159.5.876. PMID: 11986154
 77. Белова М.В., Ильяшенко К.К., Буркина И.А., Биткова Е.Е., Лужников Е.А., Хватов В.В. Влияние окислительного стресса на показатели гемореологии у больных с острыми отравлениями психофармакологическими средствами. *Общая реаниматология*. 2010; 6 (4): 22 – 25. DOI: 10.15360/1813-9779-2010-4-22
 56. Hatton J.L., Bhat P.K., Gandhi S. Clozapine-induced myocarditis: recognizing a potentially fatal adverse reaction. *Tex. Heart Inst. J.* 2015; 42 (2): 155-157. DOI: 10.14503/THIJ-13-3633. PMID: 25873829
 57. Nemani K.L., Greene M.C., Ulloa M., Vincenzi B., Copeland P.M., Al-Khadari S., Henderson D.C. Clozapine, diabetes mellitus, cardiovascular risk and mortality: results of a 21-year naturalistic study in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses*. 2017; Nov. 22. [Epub ahead of print]. DOI: 10.3371/CSRP.KNMG.111717. PMID: 29164928
 58. Hyde N., Dodd S., Venugopal K., Purdie C., Berk M., O'Neil A. Prevalence of cardiovascular and metabolic events in patients prescribed clozapine: a retrospective observational, clinical cohort study. *Curr. Drug Saf.* 2015; 10 (2): 125-131. DOI: 10.2174/157488631002150515120209. PMID: 25986036
 59. Haas S.J., Hill R., Krum H., Liew D., Tonkin A., Demos L., Stephan K., McNeil J. Clozapine-associated myocarditis: a review of 116 cases of suspected myocarditis associated with the use of clozapine in Australia during 1993-2003. *Drug Saf.* 2007; 30 (1): 47-57. PMID: 17194170
 60. Markovic J., Momcilov-Popin T., Mitrovic D., Ivanovic-Kovacevic S., Sekuli S., Stojic-Milosavljevic A. Clozapine-induced pericarditis. *Afr. J. Psychiatry (Johannesbg)*. 2011; 14 (3): 236-238. DOI: 10.4314/ajpsy.v14i3.7. PMID: 21863209
 61. Wehmeier P.M., Heiser P., Remschmidt H. Myocarditis, pericarditis and cardiomyopathy in patients treated with clozapine. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2005; 30 (1): 91-96. DOI: 10.1111/j.1365-2710.2004.00616.1.x. PMID: 15659009
 62. Kelly D.L., McMahon R.P., Liu F., Love R.C., Wehring H.J., Shim J.C., Warren K.R., Conley R.R. Cardiovascular disease mortality in patients with chronic schizophrenia treated with clozapine: a retrospective cohort study. *J. Clin. Psychiatry*. 2010; 71 (3): 304-311. DOI: 10.4088/JCP.08m04718yel. PMID: 20079332
 63. Wooltorton E. Antipsychotic clozapine (Clozaril): myocarditis and cardiovascular toxicity. *CMAJ*. 2002; 166 (9): 1185-1186. PMID: 12000254
 64. Modai I., Hirschmann S., Rava A., Kurs R., Barak P., Lichtenberg P., Ritsner M. Sudden death in patients receiving clozapine treatment: a preliminary investigation. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2000; 20 (3): 325-327. DOI: 10.1097/00004714-200006000-00006. PMID: 10831019
 65. Gioda C.R., de Oliveira Barreto T., Primola-Gomes T.N., de Lima D.C., Campos P.P., CapetiniLdos S., Lauton-Santos S., Vasconcelos A.C., Coimbra C.C., Lemos V.S., Pesquero J.L., Cruz J.S. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 298 (6): H2039-H2045. DOI: 10.1152/ajpheart.00820.2009. PMID: 20304817
 66. Pollmächer T., Hinze-Selch D., Mullington J. Effects of clozapine on plasma cytokine and soluble cytokine receptor levels. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1996; 16 (5): 403-409. DOI: 10.1097/00004714-199610000-00011. PMID: 8889915
 67. Ronaldson K.J. Cardiovascular disease in clozapine-treated patients: evidence, mechanisms and management. *CNS Drugs*. 2017; 31 (9): 777-795. DOI: 10.1007/s40263-017-0461-9. PMID: 28808933
 68. Wang J.F., Min J.Y., Hampton T.G., Amende I., Yan X., Malek S., Abelman W.H., Green A.I., Zeind J., Morgan J.P. Clozapine-induced myocarditis: role of catecholamines in a murine model. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 592 (1-3): 123-127. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.06.088. PMID: 18627770
 69. Elman I., Goldstein D.S., Eisenhofer G., Folio J., Malhotra A.K., Adler C.M., Pickar D., Breier A. Mechanism of peripheral noradrenergic stimulation by clozapine. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 20 (1): 29-34. DOI: 10.1016/S0893-133X(98)00047-5. PMID: 9885782
 70. Simons M., Downing S.E. Coronary vasoconstriction and catecholamine cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 1985; 109 (2): 297-304. DOI: 10.1016/0002-8703(85)90597-6. PMID: 3966346
 71. Ishiyama S., Hiroe M., Nishikawa T., Abe S., Shimojo T., Ito H., Ozasa S., Yamakawa K., Matsuzaki M., Mohammed M.U., Nakazawa H., Kasajima T., Marumo F. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*. 1997; 95 (2): 489-496. DOI: 10.1161/01.CIR.95.2.489. PMID: 9008468
 72. Patel J.J., Lisi P.A., Lathara Z., Lipchik R.J. Clozapine-induced peripheral and pleural fluid eosinophilia. *Ann. Pharmacother.* 2012; 46 (2): e4. DOI: 10.1345/aph.1Q642. PMID: 22274140
 73. Krämer I., Rauber-Lüthy C., Kupferschmidt H., Krähenbühl S., Ceschi A. Minimal dose for severe poisoning and influencing factors in acute human clozapine intoxication: a 13-year retrospective study. *Clin. Neuropharmacol.* 2010; 33 (5): 230-234. DOI: 10.1097/WNF.0b013e3181f0ec55. PMID: 20689404
 74. Kim D.D., White R.F., Barr A.M., Honer W.G., Procyshyn R.M. Clozapine, elevated heart rate and QTc prolongation. *J. Psychiatry Neurosci.* 2018; 43 (1):71-72. PMID: 29252168
 75. Hägg S., Jönsson A.K., Spigset O. Risk of venous thromboembolism due to antipsychotic drug therapy. *Expert. Opin. Drug Saf.* 2009; 8 (5): 537-547. DOI: 10.1517/14740330903117271. PMID: 19569978
 76. Kortepeter C., Chen M., Knudsen J.F., Dubitsky G.M., Ahmad S.R., Beitz J. Clozapine and venous thromboembolism. *Am. J. Psychiatry*. 2002; 159 (5): 876-877. DOI: 10.1176/appi.ajp.159.5.876. PMID: 11986154
 77. Belova M.V., Ilyashenko K.K., Burykina I.A., Bitkova Y.Y., Luzhnikov Y.A., Khvatov V.B. Impact of oxidative stress on hemorheological parameters in patients with acute poisonings by psychopharmacological agents. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2010; 6 (4): 22 – 25. DOI: 10.15360/1813-9779-2010-4-22. [In Russ., In Engl.]

Поступила 22.01.18

Received 22.01.18

Влияние антиоксиданта на основе янтарной кислоты на превращение метгемоглобина в оксигемоглобин *in vitro*

А. М. Черныш^{1,2}, Е. К. Козлова^{1,2}, В. В. Мороз¹, В. А. Сергунова¹,
О. Е. Гудкова¹, Е. А. Манченко^{1,2}, А. П. Козлов²

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,
Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Effects of Succinate-Based Antioxidant on *in vitro* Conversion of Methemoglobin in Oxyhemoglobin

Alexander M. Chernysh^{1,2}, Elena K. Kozlova^{1,2}, Victor V. Moroz¹, Victoria A. Sergunova¹,
Olga E. Gudkova¹, Ekaterina A. Manchenko^{1,2}, Alexander P. Kozlov²

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,
8 Trubetskaya Str., Build. 2, 119991 Moscow, Russia

Цель исследования — показать возможность использования антиоксиданта на основе янтарной кислоты для восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина в крови *in vitro*.

Материалы и методы. Забор крови в микроветты, содержащие ЭДТА, производили у пяти здоровых доноров при профилактических осмотрах. В кровь *in vitro* добавляли раствор NaNO_2 для получения метгемоглобина (MetHb). В качестве антиоксиданта использовали комплексный препарат, состоящий из следующих активных компонентов: янтарная кислота, инозин, рибофлавин и никотинамид. Измеряли спектр поглощения суспензий эритроцитов с различным содержанием препарата $D_L(\lambda)_{\text{эксп}}$ с шагом 1 нм. Методом нелинейной регрессии рассчитывали концентрации производных гемоглобина в суспензиях.

Результаты. В экспериментах, когда метгемоглобин взаимодействовал с препаратом, оптическая плотность пиков, характерных для оксигемоглобина, увеличивалась, а спектральный пик метгемоглобина снижался. Чем больше были концентрация препарата и время инкубации, тем эффективнее был процесс восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина.

Заключение. Экспериментально доказали, что при начальной концентрации метгемоглобина в крови 91–93% добавление препарата снижает его концентрацию до 25–27%. В то же время, благодаря автовосстановлению, концентрация метгемоглобина уменьшается только до 84%. Показанный эффект может иметь практическое применение при критических состояниях, при хранении донорской крови, при проведении гемотрансфузии, при воздействии физико-химических факторов на кровь.

Ключевые слова: эритроциты; метгемоглобин; оксигемоглобин; восстановление; янтарная кислота; инозин; рибофлавин; никотинамид; цитохлорин

The purpose of the study — to determine the feasibility of using the succinate-based antioxidant for the *in vitro* reduction of excessive methemoglobin to oxyhemoglobin in blood.

Materials and Methods. Blood sampling was performed in five healthy donors in microvettes containing EDTA during prophylactic examinations. NaNO_2 solution was added to blood samples *in vitro* in order to yield methemoglobin (MetHb). The complex drug containing the following active ingredients: succinic acid, inosine, riboflavin, nicotinamide, was used as an antioxidant. The absorption spectrum of red cell suspensions with different drug content $D_L(\lambda)_{\text{эксп}}$ was measured with 1 nm increments. The non-linear regression method was used to calculate concentrations of hemoglobin derivatives in suspensions.

Results. In our experiments, when methemoglobin reacted with drug the optical density of peaks typical for oxyhemoglobin increased and the spectral peak of methemoglobin decreased. The greater the concentration of drug, the more was the incubation time, the more efficient was the process of reduction of MetHb to HbO_2 .

Conclusion. We proved experimentally that while the baseline concentration of MetHb was an average of 91–93%, addition of drug decreased its concentration to 25–27%. Without drug, due to autoreduction, the con-

Адрес для корреспонденции:

Александр Черныш
E-mail: orbf@mail.ru

Correspondence to:

Alexander Chernysh
E-mail: orbf@mail.ru

centration of MetHb decreases only to 84%. The revealed effect provide a potential for practical applications in critical illness, during the storage of donor blood, in blood transfusions, and under the action of physico-chemical factors on blood.

Keywords: red blood cells; methemoglobin; oxyhemoglobin; reduction; succinic acid; inosine; riboflavin; nicotinamide; cytoflavin

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-46-59

Введение

Эндогенная и экзогенная интоксикация различной природы может вызывать образование активных форм кислорода (АФК) в крови и модифицировать молекулы гемоглобина в эритроцитах. При этом происходят процессы окисления железа $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ и превращения молекулы гемоглобина (Hb) и оксигемоглобина (HbO_2) в метгемоглобин (MetHb) [1–3]. В нормальном состоянии организм поддерживает биохимическое равновесие, и метгемоглобин в крови человека всегда присутствует в небольших количествах (0,5–1,5%).

Нарушение равновесия между содержанием образующихся АФК и антиоксидантными защитными механизмами клетки может произойти под влиянием различных эндогенных и экзогенных факторов (бактерии, вирусы, химические агенты, ряд фармпрепаратов, загрязнение окружающей среды, ионизирующие излучения, травмы, массивные кровотечения и др.) [4–6]. Кроме того, метгемоглобинемия может быть вызвана передозировкой некоторых лекарственных средств (лидокаин, новокаин, противомаларийные препараты и др.), отравлением химическими веществами (анилиновыми красителями, нитратами, хлорбензолом) [7].

При усилении окислительных процессов собственная антиоксидантная система уже не может «справляться» с увеличенным количеством активных форм кислорода и азота и образованием MetHb. Увеличение содержания метгемоглобина выше физиологического уровня приводит к нарушению газообмена. При удельной концентрации MetHb более 30% в жизненно важных органах могут развиваться необратимые изменения [4]. Известно, что для лечения метгемоглобинемии применяется метиленовый синий. Однако он не всегда эффективен и обладает рядом побочных токсических эффектов [4, 5].

Поэтому поиск лекарственных препаратов, способных усилить эффективность антиоксидантной системы эритроцитов и предотвратить образование АФК и MetHb, является актуальным.

Особенный интерес представляют вещества, содержащие природные компоненты. Примером таких препаратов является цитофлавин (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Российская Федерация). Его фармакологические эффекты определяются совместным действием, составляющих его ингредиентов: янтарная кислота, инозин, никотинамид, мононуклеотид рибофлавина натрия [8].

Introduction

Endogenous and exogenous intoxications of various causes may lead to the formation of active forms of oxygen (ROS) in the blood and modify hemoglobin molecules in erythrocytes. At the same time, the oxidation processes $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ occurs, and molecules of deoxyhemoglobin (Hb) and oxyhemoglobin (HbO_2) are converted to methemoglobin (MetHb) [1–3]. In its normal state, the body maintains a biochemical balance, and methemoglobin is always present in small amounts (0.5–1.5%) in human blood.

The imbalance between the amount of ROS formed and the antioxidant defense mechanisms may occur in cells under the influence of various endogenous and exogenous factors: bacteria, viruses, chemical agents, a number of pharmaceuticals, environmental pollution, ionizing radiations, traumas, massive bleeding, etc. [4–6]. In addition, methemoglobinemia can be caused by an overdose of some drugs (lidocaine, novocaine, antimalarials, etc.) and poisoning with chemicals (aniline dyes, nitrates, chlorobenzene) [7]. With increasing of oxidative processes, own antioxidant system can no longer deal with an increased amount of active forms of oxygen and nitrogen and MetHb formation. If MetHb level is higher than the physiological level, the disturbance of gas exchange occurs, because the oxidized heme is not capable to deliver the oxygen to tissues. At the level of MetHb of more than 30%, irreversible changes in vital organs can develop [4]. It is known that methylene blue is used to treat methemoglobinemia. However, it is not always effective and has a number of toxic side effects [4, 5].

Therefore, the search for drugs that can enhance the effectiveness of the antioxidant system of erythrocytes and prevent the formation of ROS and MetHb is always urgent.

Substances containing natural ingredients are of a special interest. One of such drugs is cytoflavin (STPF «POLISAN», Russian Federation). Cytoflavin as a therapeutic category relates to «a metabolic regulator», pharmacological effects of which is regulated by a combined action of the formulation's ingredients: succinic acid, inosine, nicotinamide, riboflavin mononucleotide sodium [8]. Cytoflavin has been shown to serve as a pharmacological agent capable to aid in enhancing the energy formation, decreasing reactive oxygen species (ROS), activating metabolic processes after ischemia and reoxygenation [9, 10].

The aim of the work is to show the feasibility of using of cytoflavin for *in vitro* reduction of excessive methemoglobin to oxyhemoglobin in blood.

Цитофлавин может стимулировать образование энергии; уменьшать образование АФК; активировать метаболические процессы после ишемии и реоксигенации [9, 10].

Цель работы – показать возможность использования антиоксиданта на основе янтарной кислоты для восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина в крови *in vitro*.

Материал и методы

Кровь (150 мкл) брали в микроветты с ЭДТА (Sarstedt AG and Co., Germany) у пяти доноров во время профилактических скринингов.

Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и было одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитации НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского. Согласие было получено от каждого участника до начала исследования.

Параметры гематологии измеряли с помощью гематологического анализатора Advia 60-CT (Bayer, Germany). В исходной крови гематокрит составлял 39–45%, концентрация гемоглобина составляла 110–146 г/л.

Для окисления гемоглобина в крови *in vitro* использовали раствор нитрита натрия NaNO_2 . Для приготовления базового раствора нитрита натрия (раствор *L*) 1.4 г NaNO_2 (Sigma–Aldrich Co. LLC) разбавляли в 10 мл фосфатного буфера (PBS), pH=7.4 (MP Biomedicals, USA). Раствор *S* получали разбавлением раствора *L* в 10 раз. Цитофлавин – комплексное лекарственное средство, содержащее активные вещества – янтарная кислота – 100 г, никотинамид – 10 г, рибоксин (инозин) – 20 г, рибофлавина фосфат натрия (рибофлавин) – 2 г, вспомогательные вещества: мегломин – 165 г, натрия гидроксид – 34 г, вода для инъекций – до 1 литра [8].

Оптическая плотность растворов измерялась с помощью цифрового спектрофотометра Unico 2800 (USA). Измеряли спектр поглощения $D_l(\lambda_l)_{exp}$ суспензии эритроцитов в буфере PBS (pH 7.4) в диапазоне длин волн 500–700 нм с шагом 0.5–1 нм. Здесь λ_l – длины волн света, на которых измеряли оптическую плотность, l – номер длины волны.

Для нахождения концентраций производных гемоглобина использовали метод Nonlinear Fitting [7, 11–13]. Эмпирический спектр $D_l(\lambda_l)_{exp}$ аппроксимировали теоретической кривой $D_l(\lambda_l)_{theor}$, которая наилучшим способом вписывается в экспериментальную кривую. При аппроксимации учитывали поглощение света разными производными гемоглобина. Одновременно учитывались эффекты рэлеевского рассеяния света как на структурах размером $D \ll \lambda$ (коэффициент S), так и на частицах размером $D \gg \lambda$ (коэффициент K):

$$D_l(\lambda_l)_{theor} = \sum_h^n \varepsilon_{h,l}(\lambda_l) C_h L + K + S/\lambda_l^4 \quad (1)$$

Здесь индекс h обозначает производные гемоглобина: HbO_2 (оксигенированный Hb), Hb (дезоксигенированный Hb), MetHb (метгемоглобин), HbNO (нитрозил железа Hb), MetHbNO_2^- (связанный нитритом MetHb), MetHbNO (трехвалентный нитрозил Hb). L – это толщина слоя раствора.

Для расчета концентрации производных гемоглобина был использован метод аппроксимации кривой в программе Origin (OriginLab, Northampton, MA). С помощью Function Builder мы создаем функцию $D_l(\lambda_l)_{theor}$ (уравнение (1)). При этом статус зависимой переменной

Materials and Methods

The blood samples (150 μl) were withdrawn from five donors into microvettes with EDTA (Sarstedt AG and Co., Germany) during prophylactic screenings.

The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by Ethics Committee of Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology. An informed consent was obtained from each participant prior to the study.

Hematology parameters were measured by Hematology Analyzer Advia 60-CT (Bayer, Germany). The baseline hematocrit was 39–45%, the concentration of hemoglobin was 11.0–14.6 g/dl.

For *in vitro* oxidation of hemoglobin in blood, we used sodium nitrite NaNO_2 solution. To make the sodium nitrite stock solution, 1.4 g of sodium nitrite NaNO_2 (Sigma–Aldrich Co. LLC) was diluted in 10 ml of phosphate buffer (PBS) pH=7.4 (MP Biomedicals, USA) to form the «solution *L*». The latter was diluted 10 times to obtain the solution *S*. Cytoflavin (STPF «POLISAN», Russian Federation) is a complex drug containing the following active ingredients: succinic acid 100 g, inosine 20 g, nicotinamide 10 g, riboflavin sodium phosphate (riboflavin) 2 g, and the following excipients: meglumine 165 g, sodium hydroxide 34 g, water for injections qs up to 1 liter [8].

The absorbancy of solutions was measured by a digital spectrophotometer Unico 2800 (USA). The absorption spectra $D_l(\lambda_l)_{exp}$ of erythrocyte suspension in buffer (PBS pH 7.4) was measured at a wavelength range 500–700 nm with 0.5–1 nm increments. Here λ_l stands for the wavelengths of light for which the absorbancy were measured, and l is the number of wavelength.

The Nonlinear Fitting method was used to find the concentrations of hemoglobin derivatives [7, 11–13]. The empirical spectrum $D_l(\lambda_l)_{exp}$ was approximated by the theoretical curve $D_l(\lambda_l)_{theor}$ which fits the experimental curve in the best way. Under approximation, the light absorption by different hemoglobin derivatives was considered. The effects of Rayleigh light scattering on structures with size $D \ll \lambda$ (coefficient S) and light scattering on particles with size $D \gg \lambda$ (coefficient K) were taken into account:

$$D_l(\lambda_l)_{theor} = \sum_h^n \varepsilon_{h,l}(\lambda_l) C_h L + K + S/\lambda_l^4 \quad (1)$$

Here, the index h stands for hemoglobin derivatives: HbO_2 (oxygenated hemoglobin), Hb (deoxygenated hemoglobin), MetHb (methemoglobin), HbNO (ferrous nitrosyl hemoglobin), MetHbNO_2^- (nitrite bound methemoglobin), MetHbNO (ferric nitrosyl hemoglobin). L stands for the thickness of a solution layer.

To calculate the concentration of hemoglobin derivatives, the method of curve approximation was used by means of the Origin software (OriginLab, Northampton, MA). By means of Function Builder, the function $D_l(\lambda_l)_{theor}$ (equation (1)) was created. In this case, the status of dependent variable was assigned to $D_l(\lambda_l)_{exp}$. Parameters of individual absorption at different wavelengths $\varepsilon_{h,l}(\lambda_l)$ were independent variables [10]. Independent concentrations of C_{HbO_2} , C_{Hb} , C_{MetHb} , C_{HbNO} , $C_{\text{MetHbNO}_2^-}$, C_{MetHbNO} , and scattering coefficients K and S were considered model parameters. These model parameters have been chosen in a manner where the theoretical curve $D_l(\lambda_l)_{theor}$ describes the experimental data $D_l(\lambda_l)_{exp}$ the best. In the approximation, the condition that $C_i \geq 0$ must be satisfied.

был присвоен $D_I(\lambda)_\text{exp}$. Индивидуальная поглотительная способность при различных длинах волн $\epsilon_\text{th}(\lambda)$ являлись независимыми переменными [10]. Независимые концентрации C_HbO_2 , C_Hb , C_MetHb , C_HbNO , C_MetHbNO_2 , C_MetHbNO , а также коэффициенты рассеяния K и S рассматривались модельными параметрами. Эти параметры модели подбираются так, чтобы теоретическая кривая $D_I(\lambda)_\text{theor}$ описывала экспериментальные данные $D_I(\lambda)_\text{exp}$ лучшим способом. При аппроксимации должно выполняться условие, что $C_i \geq 0$.

Эксперименты *in vitro* провели по схеме, представленной на рис. 1.

Микроветты со свежей цельной кровью 150 мкл были приготовлены (стадия 1). К каждой микроветте с цельной кровью добавляли 10 мкл растворов NaNO_2 с концентрацией $C=0,14$ г / мл (стадия 2). Поэтому в микроветте концентрация NaNO_2 составляла 100 мМ. Суспензию с этой концентрацией называли NaNO_2 (L). Также исследовали эффекты NaNO_2 с концентрацией 10 мМ NaNO_2 (S). В течение 10 мин инкубации образовался MetHb, и кровь становилась коричневой. Раствор NaNO_2 не добавляли к контрольным микроветтам (контроль). На 3 стадии отмывали суспензии от NaNO_2 . Для этого суспензии с эритроцитами из каждой микроветты переливали в свою соответствующую пробирку эппендорф с 1 мл PBS. Суспензии в пробирках эппендорф центрифугировали (1500 мин^{-1} , 5 мин), затем удаляли надосадочную жидкость и добавляли снова по 1 мл буфера в каждый эппендорф и снова центрифугировали. Таким образом, концентрация NaNO_2 существенно уменьшилась после третьей промывки и была близка к 0. После третьей промывки полный объем суспензии эритроцитов в каждом эппендорфе составлял 150 мкл, что равно исходному объему крови.

Далее в каждый эппендорф добавляли соответствующее количество цитофлавина (стадия 4). Перед добавлением цитофлавина в количестве CYT_i (мкл) удаляли такое же количество буфера CYT_i (мкл) из эппендорфа. Индекса i в записи CYT_i указывает объем цитофлавина (в мкл) в данном эппендорфе.

Приготовление суспензий эритроцитов с цитофлавином провели согласно схеме 2—5 и таблице. Суммарный объем суспензии сохраняли всегда равным 150 мкл. (L/S) обозначает раствор NaNO_2 с концентрацией L или S.

Контрольные суспензии (в них не был добавлен раствор NaNO_2 , но был добавлен цитофлавин) выполняли согласно выражению:

$$75 \text{ RBC} + (75 - \text{CYT}_i) \text{PBS} + \text{CYT}_i (\mu\text{l}) \quad (2)$$

Такие суспензии обозначены как
RBC CYT_i (3)

Исследуемые суспензии (в них был добавлен раствор NaNO_2 и после промывки добавлен цитофлавин) выполняли следующим образом:

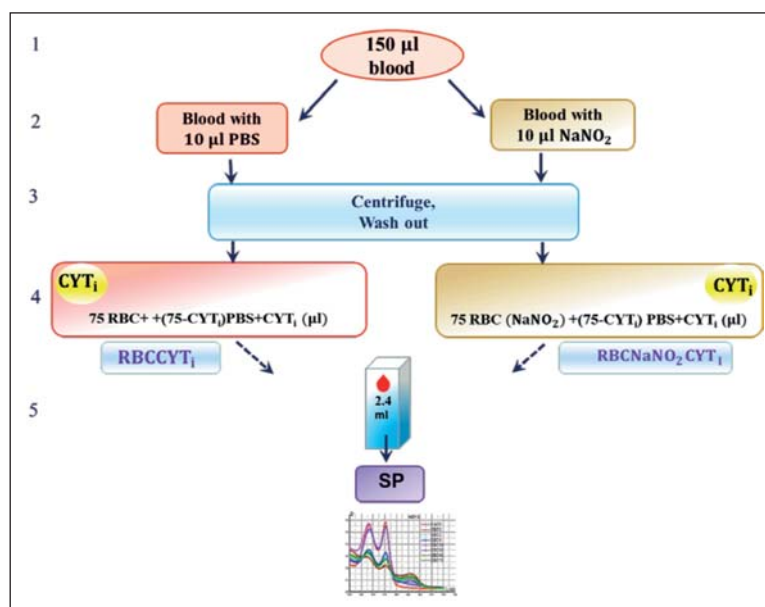


Рис. 1. Схема экспериментов по восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина после добавления цитофлавина.

Fig. 1. The scheme of experiments of reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin after cytoflavin addition.

Note. Stages of the experiments are marked with numbers: 1 — whole blood in microvette; 2 — addition of NaNO_2 solution (10 μl) or PBS, 10 min incubation, formation of MetHb; 3 — elimination of NaNO_2 using triple centrifugation (1500 мин^{-1} , 5 min), and rinsing of RBC in PBS; 4 — addition of cytoflavin or PBS, incubation of suspension for 1–24 h; 5 — measurements of absorption spectra of solutions, calculation of concentrations of hemoglobin derivatives.

Примечание. Стадии экспериментов отмечены цифрами: 1 — цельная кровь в микроветте; 2 — добавление раствора NaNO_2 (10 мкл) или PBS, 10 мин инкубации, образование MetHb; 3 — отмыв от NaNO_2 с помощью тройного центрифугирования (1500 мин^{-1} , 5 мин) и промывание красных клеток крови в PBS; 4 — добавление цитофлавина или PBS, инкубация суспензии в течение 1–24 ч; 5 — измерения спектров поглощения растворов, вычисление концентраций производных гемоглобина.

We carried out experiments *in vitro* according the following scheme (Fig. 1).

Microvettes with fresh whole blood (150 μl) were prepared (stage 1). 10 μl of NaNO_2 solutions with the concentration $C=0.14$ g / ml were added to each microvette with whole blood (stage 2). Therefore, in microvettes, the concentration of NaNO_2 was 100 мМ. The suspensions with this concentration we called NaNO_2 (L). In addition, we studied the effects of NaNO_2 with a concentration of 10 мМ (NaNO_2 (S)). Within 10 min of incubation, MetHb was formed, and blood turned brown. NaNO_2 solution was not added to the reference microvettes (reference sample). In the 3d stage, the suspensions were washed from NaNO_2 . For this, suspension with red blood cells (RBC) from each microvette was added into a corresponding Eppendorf tube with 1 ml of PBS. The suspensions in Eppendorf tubes were centrifuged (1500 мин^{-1} , 5 min), then the supernatant was removed and 1 ml of buffer was added again to each Eppendorf tube, and they were centrifuged again. Thus the concentration of NaNO_2 substantially diminished after the third washing and was close to 0. After the third washing, the total volume of erythrocyte suspension was 150 μl in each Eppendorf tube, which is equal to the baseline volume of blood.

Next, an appropriate amount of cytoflavin was added to each Eppendorf tube (step 4). Before adding cytoflavin

Состав суспензий и их обозначение.**Composition of suspensions and their designations.**

Eppendorf	Suspension	Symbol
1	75 μ l RBC+ +75 μ l PBS	RBC CYT ₀
2	75 μ l RBC NaNO ₂ +75 μ l PBS	RBCNaNO ₂ (L/S)CYT ₀
3	75 μ l RBC + 72.5 μ l PBS + 2.5 μ l CYT	RBC CYT _{2.5}
4	75 μ l RBC NaNO ₂ + 72.5 μ l PBS + 2.5 μ l CYT	RBCNaNO ₂ (L/S)CYT _{2.5}
5	75 μ l RBC+ +70 μ l PBS + 5 μ l CYT	RBC CYT ₅
6	75 μ l RBC NaNO ₂ + 70 μ l PBS + 5 μ l CYT	RBCNaNO ₂ (L/S)CYT ₅
7	75 μ l RBC+ +65 μ l PBS + 10 μ l CYT	RBC CYT ₁₀
8	75 μ l RBC NaNO ₂ + 65 μ l PBS + 10 μ l CYT	RBCNaNO ₂ (L/S)CYT ₁₀

Note. Eppendorf — номера пробирок; Suspension — суспензия; Symbol — обозначение суспензии.

75 RBC NaNO₂ (L/S) + (75-CYT_i) PBS + CYT_i (μ l) (4)

Такие суспензии обозначены как

RBC NaNO₂ (L/S) CYT_i (5)

В опытах величины CYT_i составили:

CYT₀ = 0 μ l CYT, CYT_{2.5} = 2.5 μ l CYT, CYT₅ = 5 μ l CYT, CYT₁₀ = 10 μ l CYT.

В данном случае CYT_i — это объем цитофлавина в 150 мкл суспензии (не концентрации). Для расчета объемной концентрации цитофлавина в каждом эппендорфе можно воспользоваться формулой: CYT_i/150 (мкл/мл).

Гематокрит в эппендорфе почти совпадает с отправной точкой для каждой серии экспериментов с точностью до 10%. Суспензии эритроцитов инкубировали CYT_i в течение от 1 часа до 24 часов, затем измеряли спектры поглощения (стадия 5). Для измерения спектров поглощения $V_{\text{susp}} = 20$ мкл суспензии из эппендорфа добавляли к кварцевой кювете с 2,4 мл PBS и измеряли оптическую плотность. Этот процесс повторяли для суспензии каждого эппендорфа.

Эксперименты с кровью каждого донора проводили по три раза. Для каждого эппендорфа спектр измеряли 3 раза. Так провели 45 серий экспериментов по схеме (рис. 1). В каждой серии измеряли спектры контрольных растворов, а также растворов с разным количеством цитофлавина. Спектры, показанные на рис. 2, типичны для данных концентраций NaNO₂ и CYT_i для крови разных доноров.

Статистический анализ экспериментальных данных провели с использованием программы Origin (OriginLab, Northampton, MA). Для определения неизвестных концентраций производных гемоглобина аппроксимирующую кривую построили по схеме Analysis — Fitting — Nonlinear Curve Fit — the Function (1). В результате аппроксимации, получили параметр *R-Square*, который являлся количественным представлением уровня аппроксимации. Параметр *R-Square* должен быть больше 0,98. Данные представили как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Использовали программу One-Way ANOVA для определения статистической значимости влияния цитофлавина (в разных концентрациях) на снижение *MetHb* по сравнению с автовосстановлением (RBCNaNO₂(L/S)CYT₀). Значимые различия отмечали при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Цитофлавин, введенный в суспензию эритроцитов, способствовал восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина. После добавления NaNO₂ почти весь гемоглобин превращался в мет-

in the amount of CYT_i (μ l), the same amount of buffer CYT_i (μ l) was removed from the Eppendorf tube. The index *i* in CYT_i indicates the volume of cytoflavin (in μ l) in a given Eppendorf tube.

The preparation of suspensions of RBC with cytoflavin was carried out according to scheme 2–5 and Table 1. The total volume of the suspension was always kept at 150 μ l (L/S) means the NaNO₂ solution at a concentration equal *L* or *S*.

Reference solutions (NaNO₂ solution was not added, but cytoflavin was added) were carried out according to the equation:

75 RBC + (75-CYT_i) PBS + CYT_i (μ l) (2)

Such suspensions were designated as

RBC CYT_i (3)

The investigated samples (NaNO₂ solution was added followed by cytoflavin was also added after washing) were carried out according to the equation

75 RBC NaNO₂ (L/S) + (75-CYT_i) PBS + CYT_i (μ l) (4)

Such suspensions were designated as

RBC NaNO₂ (L/S) CYT_i (5)

In our experiments the CYT_i values were as follows:

CYT₀ = 0 μ l CYT,
CYT_{2.5} = 2.5 μ l CYT,
CYT₅ = 5 μ l CYT,
CYT₁₀ = 10 μ l CYT

In this case, CYT_i is not a concentration, but the volume of cytoflavin in 150 μ l of suspension. To calculate the volume concentration of cytoflavin in each Eppendorf tube, we can use the formula: CYT_i/150 (μ l/ml).

Hematocrit in Eppendorf tubes nearly almost coincided with the baseline for each series of experiments at an accuracy of 10%. The RBC suspensions were incubated with CYT_i from 1 hour to 24 hours; then, the absorption spectra were measured (stage 5). For measuring of absorption spectra, $V_{\text{susp}} = 20$ μ l of suspension from Eppendorf tube were added to a quartz cuvette with 2.4 ml of PBS and optical density was measured. This process was repeated for the suspension in each Eppendorf tube.

The experiments for blood taken from each donor were carried out thrice. For each Eppendorf tube, the spectrum was measured thrice. Thus, 45 series of experiments were carried out according to the scheme (Fig. 1). In each series, the spectra of reference solutions as well as of solutions with different amount of cytoflavin were measured. The spectra shown further in Figs. 2 and 3 are typical for

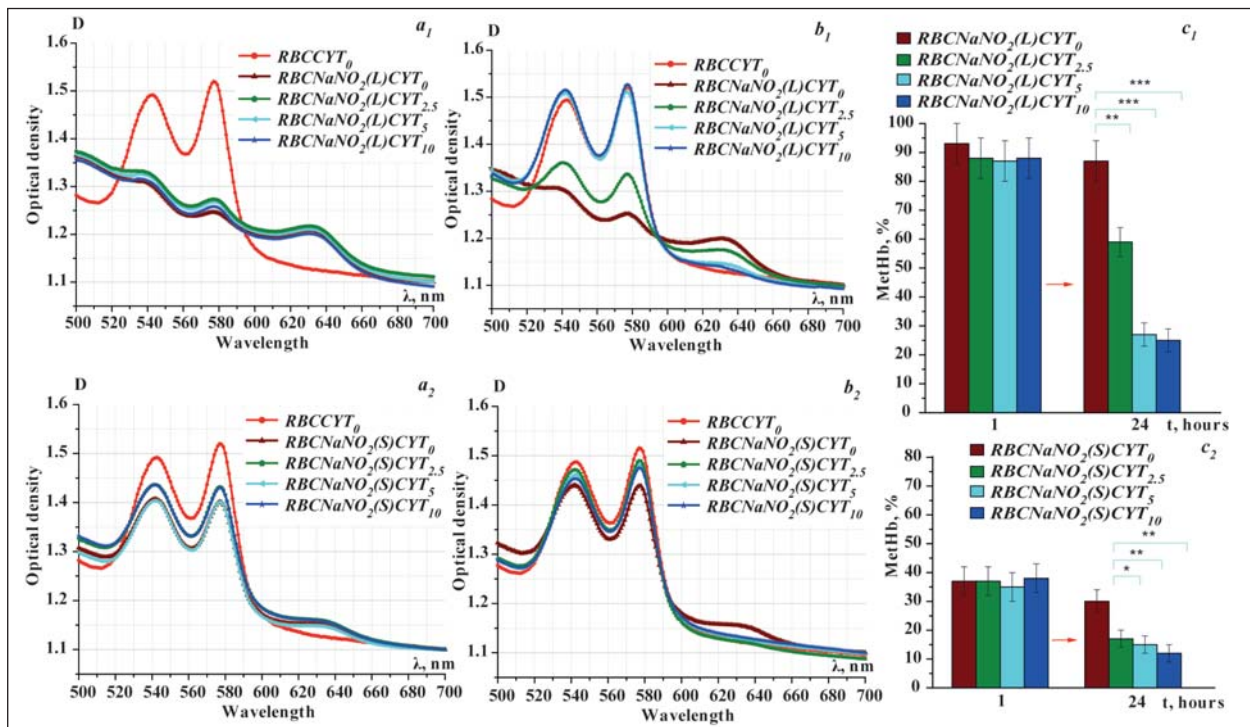


Рис. 2. Спектры поглощения образцов с различными концентрациями цитофлавина и гистограммы MetHb (%) после воздействия NaNO_2 (L/S) и цитофлавина.

Fig.2. Absorption spectra of the samples with different values of cytoflavin & Histograms of MetHb (%) after effect of NaNO_2 (L/S) and cytoflavin.

Note. a_1, b_1, c_1 for NaNO_2 (L); a_2, b_2, c_2 for NaNO_2 (S). Incubation time is: $t_1=1$ hour (a), $t_2=24$ hours (b). Names of curves correspond to equations and signs (2–5); c_1 and c_2 – data for each concentration of cytoflavin $\text{CYT}_{2.5}, \text{CYT}_5, \text{CYT}_{10}$ were compared to corresponding data of CYT_0 (autoreduction) for each incubation timepoint (* – $P<0.05$; ** – $P<0.01$; *** – $P<0.001$).

Примечание. Optical density – оптическая плотность; wavelength – длина волны; hours – часы. a_1, b_1, c_1 – для NaNO_2 (L); a_2, b_2, c_2 – для NaNO_2 (S). Время инкубации $a - t_1=1$ час; $b - t_2=24$ часа. Названия кривых для a, b соответствуют уравнениям и подписам (2–5); c_1 и c_2 – данные для каждой концентрации цитофлавина $\text{CYT}_{2.5}, \text{CYT}_5, \text{CYT}_{10}$ были сопоставлены с соответствующими данными (автосамовосстановление) для каждого времени инкубации (* – $p<0.05$; ** – $p<0.01$; *** – $p<0.001$).

гемоглобин, для которого характерны определенные пики в спектре поглощения. Особенно выделялся пик на длине волны $\lambda=630$ нм. После промыва эритроцитов по-прежнему преобладал MetHb (около 93%).

Добавление разного количества цитофлавина CYT_i привело к изменению спектра поглощения, и при этом наблюдали концентрационную зависимость.

На рис. 2 для NaNO_2 (L) и для NaNO_2 (S) привели спектры поглощения суспензий эритроцитов для контрольной RBCCYT_0 и $\text{RBCNaNO}_2(\text{L/S})\text{CYT}_i$ для различных концентраций цитофлавина – $\text{CYT}_0, \text{CYT}_{2.5}, \text{CYT}_5$ и CYT_{10} после инкубации в течение $t_1=1$ часа и $t_2=24$ часов.

Для суспензии L после 1 часа инкубации с цитофлавином наблюдали спектры, характерные для MetHb для всех образцов (рис. 2, a_1). Можно сделать вывод, что $\text{CYT}_{0,2.5,5,10}$ практически не повлияли на снижение MetHb.

После 24 часов инкубации для образца $\text{RBCNaNO}_2(\text{L})\text{CYT}_0$, в который не добавляли цитофлавин, наблюдали спектр, характерный для MetHb (рис. 2, b_1 коричневая кривая). Произошел

given concentrations of NaNO_2 and CYT_i for blood from different donors.

The statistical analysis of experimental data was performed using the Origin software (OriginLab, Northampton, MA). To determine unknown concentrations of hemoglobin derivatives the fitting curve was constructed according the scheme: Analysis – Fitting – Nonlinear Curve Fit – the Function (1). In resulting approximation, the R -Square parameter, the quantitative representative of the fitting level, was determined. The R -Square parameter should be greater than 0.98. Data are shown as the mean $\pm$ standard deviation. We used One-Way ANOVA for determining statistical significance of effect of cytoflavin in different concentrations on reduction of MetHb in comparison with autoreduction values ($\text{RBCNaNO}_2(\text{L/S})\text{CYT}_0$). Significant differences were reported at $P \leq 0.05$.

Results and Discussion

The experiments demonstrated that cytoflavin administered into a suspension of RBC contributed to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. After addition of NaNO_2 , almost all hemoglobin molecules were transformed to methemoglobin, for which certain peaks in the absorption spectrum were specific. The peak at the wavelength $\lambda=630$ nm was most spe-

процесс автовосстановления [14]. Но он был незначительным – не более 2–10%.

При концентрации цитофлавина $RBCNaNO_2(L)CYT_{2.5}$ стали проявляться пики на длинах волн $\lambda=542$ нм и $\lambda=577$ нм, характерные для HbO_2 (рис. 2, b_1 , зеленая кривая). Однако восстановление $MetHb$ до HbO_2 и Hb было не полным. За это время инкубации восстановилось только 59% метгемоглобина.

Повышение концентрации цитофлавина до CYT_{10} существенно усилило эффект восстановления метгемоглобина в образцах $RBCNaNO_2(L)CYT_5$ (рис. 2, b_1 , голубая кривая) и $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$ (рис. 2, b_1 , синяя линия). Пики, характерные для оксигемоглобина, почти достигли контрольных значений, наблюдаемых в образце $RBCCYT_0$ без воздействия $NaNO_2$ (рис. 2, b_1 , красная кривая). В этом случае уже восстановилось около 25–27% метгемоглобина.

Для суспензий S после 1 часа инкубации во всех образцах наблюдали спектральные характеристики для комбинации различных производных гемоглобина (рис. 2, a_2). Для всех концентраций $CYT_{0.2,5,5,10}$ спектры были приблизительно одинаковыми с небольшим, но очевидным пиком при $\lambda=630$ нм. Это соответствует 30–40% $MetHb$ в суспензиях. После 24 часов инкубации для образца $RBCNaNO_2(S)CYT_0$, в который цитофлавин не добавлялся, этот пик остался неизменным (рис. 2, b_2 , коричневая кривая).

Пики при $\lambda=542$ нм и $\lambda=577$ нм, характерные для HbO_2 , начали увеличиваться для всех образцов с цитофлавином. Для $RBCNaNO_2(L)CYT_5$ (рис. 3, b_2 , голубая кривая) и $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$ (рис. 3, b_2 , синяя кривая) пики, типичные для метгемоглобина, практически исчезли. В этом случае концентрация $MetHb$ снизилась до 10–12%, но наблюдали небольшой пик для $RBCNaNO_2(L)CYT_{2.5}$ (рис. 2, b_2 , зеленая кривая). Это соответствовало 16–18% $MetHb$.

Визуальный эффект влияния цитофлавина на восстановление $MetHb$ до HbO_2 показан на рис. 3.

На фотографиях представлены суспензии L красных клеток крови в PBS, время инкубации эритроцитов с CYT_{10} (или с PBS) составляло $t_1=1$ ч (рис. 3, a) и $t_{24}=24$ ч (рис. 3, b). В течение $t_1=1$ часа инкубация цитофлавина с суспензией эритроцитов не влияла на концентрацию $MetHb$ (рис. 4, a). Суспензия для образца $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$ была по-прежнему коричневой также, как и для образца $RBCNaNO_2(L)CYT_0$ без цитофлавина.

Однако после инкубации в течение $t_{24}=24$ часов суспензия с цитофлавином $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$ покраснела (рис. 3, b), что наглядно показывает, что в суспензии произошел процесс восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина. В то же время суспензия $RBCNaNO_2(L)CYT_0$ без цитофлавина осталась коричневой – процесс самовосстановления почти отсутствовал. Контрольная суспензия $RBCC_0$ без добавления $NaNO_2$ и цитофлавина была красной

сифи. Following washing of red blood cells, $MetHb$ still prevailed (about 93%).

The addition of different amount of cytoflavin (CYT_i) resulted in changing the absorption spectra, and the concentration dependence was observed.

Absorption spectra of RBC suspensions for reference $RBCCYT_0$ and $RBCNaNO_2(L/S)CYT_i$ for various concentrations of cytoflavin – $CYT_0, CYT_{2.5}, CYT_5$ and CYT_{10} after incubation during $t_1=1$ hour and $t_{24}=24$ hours are shown in Fig. 2 for $NaNO_2(L)$ and $NaNO_2(S)$.

For suspensions L after 1 hour of incubation with cytoflavin, spectra typical for $MetHb$ were observed for all samples (Fig. 2, a_1). It can be concluded that $CYT_{0.2,5,5,10}$ almost did not affect the reduction of $MetHb$.

After 24 hours of incubation, for the sample $RBCNaNO_2(L)CYT_0$, in which cytoflavin was not added, a spectrum typical for $MetHb$ (Fig. 2, b_1 brown curve) was observed. The process of autoreduction occurred [14], however it was insignificant.

The peaks at $\lambda=542$ nm and $\lambda=577$ nm characteristic for HbO_2 (Fig. 2, b_1 , green curve) began to appear for a sample with cytoflavin $RBCNaNO_2(L)CYT_{2.5}$. However, the reduction of $MetHb$ to HbO_2 and Hb was incomplete. During this time of incubation, only 59 % of methemoglobin was reduced.

An increase in concentration of cytoflavin to CYT_{10} significantly enhanced the effect of reduction of methemoglobin in samples $RBCNaNO_2(L)CYT_5$ (Fig. 2, b_1 , cyan curve) and $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$ (Fig. 2, b_1 , blue curve). The peaks characteristic for oxyhemoglobin almost reached the reference values observed in sample $RBCCYT_0$ without the impact of $NaNO_2$ (Fig. 2, b_1 red curve). In this case methemoglobin was already reduced to about 25–27%.

As for suspensions S after 1 hour of incubation, spectra characteristics for a combination of different hemoglobin derivatives (Fig. 2, a_2) were observed for all samples. For all concentrations of $CYT_{0.2,5,5,10}$, spectra were approximately the same with a small but obvious peak at $\lambda=630$ nm. This peak corresponded to 30–40% of $MetHb$ in suspensions. After 24 hours of incubation, for the sample $RBCNaNO_2(S)CYT_0$ in which cytoflavin was not added, this peak remained the same (Fig. 2, b_2 , brown curve).

The peaks at $\lambda=542$ nm and $\lambda=577$ nm typical for HbO_2 began to increase for all samples with cytoflavin. For $RBCNaNO_2(L)CYT_5$ (Fig. 2, b_2 , cyan curve) and $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$ (Fig. 2, b_2 , blue curve), the peaks typical for methemoglobin almost disappeared. In this case, the concentration of $MetHb$ decreased to 10–12%. However, only small peak was observed for $RBCNaNO_2(L)CYT_{2.5}$ (Fig. 2, b_2 , green curve). This peak corresponded to 16–18% of $MetHb$.

A visual image of the effect of cytoflavin on the reduction of $MetHb$ to HbO_2 is shown in Fig. 3.

Fig. 3 shows suspensions L of RBC in PBS. The incubation time of RBC with CYT_{10} (or with PBS) was

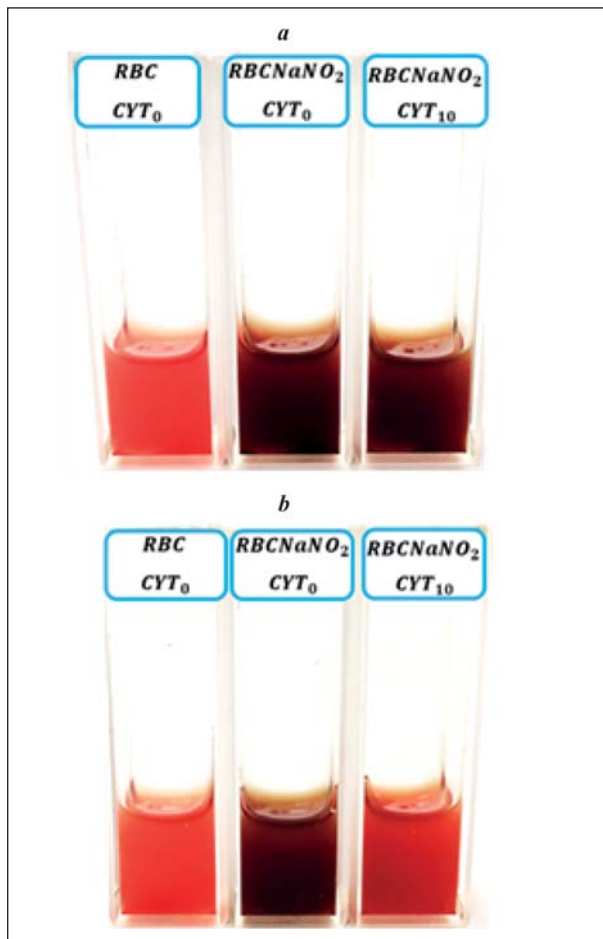


Рис. 3. Фотографии суспензий красных клеток крови в кварцевых кюветках после добавления NaNO_2 и цитофлавина.

Fig. 3. Suspensions of red blood cells in quartz cuvettes after addition of NaNO_2 and cytoflavin.

Note. 1 h (a) and 24 h (b). Notes under the cuvettes correspond to different concentrations of NaNO_2 and cytoflavin in accordance with equations 2–5.

Примечание. 1 ч (a) и 24 ч (b). Названия кювет соответствуют различным концентрациям NaNO_2 и цитофлавина в соответствии с уравнениями 2–5.

как исходно, так и через 24 часа.

Эти фотографии качественно иллюстрируют эффект изменения концентраций производных гемоглобина. Они соответствуют количественным результатам экспериментов и расчетов.

Во время реакций возможно образование следующих производных гемоглобина HbO_2 , Hb , MetHb , HbNO , MetHbNO_2 , MetHbNO . Был использован метод аппроксимации кривой. Экспериментальные зависимости $D_l(\lambda_l)_{\text{exp}}$ и аппроксимированные кривые $D_l(\lambda_l)_{\text{teor}}$ представлены на рис. 4:

$$D_l(\lambda_l)_{\text{teor}} = \varepsilon_{\text{HbO}_2, l} C_{\text{HbO}_2} L + \varepsilon_{\text{Hb}, l} C_{\text{Hb}} L + \varepsilon_{\text{MetHb}, l} C_{\text{MetHb}} L + \varepsilon_{\text{HbNO}, l} C_{\text{HbNO}} L + \varepsilon_{\text{MetHbNO}_2, l} C_{\text{MetHbNO}_2} L + \varepsilon_{\text{MetHbNO}, l} C_{\text{MetHbNO}} L + K + S/\lambda_l^2 \quad (6)$$

Концентрации шести производных гемоглобина были определены аппроксимацией экспери-

$t_1=1$ hour (Fig. 3, a) and $t_{24}=24$ hours (Fig. 3, b). During $t_1=1$ hour the incubation of cytoflavin with RBC suspension did not affect the concentration of MetHb (Fig. 3, a). The suspension $\text{RBCNaNO}_2(L)\text{CYT}_{10}$ continued to keep a brown color similar to specimen $\text{RBCNaNO}_2(L)\text{CYT}_0$ without cytoflavin.

However, after incubation for $t_{24}=24$ hours, the suspension with cytoflavin $\text{RBCNaNO}_2(L)\text{CYT}_{10}$ turned red (Fig. 3, b) that clearly demonstrated the process of reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin in the suspension. The suspension $\text{RBCNaNO}_2(L)\text{CYT}_0$ without cytoflavin remained brown, i. e. the process of autoreduction was almost absent. Reference suspension RBCC_0 without addition of NaNO_2 and cytoflavin was red at a baseline and in 24 hours.

These images qualitatively illustrate the effect of changes in the concentrations of hemoglobin derivatives that is in good agreement with the quantitative results of experiments.

During reactions, the formation of the following hemoglobin species are possible: HbO_2 , Hb , MetHb , HbNO , MetHbNO_2 , MetHbNO . Curve fitting method was used. Experimental relations $D_l(\lambda_l)_{\text{exp}}$ and fitted curves $D_l(\lambda_l)_{\text{teor}}$ are presented in Fig. 4:

$$D_l(\lambda_l)_{\text{teor}} = \varepsilon_{\text{HbO}_2, l} C_{\text{HbO}_2} L + \varepsilon_{\text{Hb}, l} C_{\text{Hb}} L + \varepsilon_{\text{MetHb}, l} C_{\text{MetHb}} L + \varepsilon_{\text{HbNO}, l} C_{\text{HbNO}} L + \varepsilon_{\text{MetHbNO}_2, l} C_{\text{MetHbNO}_2} L + \varepsilon_{\text{MetHbNO}, l} C_{\text{MetHbNO}} L + K + S/\lambda_l^2 \quad (6)$$

Concentrations of six hemoglobin derivatives were identified by best approximation of the experimentally measured spectra by theoretical curves.

Fig. 4, a and Fig. 4, b show good approximation of experimental spectra by theoretical curves for calculated concentrations of hemoglobin derivatives.

The kinetics of reduction of hemoglobin derivatives in the presence of cytoflavin was studied in the experiments (Fig. 5) once every 3 hours during 24 hours of incubation (suspension L). The dependences of changes in hemoglobin derivatives concentrations with $c \text{ Fe}^{3+} - \text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$ are shown in Fig. 5, a. The dependences of changes in hemoglobin derivatives concentrations with $\text{Fe}^{2+} - \text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$ are shown in Fig. 5, b.

Cytoflavin increased the concentration of Fe^{2+} hemoglobin derivatives and decreased concentration $\text{Fe}^{3+} \text{Hb}$.

Importantly, the action of cytoflavin developed gradually over time. This was demonstrated by the kinetics of the level of significance. For each incubation timepoint, data for each concentration of cytoflavin $\text{CYT}_{2.5}$, CYT_5 , CYT_{10} were compared to corresponding data of CYT_0 (autoreduction). At timepoints $t_1=1$ hour and $t_3=3$ hours, there were no significant differences in a drug action at all concentrations of cytoflavin.

At time $t_6=6$ hours there was no significant difference for suspension with $\text{CYT}_{2.5}$, but significant differences appeared for CYT_5 and CYT_{10} at $*$ — $P<0.05$. At a timepoint t_9 (9 hours) the levels of significance

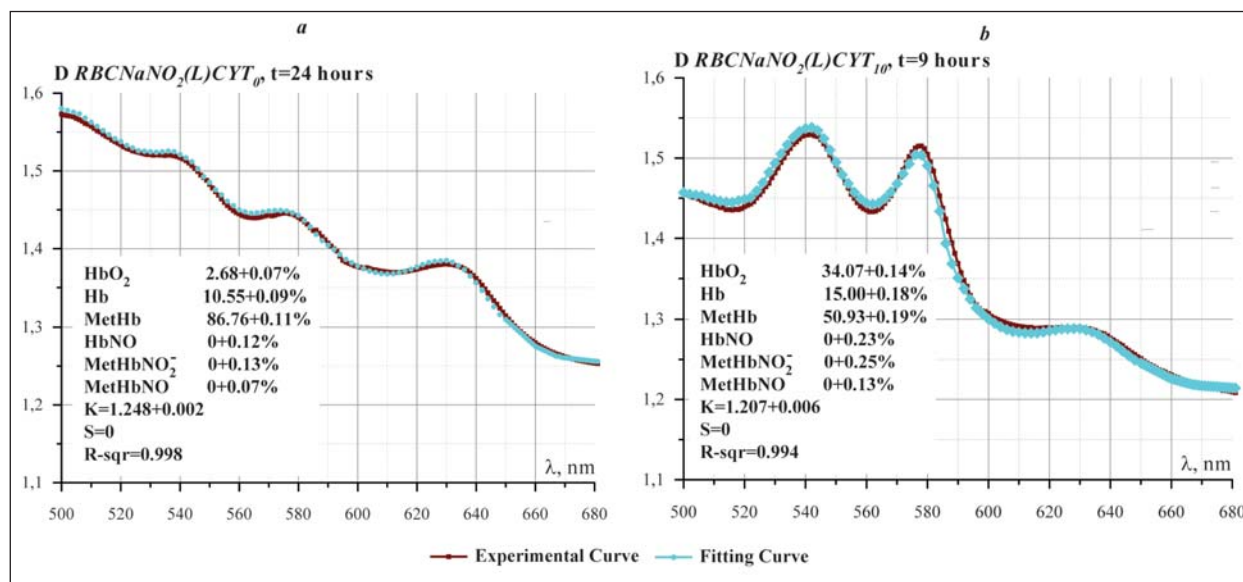


Рис. 4. Сравнение экспериментальных $D_1(\lambda)_{\text{exper}}$ и аппроксимированных кривых $D_1(\lambda)_{\text{theor}}$ с учетом расчетных концентраций производных гемоглобина.

Fig. 4. Comparison of experimental $D_1(\lambda)_{\text{exper}}$ and fitting curves $D_1(\lambda)_{\text{theor}}$ considering the calculated concentrations of hemoglobin species.

Note. Concentrations of hemoglobin species are shown; calculations were made by the curve fitting method. (a) CYT_0 , t_{24} =24 hours, 87% *MetHb*, *R-Square*=0.998. (b) CYT_{10} , t_9 =9 hours. There was a partial reduction of methemoglobin, 51% *MetHb*, *R-Square*=0.994.

Примечание. Концентрации производных гемоглобина показаны на каждом графике, они были рассчитаны методом аппроксимации кривой. а — CYT_0 , t_{24} =24 ч. Наблюдается 87% *MetHb*, *R-Square*=0.998; б — t_9 =9 ч. Произошло частичное восстановление метгемоглобина до 51%, *R-Square*=0.994.

ментально измеренных спектров теоретическими кривыми.

На рис. 4, а и рис. 4, б показана аппроксимация экспериментальных спектров теоретическими кривыми для расчетных концентраций производных гемоглобина.

Через каждые 3 часа в течение 24 часов инкубации в экспериментах изучали кинетику восстановления производных гемоглобина в присутствии цитофлавина (рис. 5) для суспензии L. На рис. 5, а представлены зависимости изменения концентраций производных гемоглобина с Fe^{3+} — *MetHb* + *MetHbNO₂⁻* + *MetHbNO*. На рис. 5, б представлены зависимости изменения концентраций производных гемоглобина с Fe^{2+} — *HbO₂* + *Hb* + *HbNO*.

Цитофлавин увеличивал концентрацию производных гемоглобина с Fe^{2+} и, соответственно, уменьшал концентрацию с Fe^{3+} .

Важно, что действие цитофлавина постепенно развивалось со временем. Это может быть продемонстрировано кинетикой уровня значимости. Данные для каждой точки времени инкубации при определенной концентрации цитофлавина $CYT_{2.5}$, CYT_5 , CYT_{10} сравнивали с соответствующими данными CYT_0 (автовосстановление). В моменты времени t_1 =1 час и t_3 =3 часа не было существенных различий в эффекте препарата при всех концентрациях цитофлавина.

В момент времени t_6 =6 часов не было выявлено никаких существенных различий для суспензии с $CYT_{2.5}$, но для CYT_5 и CYT_{10} появились существен-

ные различия — $P<0.001$ для CYT_5 и CYT_{10} . The drug effects at $CYT_{2.5}$ also increased, $** - P<0.01$.

Fig. 2 represents histograms of the *MetHb* percentage in suspensions of the L series (Fig. 2, a) and S series (Fig. 2, b) depending on different concentrations of *NaNO₂* and corresponding different baseline levels of methemoglobin. At t_1 =1 hour, there were no significant differences between *MetHb* levels for all concentrations of cytoflavin ($CYT_{2.5}$, CYT_5 and CYT_{10}) compared to CYT_0 (Fig. 2). After t_{24} =24 hours, for both series, there were significant differences between group with cytoflavin and control suspensions with no drug. Moreover, significance level was different for different concentrations of cytoflavin: (a) for $CYT_{2.5}$ * — $P<0.05$ (for S) and ** — $P<0.01$ (for L); (b) for CYT_5 and CYT_{10} , ** — $P<0.01$ (for S) and *** — $P<0.001$ (for L).

There were no statistical differences between values of *MetHb* (%) due to autoreduction in samples after 24 hours and 1 hour, $P=0.4$.

In a separate experiment, it was shown that under the action of cytoflavin, the excessive methemoglobin is converted to oxyhemoglobin and not to carboxyhemoglobin. The standard methods based on the use of sodium dithionite were employed in this experiment. After addition of dithionite, the spectral parameters specific for oxyhemoglobin disappeared, and the spectrum appeared to exhibit only one maximum typical for deoxyhemoglobin at $\lambda=554$ nm.

The high level of *MetHb* can be reached at poisonings with aniline and its derivatives, some local

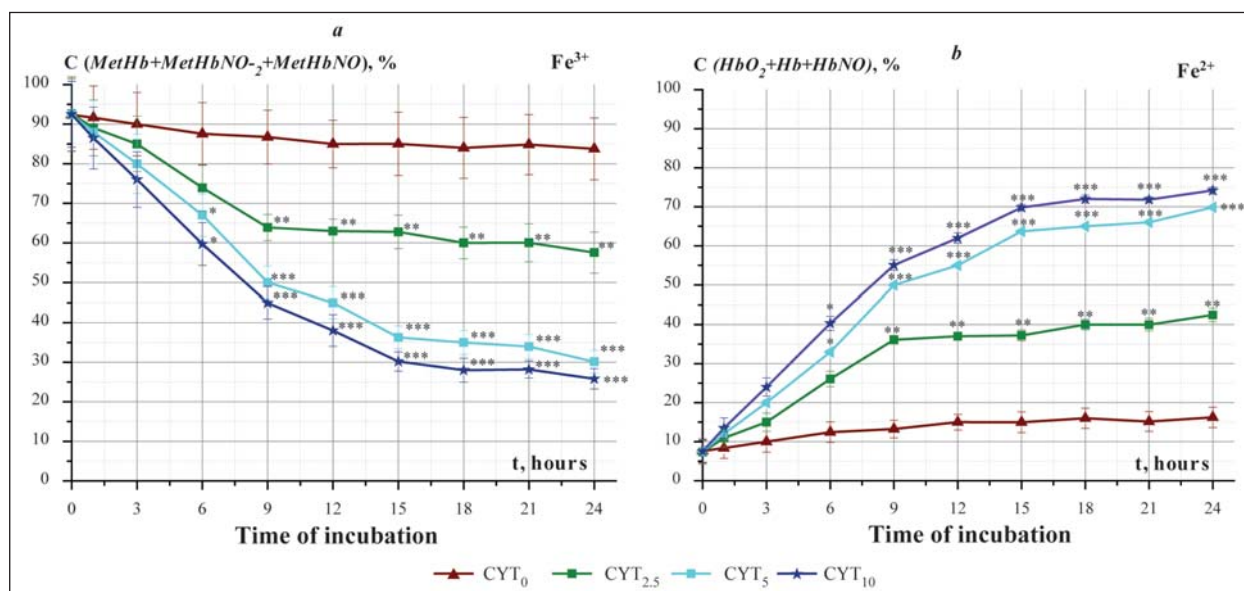


Рис. 5. Кинетика изменения производных гемоглобина при различных концентрациях цитофлавина при NaNO_2 (L).

Fig. 5. Kinetics of changes of hemoglobin derivatives for different concentrations of cytoflavin, for NaNO_2 (L).

Note. *a* — Species with Fe^{3+} ($\text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$); *b* — Species with Fe^{2+} ($\text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$). Data represent three independent experiments for each of five donors, each point is the mean, standard error of the mean is displayed as error bars. For each timepoint, the data obtained for each concentration of cytoflavin $\text{CYT}_{2.5}$, CYT_5 , CYT_{10} were compared to corresponding data of CYT_0 (autoreduction) (* — $P < 0.05$; ** — $P < 0.01$; *** — $P < 0.001$).

Примечание. *a* — производные с Fe^{3+} ($\text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$) не способные нести кислород; *b* — производные с Fe^{2+} , способные переносить кислород ($\text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$). Данные взяты из трех независимых экспериментов для каждого из пяти доноров, каждая точка — среднее значение, стандартная ошибка среднего значения отображается, как полосы ошибок. При каждом времени инкубации данные для каждой концентрации цитофлавина $\text{CYT}_{2.5}$, CYT_5 , CYT_{10} были сопоставлены с соответствующими данными CYT_0 (автовосстановление) (* — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$).

ные различия при * — $p < 0.05$. И к $t_9 = 9$ часам уровень значимости стал *** — $p < 0.001$ для CYT_5 и CYT_{10} . Также был увеличен эффект при использовании концентрации препарата $\text{CYT}_{2.5}$, ** — $p < 0.01$.

На рис. 2 представлены гистограммы процента MetHb в суспензиях серии L (рис. 2, c_1) и S (рис. 2, c_2) в зависимости от разных концентраций NaNO_2 и соответствующего различного начального содержания метгемоглобина. При $t_1 = 1$ час не было существенных различий между содержанием MetHb для всех концентраций цитофлавина — $\text{CYT}_{2.5}$, CYT_5 и CYT_{10} относительно CYT_0 (рис. 2). Но после $t_{24} = 24$ часа для обеих серий наблюдали существенные различия между данными для образцов с цитофлавином по сравнению с суспензиями без него. Более того, уровень значимости не был одинаковым для разных концентраций цитофлавина. Поэтому для $\text{CYT}_{2.5}$ * — $p < 0.05$ (для S) и ** — $p < 0.01$ (для L). В то же время для CYT_5 и CYT_{10} ** — $p < 0.01$ (для S) и *** — $p < 0.001$ (для L).

Не было статистических различий между средними значениями MetHb (%) из-за автовосстановления в образцах через 24 часа и 1 час, $p < 0.4$.

В отдельном эксперименте было показано, что метгемоглобин с помощью цитофлавина превращается именно в оксигемоглобин, а не в карбоксигемоглобин. Для доказательства применили стандартную методику, основанную на использовании дитионита натрия. После добавления дитионита характерные для оксигемоглобина параметры спек-

anesthetics, nitrites and nitrates [1, 3, 6]. Due to the development of the pharmaceutical and chemical industries, the methemoglobinemia of the exogenous origin occurs more often [15].

In our experiments, hemoglobin was converted into methemoglobin when erythrocyte suspension was exposed to NaNO_2 , and as a result, there was a conversion $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$. Under such conditions, the formation of following hemoglobin derivatives becomes possible: with iron Fe^{3+} (et $\text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$) or Fe^{2+} ($\text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$) in the solution [16]. Only HbO_2 of these 6 components is capable to deliver the oxygen to the tissues whereas Hb is potentially capable to attach oxygen. Oxidative processes in the blood lead to tissue hypoxia, to shape changes of RBC and to distortion of the membrane nanostructure [17–19]. Exact manner in which all these derivatives of hemoglobin interact with one another is not clear enough. For example, possible reduction reactions were shown in work [20]. The change in the forms of hemoglobin was investigated not only *in vitro*, but also *in vivo* [2, 3, 14]. Reactions of conversion $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ and $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ are associated with redox processes in the RBC. Therefore, the addition of pharmaceuticals to the RBC suspension, which affects the redox processes, may also affect the interactions of hemoglobin derivatives. As a result, the ratio of the concentrations of hemoglobin derivatives changes significantly. Earlier we have shown that perfluorocarbon com-

тра исчезали, а спектр имел только один максимум, характерный для дезоксигемоглобина при $\lambda=554$ нм.

Высокое содержание *MetHb* в крови может возникать при отравлении анилином и его производными, некоторыми местными анестетиками, нитритами и нитратами [1, 3, 6]. В связи с развитием фармацевтической и химической промышленности метгемоглобинемия экзогенной обусловленности встречается очень часто [15].

В наших опытах гемоглобин превращался в метгемоглобин при действии NaNO_2 на суспензию эритроцитов: при этом Fe^{2+} переходит в Fe^{3+} . В таких условиях возможно образование производных гемоглобина с железом Fe^{3+} : $\text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$. Также в растворе могут содержаться и производные с Fe^{2+} : $\text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$ [16]. Из этих 6 компонентов только HbO_2 переносит кислород и только Hb потенциально способен присоединить кислород. Нарушение окислительных процессов в крови ведет к гипоксии тканей, изменению форм и наноструктуры мембран красных клеток крови [17–19]. Характер взаимодействия производных гемоглобина пока недостаточно ясен. Например, возможные реакции восстановления Fe^{3+} в Fe^{2+} были показаны в работе [20]. Изменение форм гемоглобина было исследовано не только *in vitro*, но также *in vivo* [2, 3, 14]. Реакции превращения $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ и $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ так или иначе связаны с окислительно-восстановительными процессами в эритроцитах. Поэтому добавление в суспензию эритроцитов химфармпрепаратов, способных влиять на окислительно-восстановительные процессы, может также влиять и на процессы взаимодействия производных гемоглобина. В результате соотношение их концентраций может существенно измениться. Ранее нами было показано, что восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина способствуют перфторуглеродные соединения [7].

Положительное действие цитофлавина на организм человека при кардиохирургических операциях, в послеоперационный период, при последствиях инфаркта мозга известно с 2004 года. Цитофлавин имеет цитопротекторный эффект. Он является метаболическим регулятором. Этот препарат оказывает антиоксидантное и антигипоксическое действие, положительное влияние на выработку энергии в клетке, уменьшает образование свободных радикалов и восстанавливает активность антиоксидантных ферментов. Цитофлавин обладает антиишемическим действием, улучшает коронарный и церебральный кровоток, ограничивает зону некроза [9, 10, 21–23].

В работе [10] приведены клинические результаты антиокислительного действия цитофлавина на организм человека. Представляет научный интерес показать действие цитофлавина на гемоглобин в прямом биофизическом эксперименте *in vitro*. Это может позволить в дальнейшем раскрыть механизмы антиокислительного действия этого препарата.

pounds contribute to reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin [7].

It could be particularly useful, however, to study biomimetic pharmaceuticals, which are similar to natural, functionally significant components of the body. The positive effect of cytoflavin on the human body is known since 2004 due to clinical use in cardiosurgeries, postsurgery and after cerebral infarctions and other cerebrovascular diseases. Cytoflavin provided a cytoprotective effect. It is a metabolic regulator. This drug has an antioxidant and antihypoxic action, exerting a positive effect on energy production in cells reducing the production of free radicals and restoring antioxidant enzyme activity. Cytoflavin has an anti-ischemic effect, improves coronary and cerebral blood flow limiting the zone of necrosis [9, 10, 21–23].

Clinical results of the studies of the antioxidant effect of cytoflavin in the human body are presented in a publication [10]. It was of interest to investigate the effect of cytoflavin on hemoglobin in a direct experiment *in vitro*. Further, these studies may reveal the mechanisms of antioxidant action of this drug.

Pharmacological effects of cytoflavin are regulated by the combined action of several components of the formulation as described [8, 9]. The complex formulation is composed of two metabolites (succinic acid and inosine) and two coenzymes (riboflavin mononucleotide and nicotinamide). The pharmacological effects of each component are well-known. Each component contributes to the redox processes in the RBC suspension.

Succinic acid is a key biochemical molecule. It is employed for energy metabolism in plants, human and animal tissue representing an intermediate in the Krebs cycle. Studies have shown, however, that the role of succinic acid goes far beyond energy processes. Antihypoxic and antioxidant effects of succinic acid have also been demonstrated [9, 25].

Inosine is used in to improve the quality of the donor blood components during long-term storage [26]. Nicotinamide has been included as a component of a composition for cryopreservation. Nicotinamide is employed for membrane stabilization and fluidity [27]. Riboflavin mononucleotide sodium (FMN-Na, Flavin mononucleotide) plays an important role in oxidation-reduction reactions. Riboflavin is a water soluble vitamin, also known as Vitamin B2. In the body, riboflavin is primarily found as an integral component of the coenzyme, one of which is riboflavin mononucleotide sodium. There is a significantly impaired relationship between plasma riboflavin mononucleotide sodium and riboflavin in patients with critical illness [28]. Flavins act as a cofactor in many enzymes and catalyse a wide variety of biological reactions due to one of the most versatile *in vivo* redox centers in its structure. Organic redox active materials dissolved in electrolyte materials have received increasing interest

Фармакологические эффекты цитофлавина регулируются совместным действием составляющих его ингредиентов [8, 9]. Этот комплексный препарат состоит из двух метаболитов (янтарной кислоты и инозина) и двух коферментов (моноклеотида рибофлавина и никотинамида). Широко известно фармакологическое действие каждого компонента по отдельности. Каждая компонента способна внести вклад в окислительно-восстановительные процессы, происходящие в суспензии красных клеток крови.

Янтарная кислота является ключевой биохимической молекулой. Природа использует ее для энергетического метаболизма в растениях, тканях человека и животных. Янтарная кислота является промежуточным продуктом цикла Кребса. Исследования показали, что роль янтарной кислоты выходит далеко за пределы энергетических процессов. Также известно антигипоксическое и антиоксидантное действие янтарной кислоты [9, 25].

Инозин используют в растворах с целью повышения качества компонент донорской крови при длительном хранении [26].

Никотинамид, предназначенный для стабилизации мембраны эритроцитов и текучести крови [27], включен в состав для криоконсервации.

Моноклеотид рибофлавина натрия (FMN-Na, моноклеотид флавина) играет важную роль в окислительно-восстановительных реакциях. Рибофлавин – это водорастворимый витамин, также известен как витамин В2. В организме рибофлавин встречается прежде всего как неотъемлемый компонент ко-ферментов, одним из которых является моноклеотид рибофлавина натрия. Существует значительное нарушение соотношения между плазменным моноклеотидом рибофлавина натрия и рибофлавином у пациентов в критических состояниях [28]. Флавины действуют как кофактор во многих ферментах, которые катализируют самые разнообразные биологические реакции и содержат один из самых универсальных окислительно-восстановительных центров *in vivo*. Использование органических окислительно-восстановительных активных веществ, растворенных в электролитах, приобретает все больший интерес для создания стабильной биомиметической системы аккумуляции энергии – окислительно-восстановительных батарей [29].

Таким образом все 4 компонента цитофлавина могут внести вклад в окислительно-восстановительные процессы, происходящие с производными гемоглобина. Возможно, их комбинированное действие и привело к явлению восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина в присутствии цитофлавина. При этом возможно два пути влияния цитофлавина на процессы превращений железа $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$.

Непосредственное химическое участие молекул компонент цитофлавина в цепочках окислительно-восстановительных процессов. Это влияние

for creation of stable biomimetic energy storage system, i.e. redox flow batteries [29].

All four components of cytoflavin are capable to contribute to redox properties of hemoglobin derivatives. Presumably, a combined effect of cytoflavin components might lead to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin in the presence of cytoflavin. In this case, there are two possible ways of the influence of cytoflavin on the processes of iron conversion $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$.

Direct chemical involvement of cytoflavin components in a redox processes is possible. This influence can be similar to that of methylene blue or ascorbic acid used in the treatment of methemoglobinemia [5].

Binding of cytoflavin components to active oxidation centers, thereby participating in the inhibition of oxidation processes.

To calculate the concentrations of hemoglobin derivatives, the Nonlinear Fitting method was used for the approximation of the experimental spectra. Good agreement between the theoretical data and the experimental data with the coefficient *R-Square* ≥ 0.99 was obtained. The theoretical data agreed not only in the description of the spectrum, but also in the estimation of the residual *K* level.

The antioxidant property of cytoflavin was demonstrated in our work for the first time in a direct biophysical *in vitro* experiment. For this purpose, blood from healthy donors was used as control exhibiting initially normal concentration of oxyhemoglobin and methemoglobin. The situation of using already initially poisoned blood containing a large amount of methemoglobin was excluded. The use of cytoflavin in this model experiment led to the reduction of excessive methemoglobin to oxyhemoglobin. In this case, the reduction effect of cytoflavin occurred only if the methemoglobin was located inside the cell. The effect of $NaNO_2$ on free hemoglobin in distilled water led to the appearance of methemoglobin. However, in this case, the addition of cytoflavin did not result in a reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. This interesting phenomenon will be studied in details in future experiments.

Performed experiments might contribute to future studies validating the role of cytoflavin in blood recovery after acute poisoning. Clarifying the role of separate components of the drug would contribute to mechanistic studies of cytoflavin action.

Conclusion

The revealed effects may have a fundamental and practical application. Based on results with cytoflavin it would be possible to study and develop pharmacological methods for reduction Fe^{3+} to Fe^{2+} in blood. Cytoflavin can be used directly in treatment of methemoglobinemia in clinics. It would be

может быть аналогично действию метиленового синего или аскорбиновой кислоты, используемых при лечении метгемоглобинемии [5].

Связывание компонентов цитофлавина с активными окислительными центрами обеспечивает участие в ингибировании процессов окисления.

Для расчетов концентраций производных гемоглобина использован метод Nonlinear Fitting для обработки экспериментальных спектров. Получено хорошее согласование теоретических данных с экспериментальными с коэффициентом $R\text{-Square} \geq 0,99$. Теоретические данные согласованы не только в описании спектра, но и в оценке остаточного уровня K .

В нашей работе впервые показано антиокислительное свойство цитофлавина в прямом биофизическом эксперименте *in vitro*. Кровь от здоровых доноров использовали для того, чтобы изначально иметь нормальную концентрацию оксигемоглобина и метгемоглобина. Использование цитофлавина в данном модельном эксперименте привело к восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина. При этом восстанавливающий эффект цитофлавина происходит только, если метгемоглобин находится внутри клетки. Воздействие NaNO_2 на свободный гемоглобин в дистиллированной воде приводило к возникновению метгемоглобина. Однако добавление цитофлавина в этом случае не приводило к восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина. Это

also important to validate the use of the drug during the storage of donor blood, in blood transfusion and for the development of blood substitutes. Clarification of the molecular mechanisms of the protective action of cytoflavin and determining its protective patterns when using various chemical oxidants seems a promising area of translational studies.

интересное явление будет детально изучено в будущих экспериментах.

Проделанные нами эксперименты могут стать основой для исследования возможности использования цитофлавина для восстановительных процессов в крови пациентов с острыми отравлениями, также планируется изучить действие отдельных компонент на этот процесс.

Заключение

Показанный эффект может иметь как фундаментальное, так и практическое применение. Цитофлавин может быть использован непосредственно при лечении метгемоглобинемии в клинике. Также важно будет использовать его во время хранения донорской крови, при проведении гемотрансфузии и при разработке кровезаменителей. Весьма перспективным также является изучение молекулярных механизмов протекторного действия цитофлавина при широком спектре экзогенных отравлений.

Литература

1. Bradberry S.M. Occupational methaemoglobinaemia. Mechanisms of production, features, diagnosis and management including the use of methylene blue. *Toxicol. Rev.* 2003; 22 (1): 13-27. DOI: 10.2165/00139709-200322010-00003. PMID: 14579544
2. Kohn M.C., Melnick R.L., Ye F., Portier C.J. Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug. Metab. Dispos.* 2002; 30 (6): 676–683. DOI: 10.1124/dmd.30.6.676. PMID: 12019195
3. Lee J., El-Abaddi N., Duke A., Cerussi A.E., Brenner M., Tromberg B.J. Non-invasive *in vivo* monitoring of methemoglobin formation and reduction with broadband diffuse optical spectroscopy. *J. Appl. Physiol.* 2006; 100 (2): 615–622. DOI: 10.1152/japplphysiol.00424.2004. PMID: 16223982
4. Minami M., Katsumata M., Tomoda A. Methemoglobinemia with oxidized hemoglobins and modified hemoglobins found in bloods of workers handling aromatic compounds and in those of a man who drank cresol solution. *Biomed. Biochim. Acta.* 1990; 49 (2-3): S327-S333. PMID: 2386523
5. Greenberg M.I. Methylene Blue: fast-acting antidote for methemoglobinemia. *Emerg. Med. News.* 2001; 23 (9): 26. DOI: 10.1097/01.EEM.0000292322.94148.37
6. Skold A., Cosco D.L., Klein R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *South Med. J.* 2011; 104 (11): 757–761. DOI: 10.1097/SMJ.0b013e318232139f. PMID: 22024786
7. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavialova A., Kuzovlev A. Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1): 88-95. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.11.035. PMID: 26626224
8. CYTOFLAVIN solution for intravenous use. http://eng.polysan.ru/cytoflavin_amp.htm
9. Tiuriaeve I.I., Kuranova M.L., Gonchar I.V., Rozanov Iu.M. The energy-corrective and antioxidative effect of cytoflavin in the postischemic period of human dermal fibroblasts *in vitro*. *Cell Tiss. Biol.* 2012; 6 (4): 367–375. DOI: 10.1134/S1990519X1204013X
10. Rummyantseva S.A., Kovalenko A.L., Silina E.V., Stupin V.A., Kabaeva E.N., Chichanovskaya L.V., Nazarov M.V., Tsukurova L.A., Burenichev D.V., Golikov K.V., Sal'nikov M.V., Belova L.A., Mashin V.V., Mazina N.K., Zhilina E.A., Kolotik-Kameneva O.Yu., Sherman M.A. Efficacy of complex antioxidant energy correction of different durations in the treatment of cerebral infarction (results of a multicenter randomized study). *Neurosci. Behav. Physiol.* 2017; 47 (3): 288–295. DOI: 10.1007/s11055-017-0395-1

References

1. Bradberry S.M. Occupational methaemoglobinaemia. Mechanisms of production, features, diagnosis and management including the use of methylene blue. *Toxicol. Rev.* 2003; 22 (1): 13-27. DOI: 10.2165/00139709-200322010-00003. PMID: 14579544
2. Kohn M.C., Melnick R.L., Ye F., Portier C.J. Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug. Metab. Dispos.* 2002; 30 (6): 676–683. DOI: 10.1124/dmd.30.6.676. PMID: 12019195
3. Lee J., El-Abaddi N., Duke A., Cerussi A.E., Brenner M., Tromberg B.J. Non-invasive *in vivo* monitoring of methemoglobin formation and reduction with broadband diffuse optical spectroscopy. *J. Appl. Physiol.* 2006; 100 (2): 615–622. DOI: 10.1152/japplphysiol.00424.2004. PMID: 16223982
4. Minami M., Katsumata M., Tomoda A. Methemoglobinemia with oxidized hemoglobins and modified hemoglobins found in bloods of workers handling aromatic compounds and in those of a man who drank cresol solution. *Biomed. Biochim. Acta.* 1990; 49 (2-3): S327-S333. PMID: 2386523
5. Greenberg M.I. Methylene Blue: fast-acting antidote for methemoglobinemia. *Emerg. Med. News.* 2001; 23 (9): 26. DOI: 10.1097/01.EEM.0000292322.94148.37
6. Skold A., Cosco D.L., Klein R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *South Med. J.* 2011; 104 (11): 757–761. DOI: 10.1097/SMJ.0b013e318232139f. PMID: 22024786
7. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavialova A., Kuzovlev A. Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1): 88-95. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.11.035. PMID: 26626224
8. CYTOFLAVIN solution for intravenous use. http://eng.polysan.ru/cytoflavin_amp.htm
9. Tiuriaeve I.I., Kuranova M.L., Gonchar I.V., Rozanov Iu.M. The energy-corrective and antioxidative effect of cytoflavin in the postischemic period of human dermal fibroblasts *in vitro*. *Cell Tiss. Biol.* 2012; 6 (4): 367–375. DOI: 10.1134/S1990519X1204013X
10. Rummyantseva S.A., Kovalenko A.L., Silina E.V., Stupin V.A., Kabaeva E.N., Chichanovskaya L.V., Nazarov M.V., Tsukurova L.A., Burenichev D.V., Golikov K.V., Sal'nikov M.V., Belova L.A., Mashin V.V., Mazina N.K., Zhilina E.A., Kolotik-Kameneva O.Yu., Sherman M.A. Efficacy of complex antioxidant energy correction of different durations in the treatment of cerebral infarction (results of a multicenter randomized study). *Neurosci. Behav. Physiol.* 2017; 47 (3): 288–295. DOI: 10.1007/s11055-017-0395-1

11. Bellavia L., DuMond J.F., Perlegas A., Bruce King S., Kim-Shapiro D.B. Nitroxyl accelerates the oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Nitric Oxide*. 2013; 31: 38–47. DOI: 10.1016/j.niox.2013.03.006. PMID: 23545404
12. Navati M.S., Friedman J.M. Reactivity of glass-embedded met hemoglobin derivatives toward external NO: implications for nitrite-mediated production of bioactive NO. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131 (34): 12273–12279. DOI: 10.1021/ja903364h. PMID: 19663497
13. Jensen F.B. Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 2007; 210 (19): 3387–3394. DOI: 10.1242/jeb.008748. PMID: 17872992
14. Wang D., Pknova B., Solomon S.B., Cortes-Puch I., Kern S.J., Sun J., Kanias T., Gladwin M.T., Helms C., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Natanson C. *In vivo* reduction of cell-free methemoglobin to oxyhemoglobin results in vasoconstriction in canines. *Transfusion*. 2013; 53 (12): 3149–3163. DOI: 10.1111/trf.12162. PMID: 23488474
15. Katsumata M. An industrial toxicological study on workers who synthesize aminophenol and anisidine from chloronitrobenzene. *Nihon. Ika. Daigaku Zasshi*. 1994; 61 (6): 590–601. DOI: 10.1272/jnms1923.61.590. PMID: 7829653
16. Patel R.P., Hogg N., Kim-Shapiro D.B. The potential role of the red blood cell in nitrite-dependent regulation of blood flow. *Cardiovasc. Res.* 2011; 89 (3): 507–515. DOI: 10.1093/cvr/cvq323. PMID: 20952416
17. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Kuzovlev A. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp. Cell Res.* 2015; 337 (2): 192–201. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.07.009. PMID: 26169694
18. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. DOI: 10.1038/srep0603. PMID: 25112597
19. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227. DOI: 10.1016/j.micron.2012.06.012. PMID: 22854216
20. Hopmann K.H., Cardey B., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., Ghosh A. Hemoglobin as a nitrite anhydrase: modeling methemoglobin-mediated N_2O_3 formation. *Chemistry*. 2011; 17 (23): 6348–6358. DOI: 10.1002/chem.201003578. PMID: 21590821
21. Бузунова С.А. Клинические и патогенетические подходы в терапии нейронных инфекций. *Вестн. Новгородского Гос. университета*. 2011; 62: 101–104.
22. Гудкова А.Н., Осиновская Н.А., Полунина А.Г., Гехт А.Б. Исследование влияния цитофлавина на симптомы депрессии и вегетативные нарушения у пациентов с органическим депрессивным расстройством. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2013; 113 (12-1): 50–55. PMID: 24430035
23. Ponomarev E.A., Maskin S.S., Strepetov N.N., Mochailo Yu.A., Pchelintsev K. E. Pharmacological neuroprotection of the brain during carotid artery surgery. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2013; 43 (1): 76–78. DOI: 10.1007/s11055-012-9693-9
24. Kim H.M., Jung H.S., Shin H.Y., Jung K.Y. Inhibition of mast cell-dependent anaphylaxis by succinic acid. *Pharmacol. Toxicol.* 1999; 84 (4): 154–158. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1999.tb00892.x. PMID: 10227065
25. Зарубина И.В., Лукк М.В., Шабанов П.Д. Антигипоксические и антиоксидантные эффекты экзогенной янтарной кислоты и аминокислотных сукцинатсодержащих антигипоксикантов. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2012; 153 (3): 313–317. DOI: 10.1007/s10517-012-1709-5. PMID: 22866305
26. Ericson D., Thompson J. Arginine-containing compositions and methods for treating red blood cells. Patent № US 8,980,542 B2.
27. Livesey S., Burnett M., Connor J., Wagner C. Composition for cryopreservation comprising nicotinamide, glycerol and red blood cells. Patent № US 8,895,236 B2.
28. Vasilaki A., McMillan D., Kinsella J., Duncan A., O'Reilly D., Takwar D. Relation between riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide concentrations in plasma and red cells in patients with critical illness. *Clin. Chim. Acta*. 2010; 411 (21-22): 1750–1755. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.024. PMID: 20667447
29. Orita A., Verde M., Sakai M., Meng Y.A. Biomimetic redox flow battery based on flavin mononucleotide. *Nat. Commun.* 2016; 7: 13230. DOI: 10.1038/ncomms13230. PMID: 27767026
11. Bellavia L., DuMond J.F., Perlegas A., Bruce King S., Kim-Shapiro D.B. Nitroxyl accelerates the oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Nitric Oxide*. 2013; 31: 38–47. DOI: 10.1016/j.niox.2013.03.006. PMID: 23545404
12. Navati M.S., Friedman J.M. Reactivity of glass-embedded met hemoglobin derivatives toward external NO: implications for nitrite-mediated production of bioactive NO. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131 (34): 12273–12279. DOI: 10.1021/ja903364h. PMID: 19663497
13. Jensen F.B. Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 2007; 210 (19): 3387–3394. DOI: 10.1242/jeb.008748. PMID: 17872992
14. Wang D., Pknova B., Solomon S.B., Cortes-Puch I., Kern S.J., Sun J., Kanias T., Gladwin M.T., Helms C., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Natanson C. *In vivo* reduction of cell-free methemoglobin to oxyhemoglobin results in vasoconstriction in canines. *Transfusion*. 2013; 53 (12): 3149–3163. DOI: 10.1111/trf.12162. PMID: 23488474
15. Katsumata M. An industrial toxicological study on workers who synthesize aminophenol and anisidine from chloronitrobenzene. *Nihon. Ika. Daigaku Zasshi*. 1994; 61 (6): 590–601. DOI: 10.1272/jnms1923.61.590. PMID: 7829653
16. Patel R.P., Hogg N., Kim-Shapiro D.B. The potential role of the red blood cell in nitrite-dependent regulation of blood flow. *Cardiovasc. Res.* 2011; 89 (3): 507–515. DOI: 10.1093/cvr/cvq323. PMID: 20952416
17. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Kuzovlev A. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp. Cell Res.* 2015; 337 (2): 192–201. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.07.009. PMID: 26169694
18. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. DOI: 10.1038/srep0603. PMID: 25112597
19. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227. DOI: 10.1016/j.micron.2012.06.012. PMID: 22854216
20. Hopmann K.H., Cardey B., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., Ghosh A. Hemoglobin as a nitrite anhydrase: modeling methemoglobin-mediated N_2O_3 formation. *Chemistry*. 2011; 17 (23): 6348–6358. DOI: 10.1002/chem.201003578. PMID: 21590821
21. Buzunova S.A. Clinical and pathogenetic approaches in therapy of neuroinfections. *Vestnik Novgorodskogo Gosudarstvennogo Universiteta*. 2011; 62: 101–104.
22. Gudkova A.N., Osinovskaja N.A., Polunina A.G., Gekht A.B. Investigation of the effects of cytoflavin on symptoms of depression and autonomic dysfunction in patients with organic depressive disorder. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Imeni S.S. Korsakova*. 2013; 113 (12-1): 50–55. PMID: 24430035. [In Russ., In Engl.]
23. Ponomarev E.A., Maskin S.S., Strepetov N.N., Mochailo Yu.A., Pchelintsev K. E. Pharmacological neuroprotection of the brain during carotid artery surgery. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2013; 43 (1): 76–78. DOI: 10.1007/s11055-012-9693-9
24. Kim H.M., Jung H.S., Shin H.Y., Jung K.Y. Inhibition of mast cell-dependent anaphylaxis by succinic acid. *Pharmacol. Toxicol.* 1999; 84 (4): 154–158. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1999.tb00892.x. PMID: 10227065
25. Zarubina I., Lukk M., Shabanov P. Antihypoxic and antioxidant effects of exogenous succinic acid and amino-thiol succinate-containing antihypoxants. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny*. 2012; 153 (3): 336–339. DOI: 10.1007/s10517-012-1709-5. PMID: 22866305. [In Russ., In Engl.]
26. Ericson D., Thompson J. Arginine-containing compositions and methods for treating red blood cells. Patent № US 8,980,542 B2.
27. Livesey S., Burnett M., Connor J., Wagner C. Composition for cryopreservation comprising nicotinamide, glycerol and red blood cells. Patent № US 8,895,236 B2.
28. Vasilaki A., McMillan D., Kinsella J., Duncan A., O'Reilly D., Takwar D. Relation between riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide concentrations in plasma and red cells in patients with critical illness. *Clin. Chim. Acta*. 2010; 411 (21-22): 1750–1755. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.024. PMID: 20667447
29. Orita A., Verde M., Sakai M., Meng Y.A. Biomimetic redox flow battery based on flavin mononucleotide. *Nat. Commun.* 2016; 7: 13230. DOI: 10.1038/ncomms13230. PMID: 27767026

Поступила 23.01.18

Received 23.01.18

Синтетический аналог лей-энкефалина предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции *in vitro*

О. А. Гребенчиков^{1,4}, А. М. Овезов¹, Ю. В. Скрипкин¹, Т. С. Забелина¹,
О. Н. Улиткина¹, А. В. Луговой¹, А. С. Приходько^{2,3}, А. Ю. Рыжков^{2,4}, Р. А. Зиновкин^{2,3,5}

¹ Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского,
Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2,

² НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Россия, 119992, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1 стр. 40

³ НИИ Митоинженерии, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Россия, 119992, г. Москва, ул. Ленинские Горы, дом 1 стр. 73А

⁴ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Synthetic Analogue of Leu-Enkephalin Prevents Endothelial Dysfunction *in vitro*

Oleg A. Grebenchikov^{1,4}, Alexey M. Ovezov¹, Yuri V. Skripkin¹, Tatiana S. Zabelina¹,
Olga N. Ulitkina¹, Alexander V. Lugovoy¹, Anastasiya S. Prikhodko^{2,3},
Alexander Yu. Ryzhkov^{2,4}, Roman A. Zinovkin^{2,3,5}

¹ M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute
61/2 Shchepkin Str., 129110 Moscow, Russia

² A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1 Leninskie Gori Str., Build. 40, Moscow 119234, Russia

³ Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University,
1 Leninskie Gori Str., Build. 73A, Moscow 119992, Russia

⁴ Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

⁵ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,
8 Trubetskaya Str., Build. 2, 119991 Moscow, Russia

Цель исследования – изучить эффективность действия синтетического стабилизированного аналога лей-энкефалина в качестве средства, предотвращающего повреждение монослоя эндотелиальных клеток *in vitro* под действием сывороток пациентов с септическим шоком.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на монослое эндотелиальных клеток EaHy.926. Изучали влияние синтетического аналога лей-энкефалина *in vitro* на развитие повреждения клеток под действием сывороток пациентов (5 больных с септическим шоком). Состояние межклеточных контактов эндотелия оценивали методами иммунофлуоресцентной микроскопии и иммуноблотинга с антителами к белку адгезивных контактов – VE-кадгерину и белку плотных контактов – клаудину. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окраски йодистым пропидием.

Результаты. Прекондиционирование синтетическим аналогом лей-энкефалина (10, 50 и 100 мкг/мл) клеток эндотелия *in vitro* приводило к предотвращению деструкции плотных и адгезивных контактов, а также частично предотвращало гибель эндотелиоцитов.

Заключение. Прекондиционирование синтетическим аналогом лей-энкефалина частично предотвращает гибель эндотелиоцитов, вызванную воздействием сыворотки септических больных *in vitro*. Эти данные диктуют необходимость проведения клинических испытаний эффективности применения синтетического аналога лей-энкефалина с целью профилактики сепсис-ассоциированной эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: лей-энкефалин; проницаемость эндотелия; синдром системного воспалительного ответа; септический шок; Даларгин

The purpose of the study was to determine the efficacy of a synthetic leu-enkephalin stabilized analogue to prevent damage of endothelial cells monolayer *in vitro* caused by serum samples from septic shock patients.

Materials and methods. The experiments were performed using the EaHy.926 endothelial cells monolayer. We studied the *in vitro* effect of synthetic leu-enkephalin analogue on the cell damage caused by serum samples from

Адрес для корреспонденции:

Олег Гребенчиков
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

Correspondence to:

Oleg Grebenchikov
E-mail: oleg.grebenchikov@yandex.ru

five septic shock patients. The status of endothelial intercellular junctions was estimated by immunofluorescence microscopy and western blot with antibodies against adherens junction protein, VE-cadherin, and against the tight junctions protein, claudin. Cell viability was determined by staining with propidium iodide.

Results. Preconditioning with a synthetic leu-enkephalin analogue (10, 50 and 100 µg/ml) of endothelial cells *in vitro* prevented the destruction of both tight and adherens junction and partially prevented endothelial cell death.

Conclusion. Preconditioning with a synthetic leu-enkephalin analogue partially prevents endothelial cell damage caused by exposure to septic patients' sera *in vitro*. These data ensure the need for clinical trials on the effectiveness of a synthetic leu-enkephalin analogue for prevention of sepsis-associated endothelial dysfunction in clinics.

Keywords: *synthetic leu-enkephalin stabilized analogue; endothelial permeability; systemic inflammatory response syndrome; septic shock; Dalargin*

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-60-68

Введение

Эндотелий представлен одним слоем специализированных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов. Помимо барьерной, эндотелий выполняет ряд других физиологических функций: поддержание онкотического давления, участие в свертывании крови, ангиогенезе и проч. При развитии некоторых патологических процессов, эндотелиальная дисфункция становится их важной составляющей и во многом определяет тяжесть течения атеросклероза, сепсиса, ишемических и реперфузионных повреждений, тяжелой сочетанной травмы, а также синдрома системной воспалительной реакции (ССВР), в том числе, и в раннем послеоперационном периоде [1]. Транскапиллярная утечка жидкости, возникающая вследствие нарушения барьерной функции эндотелия или гибели клеток, приводит к возникновению интерстициального отека, что, на уровне организма, манифестирует полиорганной недостаточностью — состоянием, представляющем серьезную угрозу жизни больного ССВР [2]. Важной составляющей ССВР является эндотелиальная дисфункция — ключевой феномен критических состояний, сопровождающийся увеличением проникновения провоспалительных цитокинов через гистогематические барьеры и приводящий к нарушению целостности последних, с последующей инфильтрацией тканей лейкоцитами и цитокинами [3]. Барьерная функция эндотелия закономерно нарушается при септическом шоке, что способствует развитию неблагоприятных клинических исходов [4]. Предупреждение, лечение и минимизация последствий ССВР является одной из основных задач анестезиологов-реаниматологов.

Наличие противовоспалительной активности (т. е. способности тормозить развитие ССВР) и, как следствие, способность предотвращать развитие эндотелиальной дисфункции, является положительным побочным эффектом немало числа известных препаратов [5]. Однако, их эффективность в обсуждаемом плане не велика и, с учетом важности проблемы ССВР, представляется чрезвычайно важным поиск новых препаратов, способных тормозить развитие эндотелиальной дисфункции.

Introduction

Endothelium is represented by a single layer of specialized cells lining the inner surface of the blood and lymph vessels. In addition to the barrier function, the endothelium has several other physiological functions: the maintenance of the oncotic pressure, contributions to blood coagulation, angiogenesis, etc. In the case of development of pathological processes, endothelial dysfunction becomes a significant object of pathological alterations and largely determines the severity of atherosclerosis, sepsis, ischemia/reperfusion injury, severe concomitant injury and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) including that in the early postoperative period [1]. Transcapillary fluid leakage caused by barrier dysfunction of the endothelium or cell death leads to interstitial edema, which at the body level is manifested by multiple organ failure, a life-threatening condition of the patient [2]. SIRS, which includes as an important component the endothelial dysfunction, is a key phenomenon of critical illness accompanied by increased infiltration of pro-inflammatory cytokines through histohematogenous barriers. SIRS leads to impairment of the integrity of the latter, with the subsequent tissue infiltration by leukocytes and enhanced production of cytokines [3]. The barrier function of the endothelium is impaired naturally in septic shock, which contributes to adverse clinical outcomes [4]. Prevention, treatment and mitigation of consequences of SIRS are the urgent tasks in the intensive care.

The presence of the anti-inflammatory activity (i.e. the ability to inhibit the development of SIRS) and, as a result, the ability to prevent the development of endothelial dysfunction is a positive side effect of many drugs [5]. However, their effectiveness in the discussed field is not high, taking into account the significance of the SIRS problems; therefore the search of new drugs which can inhibit the development of endothelial dysfunction is essential.

More than 30 years ago, a synthetic stable analogue of leu-enkephalin with delta- and mu-opioid activity, Dalargin, which is a peptide with an amino acid sequence of Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg has been suggested for the clinical practice [6].

The synthetic leu-enkephalin analogue (Dalargin) has been approved for the clinical use for

Более 30-ти лет назад в клинику был внедрен синтетический стабилизированный аналог лей-энкефалина с дельта- и мю-опиоидной активностью — Даларгин, который представляет собой пептид с аминокислотной последовательностью Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg.[6]

Синтетический аналог лей-энкефалина (Даларгин) разрешен к клиническому применению для лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка в период обострения; острого панкреатита; острого некротического панкреатита в составе комплексной терапии [7].

В ранних исследованиях было показано наличие у препарата кардиопротекторных свойств при операциях с ИК [8], однако, неизученность механизмов его действия и непостоянство эффекта, помешали Даларгину в то время занять достойное место в арсенале анестезиолога.

После открытия феномена опиоидного preconditionирования [9] возникло предположение, что органопротекторные эффекты Даларгина реализуются теми же биохимическими путями [10], и если эта гипотеза найдет свое подтверждение, то у клиницистов появится средство для лечения или предотвращения осложнений, прежде всего органной недостаточности, связанной с эндотелиальной дисфункцией, в том числе, при сепсисе и септическом шоке.

Цель настоящего исследования — изучить эффективность действия синтетического стабилизированного аналога лей-энкефалина в качестве средства, предотвращающего повреждение монослоя эндотелиальных клеток *in vitro* под действием сывороток пациентов с септическим шоком.

Материал и методы

Сыворотки забирали у больных с развившимся септическим шоком, которые были отобраны в соответствии с критериями «Сепсис-3» [11]: 5 человек, средний возраст 45 [29–55] лет, а также у здоровых доноров, подписавших информированное согласие: 5 человек, средний возраст 35 [28–45] лет.

Флуоресцентная микроскопия. Эндотелиальные клетки Ea.hy926 растили в среде DMEM (Gibco, USA) с 10% телячьей эмбриональной сывороткой — FBS (HyClone, USA) до монослоя. Затем клетки инкубировали в течение 3-х часов при 37°C с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (контроль), с сывороткой здорового человека, а также с сывороткой пациента с сепсисом без Даларгина и в его присутствии в конечных концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкг/мл. Даларгин добавляли за 1 час до смены сывороток. После инкубации клетки промывали теплым раствором DMEM без сыворотки, а затем фиксировали 2%-ным раствором параформа и пермеабелизовывали 1%-ным раствором Triton X-100. Фиксированные клетки окрашивали первичными антителами к VE-кадгерину (BD Biosciences, USA), а затем инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Oregon Green 488 (Life Technologies, USA), а также с фаллоидином, меченным TRITC (Sigma, USA) и

the treatment of duodenal and stomach ulcer during exacerbation; acute pancreatitis and acute necrotizing pancreatitis as a part of the combined therapy [7].

Early studies have shown the cardioprotective properties of Dalargin during surgery requiring a cardiopulmonary bypass (CPB) [8]. However, unclarified mechanisms of the drug action and variable clinical effects prevented Dalargin at that time from taking an appropriate niche in the anesthesiology.

After the discovery of a phenomenon of opioid preconditioning [9], it has been suggested that the effects of Dalargin are implemented by the same biochemical pathways [10] and if this hypothesis is confirmed, clinicians would have a medicine for the treatment or prevention of complications, including organ failure associated with endothelial dysfunction and sepsis/septic shock.

The purpose of this study was an *in vitro* investigation of the effectiveness of Dalargin for preventing the damage of endothelial cells monolayer by proinflammatory cytokines circulating in the serum of septic shock patients.

Materials and Methods

Patients with developed septic shock were selected in accordance with the «Sepsis-3» criteria [11]: 5 patients, the average age is 45 [29–55] years.

Healthy donors (5 subjects) who signed the informed consent; the average age is 35 [28–45].

Fluorescence microscopy. Ea.hy926 endothelial cells were grown to a monolayer in the DMEM medium (Gibco, USA) with 10% fetal bovine serum, FBS (HyClone, USA). The cells were then incubated for 3 hours at 37°C with 5% FBS (reference group), with healthy human serum, and with the serum of a septic patient without Dalargin and with Dalargin at a final concentrations of 1, 10, 50 and 100 µg/ml. Dalargin was added 1 hour before changing the serum. After incubation, the cells were washed with a warm DMEM solution without serum, then fixed with a 2% paraformaldehyde solution and permeabilized with a 1% Triton X-100 solution. Fixed cells were stained with primary antibodies against VE-cadherin (BD Biosciences, USA) and then incubated with secondary antibodies conjugated with a fluorescent stain Oregon Green 488 (Life Technologies, USA), phalloidin-TRITC conjugate (Sigma, USA) and Hoechst dye 33342 (Life Technologies, USA). The processing of the images acquired with a fluorescence microscope, as well as their quantitative analysis, was performed using ImageJ 1.44p and MetaVue 4.6 software to compute the relative area of intercellular spaces as a percentage of the total area in endothelial cells.

Western blotting. The Ea.hy926 endothelial cells were grown and incubated as described above. After incubation, the cells were lysed in a hot buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.01% bromophenol blue) at 94°C for 4 min. The proteins were separated by a 12% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Antibodies against VE-cadherin and claudin (BD Biosciences, USA), as well as secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (BD Biosciences, USA) were used. The visualization

красителем Hoechst 33342 (Life Technologies, USA). Обработку изображений, полученных на флуоресцентном микроскопе, а также их количественный анализ проводили с помощью программ ImageJ 1.44p и MetaVue 4.6 с определением относительной площади межклеточных промежутков в % от общей площади в эндотелиальных клетках.

Вестерн-блоттинг. Эндотелиальные клетки Ea.hy926 растили и инкубировали так же, как описано выше. После инкубации клетки лизировали в горячем буфере (62,5 mM Трис-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерин; 50 mM ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) при температуре 94°C, в течение 4 мин. Белки разделяли в 12% полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембраны. Были использованы антитела к VE-кадгерину и клаудину (BD Biosciences, USA), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (BD Biosciences, USA). Визуализацию проводили набором SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, USA). Для денситометрического анализа и определения относительного содержания VE-кадгерина (%) в межклеточных контактах эндотелиальных клеток использовали программу Image Lab (BioRad, USA).

Изучение влияния сывороток пациентов с септическим шоком на апоптоз эндотелиальных клеток. Эндотелиальные клетки Ea.hy926 растили до монослоя. Затем клетки инкубировали в течение 12 часов при 37°C с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (контроль), с сывороткой здорового человека, а также с сывороткой пациента с сепсисом без Даларгина и в его присутствии в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкг/мл. После инкубации клетки снимали раствором трипсин-Версена, фиксировали 70%-ным этанолом и окрашивали йодистым пропидием. Клетки, содержащие фрагментированную геномную ДНК анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии, как описано ранее [12].

Статистический анализ. Данные представили в виде медианы с межквартильным интервалом. Статистическую значимость различий показателей оценивали с помощью *U*-теста Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Инкубация монослоя эндотелиальных клеток сывороткой пациентов с септическим шоком приводила к потере белка адгезионных контактов VE-кадгерина. Септическая сыворотка также изменяла форму клеток: они теряли правильную многоугольную форму, вытягивались, между ними образовывались промежутки, поскольку «разбирались» еще и пучки периферических актиновых микрофиламентов (рис. 1).

Такие изменения характерны для эндотелиальной дисфункции, сопровождающейся нарушением межклеточных контактов. Подобные эффекты не наблюдали при инкубации с 5%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (контроль) или 5%-ной сывороткой здоровых добровольцев. Таким образом, данный эксперимент может рассматриваться как модель эндотелиальной дисфункции при сепсисе *in vitro*.

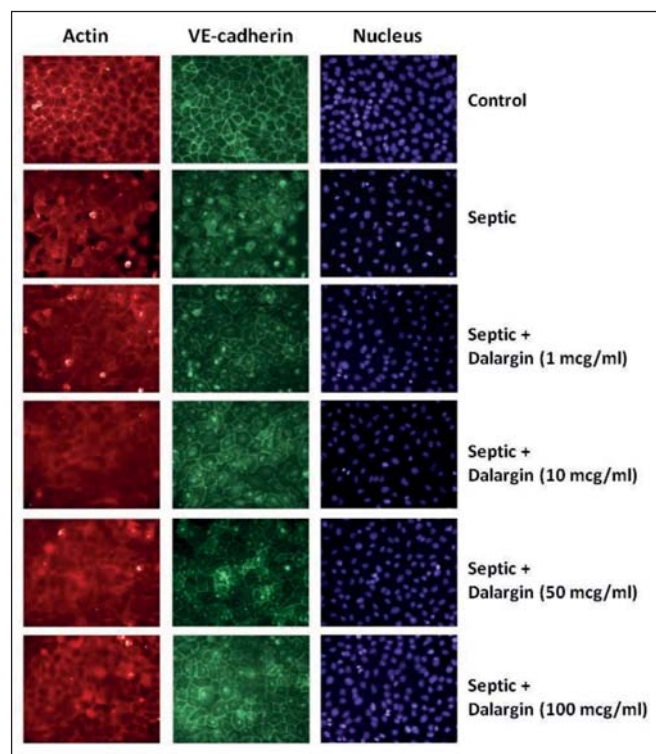


Рис. 1. Иммунофлуоресцентная микроскопия эндотелиальных клеток Ea.hy926.

Fig. 1. Immunofluorescence microscopy of endothelial cells Ea.hy926.

Note. Cells were incubated with different concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of Dalargin and treated with 5% serum from the septic patient L. (27 years old, severe sepsis). Cells were stained with antibodies against actin microfilaments (Actin) or intercellular contact molecule (VE-cadherin); nuclei were stained with DAPI.

Примечание. Клетки инкубировали с различными концентрациями Даларгина (указаны в мкг/мл) и обработали 5%-ной сывороткой септического больного Л. (27 лет, тяжелый сепсис). Actin – окраска клеток на актиновые микрофиламенты; VE-cadherin – окраска на белок межклеточных контактов VE-кадгерин; Nucleus – окраска ядер клеток.

was performed by SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, USA). Image Lab software was used (BioRad, USA) for the densitometry analysis and determining the relative content of VE-cadherin (%) in the intercellular contacts of endothelial cells.

Study of the effect of sera of patients with septic shock on endothelial cell apoptosis. Ea.hy926 endothelial cells were grown to form a monolayer. The cells were then incubated for 12 hours at 37°C with 5% FBS (reference group), with control human serum, and with the serum of a septic patient without Dalargin and with Dalargin at concentrations of 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$. After incubation, the cells were removed using trypsin-EDTA solution, fixed with 70% ethanol and stained with propidium iodide. Cells containing fragmented genomic DNA were analyzed by flow cytometry as described previously [12].

Statistical analysis. Since the distributions of variables differed from a normal distribution, the non-parametric criteria were employed to reveal the difference between groups. The data are presented as a median and 25%–75% interquartile intervals. The statistical significance was estimated using Mann-Whitney test. The difference was considered statistically significant at $P < 0.05$.

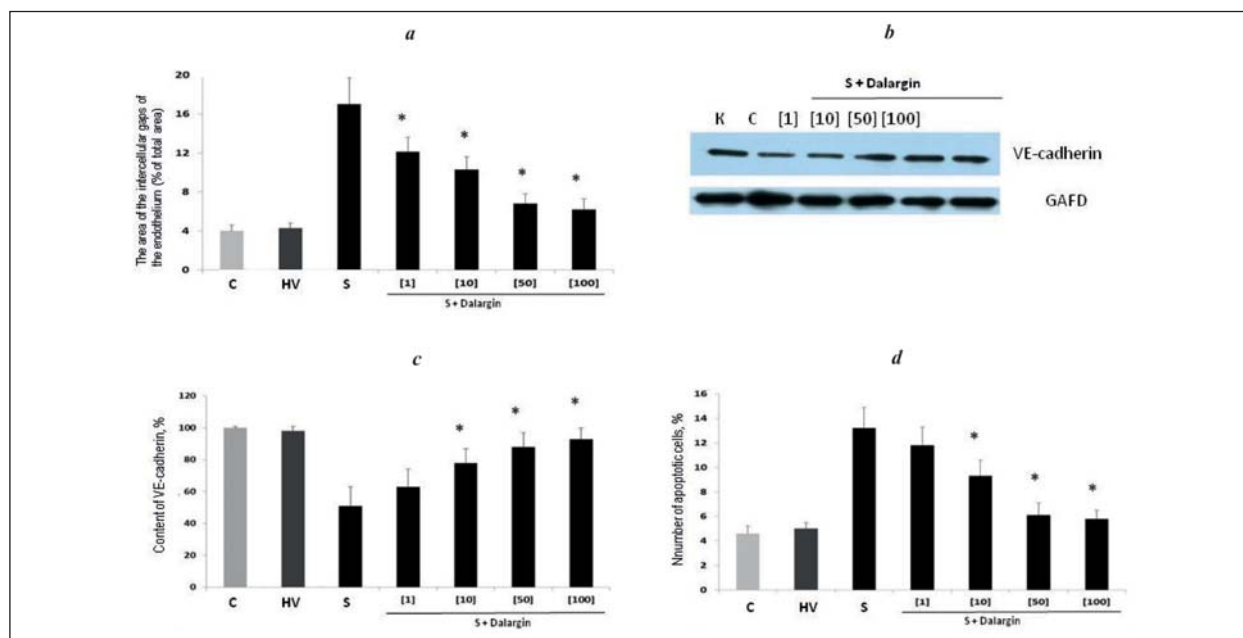


Рис. 2. Влияние Даларгина на повреждение монослоя эндотелиальных клеток под действием 5%-х сывороток пациентов с сепсисом.

Fig. 2. Effect of Dalargin on a serum-induced damage to the monolayer of endothelial cells.

Note. *a* – formation of intercellular spaces, immunofluorescence microscopy; *b* – splitting of the VE-cadherin-mediated adhesion contacts, immunoblot-analysis; *c* – cleavage of the dense contact protein Claudine, immunoblot analysis; *d* – relative level of apoptosis, propidium iodide staining. The results are presented as the mean (%) $\pm$ standard deviation, $n=5$; * – $P<0.05$ compared to effect of serum of patients with sepsis. C – control serum (FBS); HV – healthy volunteer serum; S – serum of a septic patient.

Примечание. *a* – образование межклеточных промежутков, данные иммунофлуоресцентной микроскопии; *b* – расщепление белка адгезивных контактов VE-кадгерина, данные иммуноблот-анализа; *c* – расщепление белка плотных контактов клаудина, данные иммуноблот-анализа; *d* – относительный уровень апоптоза, данные по окраске йодистым пропидием. Результаты представлены в виде среднего значения (%) $\pm$ стандартное отклонение, $n=5$; * – $p<0,05$ относительно сыворотки пациентов с сепсисом; C – контрольная сыворотка FBS; HV – сыворотка здорового добровольца; S – сыворотка септического больного; GAFD – ГАФД.

Для изучения возможного ангиопротекторного эффекта Даларгина в рамках предложенной модели использовали следующие концентрации активного вещества: 1, 10, 50 и 100 мкг/мл.

По данным иммунофлуоресцентной микроскопии, инкубация с Даларгином в низких концентрациях (1 и 10 мкг/мл) незначительно предотвращает «разборку» актина и VE-кадгерина в межклеточных контактах. Прединкубация с Даларгином в более высоких концентрациях (50 и 100 мкг/мл) практически полностью защищала эндотелиальный монослой от разрушения межклеточных контактов под действием сыворотки пациентов с септическим шоком (рис. 2, *a*). Численный анализ данных флуоресцентной микроскопии представлен в таблице.

Для количественной оценки содержания белков межклеточных контактов (клаудина и VE-кадгерина) использовали Вестерн-блоттинг. Инкубация с 5%-ной сывороткой пациента с сепсисом примерно в половину уменьшала количество VE-кадгерина в клеточных лизатах (рис. 2, *b*). Инкубация с Даларгином дозозависимо защищала этот белок от расщепления под действием септической сыворотки (рис. 2, *c*).

Инкубация с 5%-ными сыворотками пациентов с септическим шоком приводила к значитель-

Results and Discussion

Incubation of a monolayer of endothelial cells with serum of septic shock patients resulted in the loss of an adherens junction protein, VE-cadherin. The septic serum also changed the shape of the cells: they lost the correct polygonal shape, stretched out, formed gaps between them whereas peripheral actin microfilament bundles were also disassembled (Fig. 1).

These changes are typical for endothelial dysfunction accompanied by destruction of intercellular junctions. These effects were not observed when the cells were pre-incubated with 5% FBS (reference group) or 5% serum of healthy volunteers. Thus, this experimental system can be considered as an *in vitro* model of endothelial dysfunction in sepsis.

To study the possible angioprotective effect of Dalargin within the framework of the proposed model, we used the following concentrations of the active substance: 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml and 100 µg/ml.

A quantitative analysis of the immunofluorescence microscopy data is presented in Table. As shown in Table, incubation with Dalargin at low concentrations (1 µg/ml and 10 µg/ml) insignificantly prevented the disassembly of actin and VE-cadherin within the area of intercellular junctions. Pre-incubation with Dalargin at higher concentrations (50 µg/ml

Протективное действие Даларгина при воздействии сыворотки пациентов с септическим шоком на культуру эндотелия Ea.hy926.**Protective effect of Dalargin on endothelial cells Ea.hy926 treated with serum of septic shock patients.**

Group	Area of intercellular gaps in endothelium. (% to total area)	P value vs. «Sept» group	Content of VE-cadherin. %	P value vs. «Sept» group	Apoptosis level (% of a total count of endothelial cells)	P value vs. «Sept» group
Reference group	4.11 [3.52–4.40]		100 [99.1–100]		5.29	
Control	4.3 [3.82–4.78]		97.1 [95.88–100]		4.48	
Sept.	17.03 [14.83–19.11]		49 [42.25–61.25]		12.96	
Sept + Dalargin 1 µg/ml	11.72 [11.03–13.45]	0.016	61 [54.78–73.03]	0.15	10.42	0.0952
Sept + Dalargin 10 µg/ml	10.27 [9.02–11.60]	0.008	77 [70.98–85.78]	0.008	8.66	0.0079
Sept + Dalargin 50 µg/ml	6.59 [5.96–7.80]	0.008	90.2 [80.05–94.23]	0.008	7.13	0.0079
Sept + Dalargin 100 µg/ml	6.17 [5.27–7.16]	0.008	96 [86.33–97.23]	0.008	6.35	0.0079

Note. For tabl., fig. 1: Control — sera from healthy volunteers donated blood; Sept — serum of septic shock patients.

Примечание. Group — группа; Reference — контроль. Для табл. 1, рис. 1: Control — сыворотка здоровых волонтеров; Sept. — сыворотка пациентов с септическим шоком; Dalargin — Даларгин. Для табл. и рис. 2: Area of intercellular gaps in endothelium, (% to total area) — площадь межклеточных промежутков эндотелия, % от общей площади; Content of VE-cadherin — содержание VE-кадгерина; — количество апоптотических клеток, % от общего количества эндотелиальных клеток. P value vs. «Sept» group — значимость разницы по отношению к группе «Септ».

ному увеличению количества апоптотических клеток (рис. 2, *d*). Даларгин в концентрации 1 мкг/мл незначительно уменьшал количество апоптотических клеток, а при концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл наблюдали значимое снижение количества апоптотических клеток (табл.).

Клетки линии Ea.hy 926 обладают основными фенотипическими и функциональными характеристиками эндотелиальных клеток сосудов человека [13], поэтому они были выбраны нами в качестве модели для исследования эндотелиальной дисфункции.

Ранее было установлено, что различные провоспалительные цитокины, например, TNF- α (Tumour Necrosis Factor α) вызывают расщепление VE-кадгерина — эндотелиального белка адгезионных контактов [14]. Также, при действии подобных провоспалительных агентов, происходит деградация белков плотных контактов, в том числе, клаудина. Эндотелиальные межклеточные контакты выполняют важнейшую роль в поддержании целостности сосудов. Повышение проницаемости эндотелия под действием провоспалительных цитокинов (TNF- α , интерлейкины-1, -8, -12) происходит за счет реакций фосфорилирования и убиквитинирования основных белковых компонентов адгезивных межклеточных контактов (VE-кадгерина, окклюдина, клаудина) [15].

Протеолиз этих важнейших белков межклеточных контактов вызывает образование промежутков между клетками, что приводит к увеличению проницаемости и нарушению барьерной функции эндотелия. В крайних случаях может развиться эндотелиальная дисфункция, которая в настоящее время считается одним из основных факторов развития полиорганной недостаточности при сепсисе и септическом шоке [16].

Также в рамках выбранной модели изучали влияние сывороток пациентов с септическим шоком

и 100 µg/ml) almost completely protected the endothelial monolayer from the destruction of intercellular junctions induced by sera from patients with sepsis (Fig. 2, *a*).

Western blotting was used to quantify the protein content of intercellular junctions proteins, claudin and VE-cadherin. Incubation with a 5% serum of a septic patient resulted in a 50% reduction of VE-cadherin content in the cell lysates (Fig. 2, *b*). Incubation with Dalargin protected this protein from disintegration under the effect of the septic serum in a dose-dependent manner (Fig. 2, *c*).

Incubation with 5% serum of a septic shock patient resulted in a significant increase in the number of apoptotic cells (Fig. 2, *d*). Dalargin at a concentration of 1 µg/ml slightly reduced the number of apoptotic cells. Statistically significant decrease in the number of apoptotic cells was observed at Dalargin concentrations of 10 µg/ml, 50 µg/ml and 100 µg/ml (Table).

Cells of the Ea.hy926 line possess main phenotypic and functional features of human endothelial vascular cells [13], therefore they were chosen as an endothelium model to study endothelial dysfunction in sepsis.

It was established earlier that various pro-inflammatory cytokines, e.g. TNF- α (Tumour Necrosis Factor α), induce the disintegration of the VE-cadherin, the protein of vascular endothelial adherens junction [14]. Besides, the action of such pro-inflammatory agents caused the degradation of proteins of tight junctions including claudine. Endothelial intercellular junctions significantly contribute to maintaining the vascular integrity. Enhanced permeability of the endothelium caused by pro-inflammatory cytokines (TNF- α , Interleukins-1, -8, -12) is due to increased phosphorylation and ubiquitination of the essential protein components of intercellular adherens junctions (VE-cadherin, occludin, claudin) [15].

на апоптоз эндотелиальных клеток. Известно, что в норме *in vivo* эндотелий практически не подвергается апоптозу. Однако есть данные, что при сепсисе увеличивается количество апоптотических эндотелиальных клеток [17]. В моделях *in vitro* многие провоспалительные агенты, такие, как LPS (Lipopolysaccharide), TNF- α , IL-1, увеличивают апоптоз различных линий эндотелиальных клеток [18, 19].

Ранее считали, что опиоидные рецепторы находятся исключительно в нервной ткани, и только совсем недавно они были обнаружены и в других тканях, в том числе на поверхности эндотелиальных клеток [20, 21]. Было доказано, что морфин действует на μ -опиоидные рецепторы эндотелиальных клеток, что приводит к активации синтеза NO и вазодилатации [22]. Даларгин является неселективным агонистом μ - и δ -опиоидных рецепторов, причем, преимущественно периферического действия [23]. В настоящей работе удалось показать, что Даларгин способен предотвращать апоптоз, а также деградацию актина и VE-кадгерина в межклеточных контактах эндотелиоцитов линии Ea.hy 926, вызванную действием сывороток септических больных. Эти данные полностью согласуются с ранее полученными результатами о протективном антиапоптотическом действии Даларгина на эндотелиальные клетки, обработанные антиэндотелиальными антителами и sensibilizированными лимфоцитами [24]. Косвенно перспективность использования Даларгина с целью предотвращения эндотелиальной дисфункции подтверждает недавняя работа А. Донцова [25], в которой было показано, что включение в терапию Даларгина у больных ишемической болезнью сердца сопровождалось достоверным снижением активности параметров оксидативного стресса и повышением антиоксидантных свойств крови. Возможно Даларгин также индуцирует защитные антиоксидантные механизмы в эндотелии при различных патологических состояниях. Известно, что антиоксиданты способны предотвращать апоптоз эндотелиальных клеток [26] и препятствовать развитию эндотелиальной дисфункции.

На сегодняшний день механизмы действия Даларгина на эндотелиальные клетки остаются неизученными. В этой связи, нам представляется важным продолжить исследования молекулярных механизмов его защитных свойств на эндотелий. Изучение биологических процессов, связанных с действием отдельных веществ на эндотелий требует использования методов и *in vitro*, и *in vivo*. Полученные в настоящей работе данные требуют также проверки в моделях с использованием животных. При этом не исключено, что концентрации Даларгина, используемые в настоящей работе, могут значительно отличаться от действующих концентраций *in vivo*.

Ограничения исследования. Относительно небольшое количество образцов сывороток,

The proteolysis of these critical proteins of the cellular junctions leads to the intercellular gaps formation, leading to increased permeability and impaired barrier function of the endothelium. In extreme cases an endothelial dysfunction may develop, which is currently considered one of the main factors in the development of multiple organ failure in sepsis including septic shock [16].

In addition, within the frames of our model, we studied the effect of serum samples of patients with septic shock on apoptosis of endothelial cells. It is known that *in vivo* normal endothelium does not undergo apoptosis. However, there is evidence that sepsis increases the quantity of apoptotic endothelial cells [17]. In *in vitro* many proinflammatory agents such as LPS (bacterial lipopolysaccharide), TNF- α , IL-1 enhance apoptosis in various lines of endothelial cells [18, 19].

Earlier, opioid receptors were considered as those as found exclusively in nervous tissue. Only recently they were discovered in other tissues, including the endothelial cells in which the opioid receptors are exposed on the cell surface [20, 21]. It has been proven that morphine affects μ -opioid receptors of endothelial cells that leads to activation of NO synthesis and vasodilation [22]. Dalargin is a non-selective agonist of μ - and δ -opioid receptors, with a mainly peripheral action [23]. In the present study, we were able to show that Dalargin could prevent apoptosis and degradation of actin and VE-cadherin in intercellular junctions of line Ea.hy 926 endothelial cell induced by the serum of septic patients. These data are fully consistent with previously obtained findings demonstrating the protective antiapoptotic action of Dalargin on endothelial cells treated with anti-endothelial antibodies and sensitized lymphocytes [24]. Indirectly, the perspectives for the use of Dalargin to prevent endothelial dysfunction have been supported by a recent study by A. Dontsov [25], in which the inclusion of Dalargin in the treatment of patients with coronary artery disease has been accompanied by a significant decrease in the activity of oxidative stress parameters and increase of antioxidant blood properties. Dalargin may also induce the endothelial protective antioxidant mechanisms in various pathological conditions. It is known that antioxidants can prevent apoptosis in endothelial cells [26] and prevent the development of endothelial dysfunction.

The mechanisms of action of Dalargin on endothelial cells have not been studied to date. In this context, it seems important to continue the study of the molecular mechanisms of its protective properties on the endothelium. It is important to note that the study of the biological processes associated with the effect of certain substances on the endothelium requires the use of *in vitro* methods. Therefore, the data obtained in the present study also require the validation in animal models. We can also assume

использованных в работе, не позволяет сделать вывод о том, что все пациенты с сепсисом подвержены эндотелиальной дисфункции. В работе отсутствуют данные о содержании цитокинов в сыворотках пациентов с септическим шоком.

Заключение

Прекодиционирование Даларгином дозозависимо частично предотвращает гибель эндотелиоцитов, вызванную воздействием сыворотки септических больных, *in vitro* на клетки эндотелия человека. Даларгин также дозозависимо предотвращает деградацию актина и VE-кадгерина в межклеточных контактах эндотелиальных клеток линии Ea.hy 926 под действием сыворотки пациентов с септическим шоком, что свидетельствует о протекторном эффекте препарата на эндотелий, но не выявляет, посредством какого механизма он осуществляется. Такое защитное действие может обеспечивать сохранение функционального сосудистого барьера при опасных для жизни критических состояниях. Подтверждение вышеизложенного в моделях *in vivo* и раскрытие молекулярных механизмов защиты эндотелия, позволит инициировать клиническое испытание Даларгина (IV фаза) для доказательства его органопротекторных свойств.

Литература

1. Félétou M., Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291 (3): H985-H1002. DOI: 10.1152/ajpheart.00292.2006. PMID: 16632549
2. Hirase T., Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302 (3): H499-H505. DOI: 10.1152/ajpheart.00325.2011. PMID: 22081698
3. Hughes C.G., Patel M.B., Pandharipande P.P. Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion? *Curr. Opin. Crit. Care.* 2012; 18 (5): 518-526. DOI: 10.1097/MCC.0b013e328357effa. PMID: 22941208
4. Opal S., van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* 2014; 277 (3): 277-293. DOI: 10.1111/joim.12331. PMID: 25418337
5. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003; 107 (3): 499-511. DOI: 10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45. PMID: 12551878
6. Титов М.А., Виноградов В.А., Беспалова Ж.Д. Даларгин – пептидный препарат с цитопротективным действием. *Бюл. ВКНЦ АМН СССР.* 1985; 2: 72-76.
7. Инструкция по медицинскому применению препарата Даларгин. https://www.vidal.ru/drugs/dalargin_17150
8. Лихванцев В.В., Смирнова В.И., Кузнецов А.Ю., Перетрухин А.И., Какурин Ф.Ф., Гринько А.Н. Сравнительные аспекты применения даларгина в комплексе анестезиологической защиты при хирургической коррекции врожденных пороков сердца. *Анестезиология и реаниматология.* 1992; 4: 23-28. PMID: 8239021
9. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1 – but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation.* 1998; 97 (13): 1282-1289. PMID: 9570199
10. Лихванцев В.В., Гребенчиков О.А., Шапошников А.А., Борисов К.Ю., Черпаков Р.А., Шульгина Н.М. Фармакологическое прекодиционирование: роль опиоидных пептидов. *Общая реаниматология.* 2012; 8 (3): 51-55. DOI: 10.15360/1813-9779-2012-3-51
11. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W. The Third International Consensus definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
12. Demyanenko I.A., Popova E.N., Zakharova V.V., Ilyinskaya O.P., Vasilieva T.V., Romashchenko V.P., Fedorov A.V., Manskiikh V.N., Skulachev M.V., Zinovkin R.A., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondrial

that the concentration of Dalargin used in this study may significantly differ from the actual *in vivo* concentrations.

Study limitations. Limited number of serum samples used in the study restricts the probability that all septic patients are exposed to endothelial dysfunction. There was also no cytokine concentration determined of the septic shock patients' serum in accordance with the cytokines content.

Conclusion

The preconditioning with Dalargin partially prevented the destruction of endothelial cells caused by exposure of the septic patients serum *in vitro* in a dose-dependent manner. Dalargin also prevented the degradation of actin and VE-cadherin in intercellular junction of endothelial cells of Ea.hy 926 line in a dose-dependent manner caused by sera from septic shock patients. Data suggest that the protective activity of Dalargin can preserve the functional vascular barrier in life-threatening critical conditions and ensure the validation *in vivo* studies. Continuation of studies and clarification of molecular mechanisms of endothelial protection by Dalargin might ensure the clinical trial of Dalargin (phase IV) to confirm the organ protection by the drug.

References

1. Félétou M., Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291 (3): H985-H1002. DOI: 10.1152/ajpheart.00292.2006. PMID: 16632549
2. Hirase T., Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 302 (3): H499-H505. DOI: 10.1152/ajpheart.00325.2011. PMID: 22081698
3. Hughes C.G., Patel M.B., Pandharipande P.P. Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion? *Curr. Opin. Crit. Care.* 2012; 18 (5): 518-526. DOI: 10.1097/MCC.0b013e328357effa. PMID: 22941208
4. Opal S., van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* 2014; 277 (3): 277-293. DOI: 10.1111/joim.12331. PMID: 25418337
5. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003; 107 (3): 499-511. DOI: 10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45. PMID: 12551878
6. Titov M.A., Vinogradov V.A., Bepalova Zh.D. Dalargin – a peptide drug with cytoprotective action. *Byulleten VKNTs AMN SSSR.* 1985; 2: 72-76. [In Russ.]
7. Instructions for the medical use of the dalargin. https://www.vidal.ru/drugs/dalargin_17150. [In Russ.]
8. Likhvantsev V.V., Smirnova V.I., Kuznetsov A.Yu., Peretrukhin A.I., Kakurin F.F., Grinko A.N. Comparative aspects of the use of dalargin in comprehensive anesthesiologic protection during the surgical correction of congenital heart disease. *Anesteziologiya i Reanimatologiya.* 1992; 4: 23-28. PMID: 8239021. [In Russ.]
9. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1 – but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation.* 1998; 97 (13): 1282-1289. PMID: 9570199
10. Likhvantsev V.V., Grebenchikov O.A., Shaposhnikov A.A., Borisov K.Yu., Cherpakov R.A., Shulgina N.M. Pharmacological preconditioning: role of opioid peptides. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology.* 2012; 8 (3): 51-55. DOI: 10.15360/1813-9779-2012-3-51. [In Russ., In Engl.]
11. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W. The Third International Consensus definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338
12. Demyanenko I.A., Popova E.N., Zakharova V.V., Ilyinskaya O.P., Vasilieva T.V., Romashchenko V.P., Fedorov A.V., Manskiikh V.N., Skulachev M.V., Zinovkin R.A., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondrial

- dria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice. *Aging (Albany NY)* 2015; 7 (7): 475-485. DOI: 10.18632/aging.100772. PMID: 26187706
13. Winn R.K., Harlan J.M. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *J. Thromb. Haemostasis*. 2005; 3 (8): 1815-1824. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01378.x. PMID: 16102048
 14. Bannerman D.D., Sathiamoorthy M., Goldblum S.E. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (52): 35371-35380. DOI: 10.1074/jbc.273.52.35371. PMID: 9857080
 15. Галкин И.И., Плетюшкина О.Ю., Зиновкин Р.А., Захарова В.В., Бирюков И.С., Черняк Б.В., Попова Е.Н. Митохондриально-направленные антиоксиданты предотвращают апоптоз эндотелиальных клеток, вызванный фактором некроза опухоли. *Биохимия*. 2014; 79 (2): 169-177. DOI: 10.1134/S0006297914020059. PMID: 24794727
 16. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1983; 80 (12): 3734-3737. DOI: 10.1073/pnas.80.12.3734. PMID: 6407019
 17. Ромашенко В.П., Зиновкин Р.А., Галкин И.И., Захарова В.В., Пантелева А.А., Токрячук А.В., Лямзаев К.Г., Плетюшкина О.Ю., Черняк Б.В., Попова Е.Н. Низкие концентрации разобщителей окислительного фосфорилирования предотвращают воспалительную активацию эндотелиальных клеток, вызванную фактором некроза опухоли. *Биохимия*. 2015; 80 (5): 723-734. DOI: 10.1134/S0006297915050144. PMID: 26071781
 18. Vandenbroucke E., Mehta D., Minshall R., Malik A.B. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1123: 134-145. DOI: 10.1196/annals1420.016. PMID: 18375586
 19. Polat G., Ugan R.A., Cadirci E., Halici Z. Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches. *Eurasian J. Med.* 2017; 49 (1): 53-58. DOI: 10.5152/eurasianjmed2017.17062. PMID: 28416934
 20. Bunzow J.R., Saez C., Mortrud M., Bouvier C., Williams J.T., Low M., Grandy D.K. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta, or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett.* 1994; 347 (2-3): 284-288. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00561-3. PMID: 8034019
 21. Arendt R.M., Schmoedel M., Wilbert-Lampen U., Plasse A., Heucke L., Werdan K. Bidirectional effects of endogenous opioid peptides on endothelin release rates in porcine aortic endothelial cell culture: mediation by delta opioid receptor and opioid receptor antagonist-insensitive mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 272 (1): 1-7. PMID: 7815321
 22. Stefano G.B., Hartman A., Bilfinger T.V., Magazine H.I., Liu Y., Casares F., Goligorsky M.S. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (51): 30290-30293. PMID: 8530450
 23. Коробов Н.В. Даларгин — опиоидный пептид периферического действия. *Фармакология и токсикология*. 1988; 51 (4): 35-38. PMID: 3191970
 24. Липатов И.С., Тезиков Ю.В., Бобрышова Э.В., Пурегин П.П., Потапова И.А., Зарубин Ю.П., Якимова Н.А. Иммуные механизмы повреждения эндотелия у беременных и иммунобиологические эффекты синтетического аналога лей-энкефалина — даларгина: клинико-экспериментальное исследование. *Вестник СамГУ*. 1999; 2 (12): 150-156.
 25. Донцов А.В. Антиоксидантный эффект даларгина у пациентов с ишемической болезнью сердца и метаболическим синдромом. *Эксперим. клин. фармакология*. 2015; 78 (7): 3-6. PMID: 26591199.
 26. Abello P.A., Fidler S.A., Bulkley G.B., Buchman T.G. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch. Surg.* 1994; 129 (2): 134-140. DOI: 10.1001/archsurg.1994.01420260030003. PMID: 8304825
 - dria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice. *Aging (Albany NY)* 2015; 7 (7): 475-485. DOI: 10.18632/aging.100772. PMID: 26187706
 13. Winn R.K., Harlan J.M. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *J. Thromb. Haemostasis*. 2005; 3 (8): 1815-1824. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01378.x. PMID: 16102048
 14. Bannerman D.D., Sathiamoorthy M., Goldblum S.E. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (52): 35371-35380. DOI: 10.1074/jbc.273.52.35371. PMID: 9857080
 15. Galkin I.I., Pletyushkina O.Yu., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Biryukov I.S., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF-induced endothelial cell damage. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79 (2): 124-130. DOI: 10.1134/S0006297914020059. PMID: 24794727. [In Russ., In Engl.]
 16. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1983; 80 (12): 3734-3737. DOI: 10.1073/pnas.80.12.3734. PMID: 6407019
 17. Romaschenko V.P., Zinovkin R.A., Galkin I.I., Zakharova V.V., Panteleyeva A.A., Tokarchuk A.V., Lyamzaev K.G., Pletyushkina O.Yu., Chernyak B.V., Popova E.N. Low concentrations of uncouplers of oxidative phosphorylation prevent inflammatory activation of endothelial cells by Tumor Necrosis Factor. *Biochemistry (Mosc)*. 2015; 80 (5): 610-619. DOI: 10.1134/S0006297915050144. PMID: 26071781. [In Russ., In Engl.]
 18. Vandenbroucke E., Mehta D., Minshall R., Malik A.B. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1123: 134-145. DOI: 10.1196/annals1420.016. PMID: 18375586
 19. Polat G., Ugan R.A., Cadirci E., Halici Z. Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches. *Eurasian J. Med.* 2017; 49 (1): 53-58. DOI: 10.5152/eurasianjmed2017.17062. PMID: 28416934
 20. Bunzow J.R., Saez C., Mortrud M., Bouvier C., Williams J.T., Low M., Grandy D.K. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta, or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett.* 1994; 347 (2-3): 284-288. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00561-3. PMID: 8034019
 21. Arendt R.M., Schmoedel M., Wilbert-Lampen U., Plasse A., Heucke L., Werdan K. Bidirectional effects of endogenous opioid peptides on endothelin release rates in porcine aortic endothelial cell culture: mediation by delta opioid receptor and opioid receptor antagonist-insensitive mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 272 (1): 1-7. PMID: 7815321
 22. Stefano G.B., Hartman A., Bilfinger T.V., Magazine H.I., Liu Y., Casares F., Goligorsky M.S. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (51): 30290-30293. PMID: 8530450
 23. Korobov N.V. Dalargin is an opioid peptide of peripheral action. *Farmakologiya i Toksikologiya*. 1988; 51 (4): 35-38. PMID: 3191970. [In Russ.]
 24. Lipatov I.S., Tezikov Yu.V., Bobryashova E.V., Purygin P.P., Potapova I.A., Zarubin Yu.P., Yakimova N.A. The immune mechanisms of the damage of the endothelium of the pregnant and immunobiological effects of the synthetic analogue of leu-enkephalin — dalargin: clinical-experimental research. *Vestnik Samarskogo MGU*. 1999; 2 (12): 150-156. [In Russ.]
 25. Dontsov A.V. The antioxidant effect of dalargin in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome. *Ekspperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2015; 78 (7): 3-6. PMID: 26591199. [In Russ.]
 26. Abello P.A., Fidler S.A., Bulkley G.B., Buchman T.G. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch. Surg.* 1994; 129 (2): 134-140. DOI: 10.1001/archsurg.1994.01420260030003. PMID: 8304825

Поступила 01.07.17

Received 01.07.17

Диссертации на соискание ученой степени доктора наук без опубликования основных научных результатов в ведущих журналах и изданиях, перечень которых утвержден Высшей аттестационной комиссией, будут отклонены в связи с нарушением п. 10 Положения о порядке присуждения ученых степеней.

Перечень журналов ВАК, издаваемых в Российской Федерации по специальности 14.01.20 «Анестезиология и реаниматология», в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата медицинских наук:

- *Анестезиология и реаниматология;*
- *Общая реаниматология.*

Перспективы использования средств на основе митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 в лечении труднозаживающих ран (обзор)

Р. А. Зиновкин^{1,2,3}, Е. Н. Попова¹, О. Ю. Плетюшкина¹,
О. П. Ильинская⁴, В. М. Писарев^{5,6,7}, Б. В. Черняк¹

¹ НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Россия, 119992, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1 стр. 40

² НИИ Митоинженерии, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Россия, 119992, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1 стр. 73А

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

⁴ Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1 стр. 12

⁵ НИИ Общей реаниматологии им. В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

⁶ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Минздрава России,
Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1

⁷ Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора,
Россия, 111123, г. Москва, ул. Новогиревская, д. 3а

Prospects for Drugs Based on the Mitochondria-Targeting Antioxidant SkQ1 in Treatment of Wounds with Impaired Healing

Roman A. Zinovkin^{1,2,3}, Ekaterina N. Popova¹, Olga Yu. Pletjushkina¹,
Olga P. Ilyinskaya⁴, Vladimir M. Pisarev^{5,6,7}, Boris V. Chernyak¹

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1 Leninskie Gori Str., Build. 40, Moscow 119234, Russia

² Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University,
1 Leninskie Gori Str., Build. 73A, Moscow 119992, Russia

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,
8 Trubetskaya Str., Build. 2, 119991 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1 Leninskie Gori Str., Build. 12, Moscow 119234, Russia

⁵ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Scientific and Clinical Center of Reanimatology and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia

⁶ D. Rogachev Federal Scientific Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia,
1 Samora Mashela Str., GSP-7, 117997 Moscow, Russia

⁷ Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor,
3a Novogireevskaya Str., 111123 Moscow, Russia

Длительно заживающие, хронические раны являются нерешенной проблемой современной медицины. Важнейшую роль в патогенезе таких ран при старении, диабете, многих патологических состояниях играет избыточный окислительный стресс. Обзор посвящен роли митохондрий в этом стрессе и перспективам использования новых митохондриально-направленных антиоксидантов для терапии труднозаживающих ран. Недавние исследования на старых мышцах и мышцах с диабетом 2-го типа показали, что отечественный митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 [10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония] стимулирует заживление полнотканых кожных ран. Прием SkQ1 ускоряет протекание воспалительной фазы заживления, созревание грануляционной ткани, ангиогенез и эпителизацию ран. Противовоспалительное действие SkQ1, возможно, связано со снижением воспалительной активации эндотелия сосудов, которая характерна для старения, диабета и других патологий. Локальное введение SkQ1 также ускоряет заживление ран и имеет выраженное противовоспалительное действие при экспериментальном моделировании острого асептического воспаления. Кроме того, SkQ1 стимулирует апоптоз нейтрофилов и подавляет их активацию, а также угнетает воспалительную активность тучных клеток. В условиях моделирования раневого процесса *in vitro* SkQ1 ускоряет движение эпителиоцитов и фибробластов в «рану» и стимулирует миофибробластную дифференцировку подкожных фибробластов человека. Можно полагать, что препараты для локальной терапии труднозаживающих ран на основе SkQ1 послужат эффективным средством борьбы с длительно незаживающими ранами, в том числе — у пациентов с хроническими критическими состояниями.

Ключевые слова: активные формы кислорода; митохондрии; заживление ран

Адрес для корреспонденции:

Роман Зиновкин
E-mail: roman.zinovkin@gmail.com

Correspondence to:

Roman Zinovkin
E-mail: roman.zinovkin@gmail.com

Chronic wounds with impaired wound healing that require prolong time for healing remain unsolved problem of modern medicine. Excessive oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of chronic wounds caused by aging, diabetes and other pathologies. This review is aimed at the role of mitochondria in oxidative stress and to the future prospects for using the innovative mitochondria targeted antioxidants for treatment of impaired wounds. Recent studies in old mice and mice with type 2 diabetes showed that the mitochondrial antioxidant SkQ1 [10- (6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium] stimulates healing of full-thickness dermal wounds. SkQ1 accelerates inflammatory stage of wound healing, maturation of granulation tissue, angiogenesis and epithelization of wounds. The anti-inflammatory effect of SkQ1 is possibly connected to decreased inflammatory activation of the vascular endothelium, which is typical for aging, diabetes and other pathologies. Local administration of SkQ1 also accelerates wound healing and provides strong anti-inflammatory effect in the model of acute aseptic inflammation. In addition, SkQ1 to stimulate apoptosis of neutrophils and suppresses their activation, as well as suppresses inflammatory activation of mast cells. In the wound model *in vitro*, SkQ1 accelerates movement of epithelial cells and fibroblasts into the «wound» and stimulates differentiation of human subcutaneous fibroblasts to myofibroblasts. Reviewed data suggest that SkQ1-based topical drugs have a great potential to treat wounds that exhibit impaired healing also in patients suffering from chronic critical illness.

Keywords: reactive oxygen species; mitochondria; wound healing

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-69-86

Введение

Длительно незаживающие или хронические раны остаются существенной медицинской проблемой. Настоящий обзор сконцентрирован на анализе значения активных форм кислорода (АФК) в патогенезе хронических ран, участия митохондрий в генерации АФК и окислительном стрессе, а также на перспективах применения нового класса соединений — митохондриально-направленных антиоксидантов. Основная цель обзора — подробно обсудить уникальные результаты, полученные авторами данного обзора, по (а) действию митохондриально-направленных антиоксидантов на заживление ран в моделях с использованием лабораторных животных *in vivo* и (б) изучению механизмов действия митохондриально-адресованных антиоксидантов с использованием подходов *in vitro*.

Заживление ран является важнейшей комплексной реакцией организма на повреждения. В этом процессе участвуют многие типы клеток, в том числе лейкоциты, эпителиоциты, фибробласты и макрофаги, а также многочисленные гуморальные факторы, вырабатываемые этими клетками [1]. Успешное заживление ран достигается с помощью четырех четко запрограммированных фаз: гемостаза, воспаления, пролиферации и ремоделинга. Эти фазы частично перекрываются, но для осуществления нормального ранозаживления, каждая из этих фаз должна начинаться и заканчиваться в определенное время [1].

Гемостаз заключается в вазоконстрикции и образовании фибринового сгустка, однако вскоре наступает процесс активной вазодилатации, который сопровождается увеличением капиллярной проницаемости [2]. Ключевым медиатором, обеспечивающим этот процесс, является гистамин, выделяемый тканевыми тучными клетками (ТК) [3]. Таким образом начинается фаза воспаления: в рану последовательно мигрируют нейтрофилы, затем моноциты, тканевые макрофаги и лимфоциты. Нейтрофилы выделяют большое количество

Introduction

Long-term non-healing or chronic wounds remain one of the urgent medical problems. This review does not pretend to fully analyze all aspects of the pathogenesis of wound healing. Rather, the review is focused most on the analysis of the significance of active forms of oxygen (ROS) in the pathogenesis of chronic wounds, the involvement of mitochondria in the generation of ROS and oxidative stress, and also on the prospects of using a new class of compounds, mitochondria-targeted antioxidant drugs (MAD). The main objective of the review is to discuss in detail the unique results obtained by the authors of this review on (a) evaluating the effects of MAD on wound healing in *in vivo* models using laboratory animals and (b) studying the mechanisms of action of MAD *in vitro*.

Wound healing includes complex reaction of an organism to injuries. Various types of cells contribute to this process, including leukocytes, epithelial cells, fibroblasts and macrophages, as well as numerous cytokines produced by these cells [1]. Successful wound healing is achieved through four finely defined programmed phases: hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling. These phases partially overlap, but each phase should begin and terminate at a certain time. Wound healing can be impaired by many different factors acting on one or more phases in this process [1].

Wound healing begins with hemostasis (blood clotting). After the injury, vasoconstriction and formation of a fibrin clot contribute to stopping the bleeding [2]. Soon, however, a process of active vasodilation begins, accompanied by an increase in capillary permeability [2]. The key mediator of increased permeability is histamine liberating from mast cells [3]. After the hemorrhage stops the inflammatory phase begins: neutrophils, then monocytes, then tissue macrophages and lymphocytes are subsequently migrated into the wound. The main function of neutrophils is to destroy pathogens and damaged cells. Neutrophils produce a large number of cytokines, proteases and reactive oxygen species (ROS), which not

цитокинов, протеаз и активных форм кислорода (АФК), которые не только уничтожают патогенов, но также вызывают дополнительное повреждение тканей [4]. Макрофаги на ранних стадиях синтезируют цитокины, которые усиливают воспалительный ответ и дополнительно привлекают лейкоциты к ране. На более поздних стадиях макрофаги способствуют разрешению воспаления, очищая рану от апоптотических клеток, в первую очередь нейтрофилов [5].

Пролиферативная фаза заключается в реэпителизации, при которой происходит пролиферация и миграция клеток эпителия, а также в формировании грануляционной ткани. Первостепенную роль в формировании грануляционной ткани играют фибробласты, синтезирующие первичный внеклеточный матрикс [5]. В построении и последующем ремоделинге грануляционной ткани и формировании рубца важную роль играет дифференцировка фибробластов в миофибробласты [6]. Миофибробласты обладают повышенной способностью к сокращению, что способствует стягиванию краев раны, а также секретируют ферменты, расщепляющие первичный внеклеточный матрикс (такие как металлопротеазы внеклеточного матрикса) и интенсивно синтезируют новый внеклеточный матрикс, волокна которого более упорядочены. Важную роль в заживлении играет прорастание сосудов в грануляционную ткань [7]. Этот процесс происходит главным образом благодаря пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, которые активируются гипоксией и проангиогенными факторами, такими как фактор роста эндотелия (VEGF) [7].

На последней стадии ранозаживления происходит ремоделирование рубца. Происходит частичный лизис незрелых неправильно ориентированных и избыточных коллагеновых волокон под действием матриксных металлопротеаз, выделяемых макрофагами, фибробластами и эндотелиальными клетками, и постепенное их замещение более толстыми фибриллами [3].

Труднозаживающие раны и окислительный стресс

Хронические раны характеризуются нарушением нормальной смены стадий ранозаживления. Этиология хронических ран разнообразна, но подавляющее большинство из них связано с сосудистой недостаточностью, диабетом и старческими изменениями [8]. Безусловно, основным подходом для лечения подобных ран является устранение соответствующих повреждающих факторов, однако этот вопрос не является целью настоящего обзора. Несмотря на различную этиологию, нарушение заживления ран происходит по общему сценарию. Для них характерно удлинение воспалительной фазы, продолжительное персистирование нейтро-

only destroy pathogens but induce additional tissue damage [4]. Macrophages perform several functions in the process of wound healing. In the early stages they synthesize cytokines that enhance the inflammatory response and attract additional white blood cells to the wound. Later, macrophages contribute to resolving the inflammation, clearing the wound from apoptotic cells, primarily neutrophils [5].

Proliferative phase partially overlaps with inflammatory phase and includes (a) re-epithelialization where the proliferation and migration of epithelial cells occurs, and (b) formation of granulation tissue. The primary function in the formation of granulation tissue is fulfilled by fibroblasts, which synthesize the primary extracellular matrix, which consists of collagen, glycosaminoglycans and other proteoglycans. Differentiation of fibroblasts into myofibroblasts is necessary for the construction and subsequent remodeling of granulation tissue and scar formation [5]. Myofibroblasts have an increased ability to contract which helps to tighten the edges of the wound and secrete enzymes that break down the primary extracellular matrix (such as extracellular matrix metalloproteases, MMPs) and synthesize extensively a new extracellular matrix with fibers more ordered and composed of collagen, fibronectin and other proteoglycans [6]. Infiltration of growing vessels within the granulation tissue seems to be essentially required for wound healing [7]. Migration and proliferation of endothelial precursor cells and endothelial cells activated by hypoxia and proangiogenic factors, such as endothelial growth factor (VEGF), significantly contribute to this stage of healing [7].

At the last phase of wound healing remodeling occurs. Remodeling includes partial lysis of immature, wrongly oriented and excessive collagen fibers due to MMPs excreted by macrophages, fibroblasts and endothelial cells, with gradual (1–2 years) replacement by thicker fibers [3].

Impaired Wound Healing and Oxidative Stress

Chronic wounds are characterized by altered changes of wound healing phases. The etiology of chronic wounds is diverse but the vast majority is associated with insufficiency of blood vessels, diabetes and age-related changes [8]. Elimination of factors of alteration are considered as the main approach to chronic wounds treatment, however, this problem remains out of scope of this review. Despite different etiology, the wound healing disorders occur in accordance to common scenario. Lengthening of the inflammatory phase, prolonged persistence of neutrophils, slowing down of granulation tissue formation, angiogenesis and epithelialization remain the main patterns typical for delayed wound healing [9].

Venous insufficiency remains one of the most common causes of chronic wound appearance [10]. Al-

филов, замедление формирования грануляционной ткани, ангиогенеза и эпителизации [9].

Венозная недостаточность является одной из распространенных причин возникновения хронических ран [10]. Нарушение нормального кровотока, с одной стороны, приводит к затруднению миграции клеток из кровяного русла к месту повреждения, а, с другой стороны, способствует постоянной гипоксии поврежденных тканей.

Артериальная недостаточность вызывается, как правило, эндотелиальной дисфункцией, сопровождающей диабет или иные патологии, и также может приводить к появлению ишемизированных незаживающих ран [11].

Возраст является важным фактором риска нарушения ранозаживления. Старение практически всегда сопровождается окислительным стрессом и изменениями в иммунной системе. С возрастом каждая фаза ранозаживления претерпевает характерные изменения: происходит повышение секреции воспалительных медиаторов, задержка инфильтрации макрофагов и лимфоцитов, нарушение фагоцитоза, снижение секреции факторов роста, отсроченный ангиогенез и реэпителизация, уменьшение скорости ремоделинга коллагена [12].

Важно отметить, что как гипоксия, так и гипероксия, приводят к повышению уровня АФК [13]. Особенно высокий уровень АФК вызывается повторяющейся ишемией-реперфузией, характерной для пролежней.

Согласно последним данным, одной из основных причин возникновения труднозаживающих ран является хронический окислительный стресс, при котором уровень АФК остается высоким в течение продолжительного времени [14]. Окислительный стресс развивается из-за действия целого ряда факторов, характерных для большинства хронических ран: бактериального осеменения, локальной гипоксии тканей и старческих изменений [1, 15, 16].

Для нормального ранозаживления требуется тонкий баланс между положительной ролью АФК и их потенциально деструктивным действием. В тканях раневой области происходит активное образование АФК, которые выполняют как бактерицидную, так и регуляторную функцию [14, 17–19]. Концентрация пероксида водорода в раневом экссудате на фазе воспаления достигает сотен микромолей на литр и затем постепенно снижается [17]. В фазе регенерации АФК в низких концентрациях стимулируют образование грануляционной ткани и ангиогенез [20].

После повреждения кожи микроорганизмы, находящиеся на ее поверхности, неизбежно попадают в ткани организма. Уничтожение микроорганизмов происходит на стадии воспаления, на которой используется богатый арсенал системы врожденного иммунитета. Однако, при недостаточно эффективной деkontаминации, воспалительная фаза продолжается, так как оставшиеся микроорга-

низмы приводят к снижению нормального кровотока, что приводит к снижению миграции клеток из крови к месту повреждения и увеличению постоянной гипоксии. Артериальная недостаточность является результатом эндотелиальной дисфункции, которая ассоциирована с диабетом и другими патологиями. Это также может привести к появлению ишемических ран с замедленным заживлением [11].

Возраст пациента относится к одному из ключевых факторов нарушения процесса заживления. Старение почти всегда связано с увеличением окислительного стресса и множественными изменениями в иммунной системе. С возрастом каждая фаза заживления ран претерпевает специфические изменения: увеличение секреции воспалительных медиаторов, задержка инфильтрации макрофагов и лимфоцитов, изменение фагоцитоза, снижение секреции факторов роста, задержка ангиогенеза и реэпителизации, и уменьшение скорости ремоделирования коллагена [12].

Важно отметить, что как гипоксия, так и гипероксия приводят к увеличению уровня ROS [13]. Высокий уровень ROS вызывается повторяющейся ишемией-реперфузией, которая является особенностью пролежней.

Согласно последним данным, одной из основных причин возникновения труднозаживающих ран является хронический окислительный стресс, при котором уровень ROS остается высоким в течение продолжительного времени [14]. Окислительный стресс развивается из-за действия целого ряда факторов, характерных для большинства хронических ран: бактериального осеменения, локальной гипоксии тканей и старческих изменений [1, 15, 16].

Для нормального заживления ран требуется тонкий баланс между положительной ролью ROS и их потенциально деструктивным действием. В тканях раневой области происходит активное образование ROS, которые выполняют как бактерицидную, так и регуляторную функцию [14, 17–19]. Концентрация пероксида водорода в раневом экссудате на фазе воспаления достигает сотен микромолей на литр и затем постепенно снижается [17]. В фазе регенерации ROS в низких концентрациях стимулируют образование грануляционной ткани и ангиогенез [20].

После повреждения кожи микроорганизмы, находящиеся на ее поверхности, неизбежно попадают в ткани организма. Уничтожение микроорганизмов происходит на стадии воспаления, на которой используется богатый арсенал системы врожденного иммунитета. Однако, при недостаточно эффективной деkontаминации, воспалительная фаза продолжается, так как оставшиеся микроорга-

низмы приводят к снижению нормального кровотока, что приводит к снижению миграции клеток из крови к месту повреждения и увеличению постоянной гипоксии. Артериальная недостаточность является результатом эндотелиальной дисфункции, которая ассоциирована с диабетом и другими патологиями. Это также может привести к появлению ишемических ран с замедленным заживлением [11].

низмы продолжают вызывать продукцию цитокинов воспаления (IL-1, TNF) и хемокинов. При достаточно долгом влиянии микроорганизмов рана может войти в хроническую стадию воспаления, что ведет к повышенной активности матриксных металлопротеиназ (ММП), которые разрушают внеклеточный матрикс и дополнительно препятствуют ранозаживлению. АФК, продуцируемые иммунными клетками, нацелены на уничтожение микроорганизмов, однако их длительная повышенная продукция приводит к дополнительному повреждению тканей.

На ранних стадиях раневые ткани всегда находятся в состоянии гипоксии. Это происходит из-за повреждения сосудов, что приводит к нарушению кровоснабжения, а также активному потреблению кислорода метаболически активными клетками. Временная гипоксия после повреждения запускает процесс ранозаживления, однако длительная или хроническая гипоксия приводит к нарушению этого процесса [21]. Если оксигенация раны не восстанавливается, то процесс ранозаживления затягивается. Хронические раны всегда гипоксичны, для них характерно пониженное парциальное давление кислорода, от 20 до 5 мм рт. ст., тогда как в контрольных тканях это значение находится в диапазоне от 50 до 30 мм рт. ст. [22]. На молекулярном уровне гипоксия тканей приводит в первую очередь к нарушению окислительного фосфорилирования в митохондриях, что снижает выработку АТФ, необходимой для осуществления практически всех метаболических процессов в клетках [23]. В частности, нехватка АТФ чревата нарушением работы кальциевых АТФ-аз и накоплением в клетках ионов кальция, что ведет к запуску внутриклеточных воспалительных каскадов. В результате высвобождаются цитокины воспаления и хемокины, привлекающие к месту повреждения иммунные клетки. Длительное уменьшение количества АТФ может приводить к дальнейшему нарушению функционирования митохондрий, повышенной продукции АФК и гибели клеток и тканей.

Кроме того, гипоксия приводит к индукции экспрессии эндотелиальных молекул адгезии, таких как ICAM-1, VCAM-1, которые способствуют проникновению нейтрофилов и макрофагов к месту повреждения [24]. Длительная экспрессия этих молекул приводит к нарушению разрешения воспаления за счет избыточной инфильтрации иммунных клеток.

На гистологических срезах хронических ран также выявляются общие закономерности. Например, гистологическое исследование трофической язвы нижней конечности при варикозном расширении вен демонстрирует наличие утолщенного и находящегося в состоянии гиперплазии края эпидермиса, примыкающего к основанию язвы, покрытому экссудатом, содержащим некротический детрит [25]. Большинство хронических ран

blood supply, as well as active consumption of oxygen by metabolically active cells. Temporary hypoxia after damage triggers wound healing process, however, prolonged or chronic hypoxia disrupts this process [21]. If the oxygenation of the wound is not restored, the wound healing process is delayed. Chronic wounds are always hypoxic, they are characterized by a decreased partial oxygen pressure from 20 mm Hg to 5 mm Hg, whereas in healthy tissues these values varies within the range of 50 mm Hg to 30 mm Hg. [22]. At the molecular level, tissue hypoxia primarily leads to a suppression of oxidative phosphorylation in the mitochondria thus reducing ATP production required for virtually all metabolic processes in cells [23]. Particularly, the lack of ATP leads to inhibition of calcium ATPase and accumulation of calcium ions in the cells followed by the subsequent activation of intracellular inflammatory cascades. As a result, inflammatory cytokines and chemokines are released that attract immune cells to the site of damage. A prolonged ATP insufficiency may lead to a further mitochondrial dysfunction resulting in increased ROS production and death of cells and tissues.

In addition hypoxia leads to the expression of endothelial adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1, that promote the penetration of neutrophils and macrophages to the site of injury [24]. Prolonged expression of these molecules inhibits further resolution of inflammation due to excessive infiltration of immune cells.

Histological examination of chronic wounds reveals common patterns. For example, a histological examination of the trophic ulcer of the lower limb in varicose veins demonstrates the presence of a thickened and hyperplastic edge of the epidermis adjacent to the base of the ulcer covered with exudate containing necrotic detritus. The majority of chronic wounds are poorly vascularized, there are practically no myofibroblasts, but there is a large number of inflammatory infiltrates represented mainly by neutrophils [25].

Chronic wounds are also characterized by excessive accumulation and activation of mast cells (MC) around blood vessels [26-28]. The main functions of these cells of the immune system are associated with allergic reactions, but MCs are also one of the key initiators and regulators of the inflammatory process. Activation of MC is accompanied by degranulation and release of the contents of intracellular vesicles containing various inflammatory mediators, including histamine, an important player in the field of inflammation. Histamine causes an increase in the permeability of the vessels and edema of the surrounding tissues, thus facilitating the migration of leukocytes to the focus of inflammation. On the other hand, MC secrete VEGF a potent angiogenic factor required for germination of the vessels into the wound tissues. In addition, MCs participate at the final phases of wound healing and their excessive activation can cause the formation of hypertrophic scars.

плохо васкуляризованы, в них практически отсутствуют миофибробласты, но в большом количестве присутствует воспалительный инфильтрат, представленный в основном нейтрофилами [25].

Для хронических ран также характерны избыточное накопление и активация тучных клеток вокруг кровеносных сосудов [26–28]. Основные функции этих клеток иммунной системы связаны с аллергическими реакциями, но ТК также являются одним из ключевых инициаторов и регуляторов воспалительного процесса. Активация ТК сопровождается дегрануляцией с последующим выбросом во внешнюю среду содержимого внутриклеточных везикул, содержащих различные медиаторы воспаления, среди которых важнейшую роль играет гистамин. Гистамин вызывает увеличение проницаемости стенок сосудов и отек окружающих тканей, способствуя тем самым миграции лейкоцитов в очаг воспаления. С другой стороны, ТК секретируют основной фактор роста сосудов VEGF, способствуя прорастанию сосудов в область раны. Кроме того, ТК участвуют в завершающих стадиях ранозаживления и их избыточная активация может вызывать образование гипертрофированных рубцов.

Для лечения хронических ран в клинике недавно стали применять антиоксиданты. Недавнее мультицентровое двойное слепое исследование на 200-х пациентах продемонстрировало эффективность применения пероральной смеси антиоксидантов, аргинина и цинка для лечения пролежней [29]. Еще одно двойное слепое исследование на 20-и пациентах с нарушенным заживлением ран показало эффективность пероральной смеси антиоксидантов (витамина С, α -токоферола, β -каротина, цинка, селена и глутамин) по сравнению с плацебо (мальтодекстреном). Данные антиоксиданты способствовали скорейшей эпителизации раны [30]. В отечественной литературе также описывается положительное действие приема антиоксидантов на процесс ранозаживления [31]. Антиоксиданты стандартно назначаются при лечении венозных трофических язв [32], а также при иных патологиях [33–35].

Таким образом, антиоксиданты при пероральном приеме могут быть успешно использованы для лечения труднозаживающих ран. При этом следует отметить несколько обстоятельств. Во-первых, количество клинических исследований пероральной эффективности антиоксидантов до сих пор невелико и требуются дальнейшие испытания. Во-вторых, зачастую в таких исследованиях одновременно использовалось несколько различных антиоксидантов, а также аминокислоты. Антиоксиданты различной химической природы могут иметь разнообразные биологические активности, и их совместное применение может приводить к разнообразным последствиям. Аминокислота аргинин, например, является субстратом для синтеза оксида азота II

Recently, antioxidants have been used to treat chronic wounds in the clinic. One of recent multicentre, double-blind study in 200 patients have demonstrated the effectiveness of using an oral mixture of antioxidants, arginine and zinc, to treat bed sores [29]. Another double-blind clinical trial in 20 patients with impaired wound healing studied the effectiveness of the oral antioxidant mixture (vitamin C, α -tocopherol, β -carotene, zinc, selenium and glutamine) compared to placebo (maltodextran). These antioxidants contributed to the early epithelization of the wound [30]. The domestic literature also describes the positive effect of prescribed antioxidants on the process of wound healing [31]. Antioxidants are routinely prescribed in the treatment of venous trophic ulcers [32], as well as in other pathologies [33–35].

Thus, when administered orally, antioxidants can be successfully used to treat hardly healing wounds. Several circumstances should be noted. Firstly, the number of clinical studies of the oral effectiveness of antioxidants is still small and further tests are required. Secondly, common for such studies, several different antioxidants, alone or in concert with amino acids, are used. Antioxidants of different chemical nature may have a variety of biological activities, and their combined use causes various consequences. Amino acid arginine, for example, is a substrate for the synthesis of nitric oxide II (NO), which causes vasodilation and has many other physiological activities including anti-bacterial effect. Thirdly, it cannot be ruled out that antioxidants do not reach the wound surface in a significant amount and might act indirectly, affecting the body systems. The effectiveness of topical application of antioxidants, however, has not been thoroughly studied. One of the limited number of studied drugs is mexidol that has been used for the therapy of trophic ulcers [36].

Mitochondria as a Source of ROS

NADPH oxidase is the main source of exogenous ROS during inflammation [35, 36]. This enzyme is present both in phagocytes, ensuring elimination of microorganisms in the inflammatory site and in non-phagocytic cells contributing to regulation of various intracellular signaling pathways. In a case of oxidative stress caused by external factors the mitochondria are considered as the main source of endogenous ROS [39]. The main types of ROS include hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion radical (O_2^-) and hydroxyl radical ($OH^\cdot$).

Over the past few years there has been a breakthrough in understanding the role of mitochondrial ROS in various inflammatory processes. In general, oxidative stress can cause an inflammatory response and excessive inflammation, which in turn cause oxidative stress leading to damage of tissues and organs. Such a vicious circle is described, for example, for activation of inflammasome NLRP3. This inflammasome

(NO), который вызывает вазодилатацию и имеет множество других физиологических активностей, включая антимикробное действие. В-третьих, нельзя исключить, что антиоксиданты не достигают раневой поверхности в значительных количествах и действуют опосредованно, влияя на системы организма. При этом, эффективность местного применения антиоксидантов изучена хуже. Одним из немногих примеров является мексидол, применяемый для терапии трофических язв [36].

Митохондрии как источник АФК

Основным источником экзогенных АФК при воспалении является НАДФН-оксидаза [37, 38]. Этот фермент присутствует как в фагоцитах, обеспечивая уничтожение микроорганизмов в очаге воспаления, так и в нефагоцитирующих клетках, принимая участие в регуляции различных внутриклеточных сигнальных путей. При окислительном стрессе, вызванном внешними окислителями, основным источником эндогенных АФК являются митохондрии [39]. Основными формами АФК являются перекись водорода (H_2O_2), радикал супероксид-аниона (O_2^-) и гидроксильный радикал ($OH^\cdot$).

За последние несколько лет произошел прорыв в понимании роли митохондриальных АФК в различных воспалительных процессах. В целом, окислительный стресс может вызывать воспалительный ответ, а избыточное воспаление, в свою очередь, вызывает окислительный стресс, что приводит к повреждению тканей и органов. Такой порочный круг описан, например, при активации инфламмасомы NLRP3. Эта инфламмазома типична для миелоидных клеток и ответственна за созревание IL-1 β и IL-18. NLRP3 активируется под действием молекулярных образов опасности (DAMPs и PAMPs), которые в большом количестве присутствуют в ранах. Недавно было обнаружено, что митохондриальные АФК вызывают чрезмерную активацию NLRP3 [40] и подавление АФК с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов снижает ее активацию [41].

Митохондриальные АФК также принимают участие в патогенезе атеросклероза [42] и гипертонии [43]. В развитии окислительного стресса при ишемии-реперфузии первоочередную роль играет выброс митохондриями супероксид-аниона [44].

Митохондриально-направленные антиоксиданты

В лаборатории проф. В. П. Скулачева были созданы новые эффективные митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ [45]. Они состоят из антиоксидантной части (пластохинона) и катиона, способного проникать через мембрану (рис. 1). Благодаря положительному заряду эти соединения избирательно накапливаются в

is typical for myeloid cells and is responsible for the maturation of IL-1 β and IL-18. NLRP3 is activated by danger-associated and pathogen-associated molecular patterns (DAMPs and PAMPs, respectively), which are present in large amount in the wounds. Recently, it has been found that mitochondrial ROS cause excessive activation of NLRP3 [40] and inhibition of ROS by mitochondria-targeted antioxidants reduces NLRP3 activation [41].

Mitochondrial ROS also participate in the pathogenesis of atherosclerosis [42] and hypertension [43]. Mitochondrial release of superoxide anion is necessary in the development of oxidative stress in ischemia-reperfusion [44].

Mitochondrially Targeted Antioxidants

New effective mitochondrial antioxidants of the SkQ family were created in the lab of prof. V. P. Skulachev [45]. They consist of an antioxidant part (plastoquinone) and a cation capable of penetrating through the membrane (Fig. 1). Due to the positive charge, these compounds selectively accumulate in the mitochondria, which allows them to be used at extremely low concentrations. High efficiency of SkQ against a wide range of pathologies has been confirmed in numerous experiments on cell cultures and in vivo using experimental animal models of human diseases [46].

The key differences between the mitochondrial antioxidants of the SkQ family (SkQs) from conventional antioxidants include:

1) SkQs are accumulating to act directly at the site of ROS formation, in the inner membrane of the mitochondria [45];

2) SkQs act repeatedly; upon neutralization of ROS, the formulation is oxidized, and then restored by the respiratory chain of the mitochondria. In contrast, classical antioxidants fulfill their function only once: after oxidation, they turn into useless, or even toxic compounds [47];

3) SkQs prevent the oxidation of cardiolipin, a key regulator of cell apoptosis [48].

Currently available, clinically developed SkQs formulation is represented by SkQ1-containing eye drops (Visomitin), and this preparation has been officially registered as a drug for dry eye syndrome treatment (LP-001355 from December 13, 2011). Now SkQ1 formulation undergoes clinical trials for the treatment of glaucoma, maculodystrophy and uveitis.

A large complex of preclinical studies of SkQ1 as an eye drops formulation «Visomitin» has been initiated that include three clinical trials in patients suffering from dry eye syndrome. The lack of eye hydration in this disease leads to damage to the corneal epithelium. The effective restoration of the integrity of the corneal epithelium, i.e. healing of superficial injuries, is an important clinically significant parameter in the medical treatment of dry eye syndrome. This parameter has become a clinical target in

митохондриях, что позволяет использовать их в крайне низких концентрациях. Высокая эффективность SkQ против широкого круга патологических состояний была подтверждена в многочисленных экспериментах на клеточных культурах и *in vivo* на моделях заболеваний человека с использованием лабораторных животных (см. обзор [46]).

Ключевые отличия митохондриальных антиоксидантов семейства SkQ от обычных антиоксидантов заключается в том, что они:

1) действуют непосредственно в месте образования АФК – во внутренней мембране митохондрий [45];

2) действуют многократно, при нейтрализации АФК они окисляются, а затем восстанавливаются дыхательной цепью митохондрий. Классические антиоксиданты выполняют свою функцию однократно. Окислившись, они превращаются в бесполезные, или даже токсичные соединения [47];

3) предотвращают окисление кардиолипина – ключевого регулятора апоптоза клеток [48].

На основе SkQ1 были созданы глазные капли (Визомитин), данный препарат официально зарегистрирован как лекарственное средство от синдрома сухого глаза (ЛП-001355 от 13 декабря 2011 г.), в процессе клинические испытания по применению SkQ1 в лечении глаукомы, макулодистрофии и увеита.

Большой комплекс доклинических экспериментов лекарственной формы SkQ1 – глазных капель «Визомитин» позволил провести 3 отдельных клинических исследования с участием пациентов, страдающих синдромом сухого глаза. Недостаток увлажненности глаза при этом заболевании ведет к повреждению эпителия роговицы. Важным клинически значимым параметром при медикаментозном лечении синдрома сухого глаза является эффективное восстановление целостности эпителия роговицы, т.е. заживление поверхностных повреждений. В клинических исследованиях, а именно открытое рандомизированное российское исследование 2-й фазы [49], мультицентровое двойное слепое плацебоконтролируемое исследование 3-й фазы [50] и проведенное под эгидой управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) исследование в США [51] показали выраженный эффект SkQ1 по ускорению заживления ран роговицы по сравнению с эффектом применения увлажняющих глазных капель того же состава, но без SkQ1.

SkQ1 ускоряет заживление полнослойных кожных ран у старых мышей

Для старых животных характерно нарушение репарационных процессов, что приводит к удлинению воспалительной фазы раневого процесса и к значительному замедлению заживления ран.

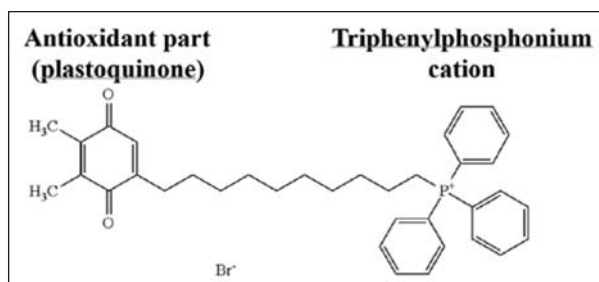


Рис. 1. Структурная формула митохондриально-направленного SkQ1 – действующего вещества глазных капель «Визомитин» и регенерирующего антиоксидантного гидрогеля «Экзомитин».

Fig. 1. Structural formula of mitochondria targeted SkQ1 – active substance of eye drops «Visomitin» and regenerating antioxidant hydrogel «Exomitin».

Примечание. Antioxidant part (plastoquinone) – антиоксидантная часть (остаток пластохинона); Triphenylphosphonium cation – катион трифенилфосфоний.

recent clinical trials. They included: an open, randomized Russian phase 2 study [49], a multicenter double-blind placebo-controlled study of the 3rd phase [50] and a study conducted in the United States under the control of Food and Drug Administration, USA [51]. Trials have demonstrated a significant therapeutic effect of SkQ1 on accelerating the healing of the corneal wounds compared to the effect of the same composition of moisturizing eye drops without SkQ1.

SkQ1 Accelerates the Healing of Full-Thickness Skin Lesions in Older Mice

Old animals are characterized by impaired repair processes leading to an elongation of the inflammatory phase of the wound and to a significant delay in wound healing.

In experiments with old (24 months) female CBAx57Bl/6 hybrids, a significant effect in wound area reduction was observed at the early stages of healing (1–5 days) [52]. In the experimental group ($n=10$) the animals orally received SkQ1 at a daily dose of 100 nmol/kg of body mass for 8 months starting from the age of 16 month. The dynamics of wound area reduction in old mice receiving SkQ1 was almost identical to the dynamics observed in young animals (Fig. 2, a). Histological analysis of wounds on the 7th day showed that in the group of young animals the damage area was completely filled with granulation tissue, and in old mice the centers of granulation formation were located only along the edges of the wound (Fig. 3, a). In the old SkQ1 mice, an abundant vascularized granulation tissue filled almost the entire area of the wound defect. Granulations contained more mature and regularly oriented collagen fibers and less leukocyte infiltration. The administration of SkQ1 increased the content of myofibroblasts in the granulation tissue, which, apparently, accelerated its maturation. Morphometric analysis revealed a significant decrease in the volume density

В экспериментах на старых (24 мес.) самках мышей гибридов СВАхС57Bl/6 наблюдалось значительное замедление сокращения площади ран на ранних этапах заживления (1–5 сут.) [52]. В опытной группе ($n=10$) животные перорально получали SkQ1 в суточной дозе 100 нмоль/кг веса в течение 8 мес. начиная с 16-ти мес. возраста. Динамика сокращения площади ран у старых мышей, получавших SkQ1, была практически идентична динамике, наблюдавшейся у молодых животных (рис. 2, а). Гистологический анализ ран на 7-е сутки показал, что в группе молодых животных область повреждения была целиком заполнена грануляционной тканью, а у старых мышей очаги формирования грануляций были расположены только по краям раны (рис. 3, а). У старых мышей, получавших SkQ1, обильно васкуляризованная грануляционная ткань заполняла практически всю область раневого дефекта, в ней располагались более зрелые и регулярно ориентированные коллагеновые волокна, реже встречались очаги лейкоцитарной инфильтрации. Прием SkQ1 повышал содержание миофибробластов в грануляционной ткани, что, по-видимому, ускоряло ее созревание. Морфометрический анализ выявил значительное снижение объемной плотности сосудов в грануляционной ткани у старых животных по сравнению с молодыми. Значение этого показателя у старых мышей, получавших SkQ1, достоверно повышалось, и было сопоставимо с объемной плотностью сосудов в ранах молодых животных. Этот эффект SkQ1 во многом способствовал заполнению поврежденной области грануляционной тканью, поддерживая ее оксигенацию и питание. У старых животных наблюдалось замедление эпителизации раны, при этом SkQ1 вызвал значительное ускорение этого процесса, не влияя на толщину эпидермиса. Никакого эффекта SkQ1 на толщину рубца также не было обнаружено. В целом, динамика заживления ран у старых мышей, получавших SkQ1, напоминала таковую у молодых животных.

Анализ воспалительного процесса выявил значительное усиление нейтрофильной инфильтрации ран у старых мышей по сравнению с молодыми, а SkQ1 вызвал достоверное снижение числа нейтрофилов. У старых животных наблюдалось заметное снижение макрофагальной инфильтрации по сравнению с молодыми на 7-е сут. заживления, а на 13-е сут. число макрофагов в ранах старых мышей примерно в 2 раза превышало его значение у молодых. В ранах старых мышей, получавших SkQ1, численность макрофагов на 7-е сут. значительно возрастала и сохранялась на том же уровне и на 13-е сут. Таким образом, полученные результаты указывали на нормализацию воспалительной фазы заживления ран у старых животных под действием SkQ1.

SkQ1 ускоряет заживление полнослойных кожных ран у мышей с диабетом 2 типа.

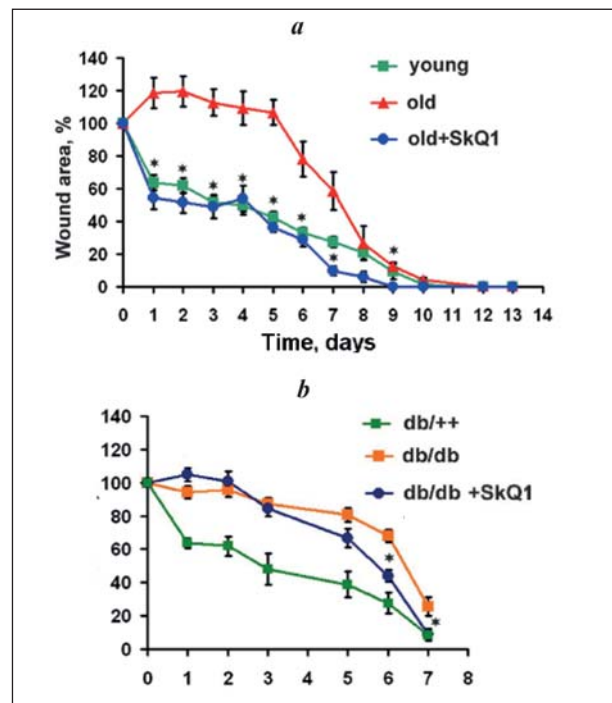


Рис. 2. Влияние SkQ1 на изменение относительной площади раневой поверхности у мышей: старых (а) и при врожденном диабете 2-го типа (б). Воспроизведено из [51, 52].

Fig. 2. Changes in the relative area of the wound surface in old (a) and diabetic-prone (b) mice after SkQ1 administration. Reproduced from [51, 52].

Note. a — old mice age is 24 months; young mice age is 6 months. For Fig. 2, 3: * — significant difference vs. old mice group not receiving SkQ1 (a) and vs. db/db mice group not receiving SkQ1 (b); $P<0.05$; data are presented as mean $\pm$ SEM

Примечание. а — возраст старых мышей — 24 мес., молодых — 6 мес. Для рис. 2, 3: * — достоверное отличие от значений группы старых мышей, не получавших SkQ1 (а) и от значений группы db/db мышей, не получавших SkQ1 (б), $p<0.05$; данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

of blood vessels in granulation tissue in old animals compared to young ones. This value in the old mice receiving SkQ1 was significantly increased and was comparable to the bulk density of the vessels in the wounds of young animals. This effect of SkQ1 greatly contributed to the filling of the damaged area with granulation tissue, supporting its oxygenation and nutrition. In old animals, a delay in epithelialization of the wound was observed, while SkQ1 caused significant acceleration of this process, without affecting the thickness of the epidermis. No effect of SkQ1 on the thickness of the scar was found. In general, the dynamics of wound healing in old mice that received SkQ1 resembled that of young animals.

An analysis of the inflammatory process revealed a significant increase of neutrophil infiltration in the wounds of old mice compared to young mice, and SkQ1 caused a significant decrease in the number of neutrophils. Old animals showed a marked decrease in macrophage infiltration compared to the young animals observed on the 7th day of healing, and on the 13th

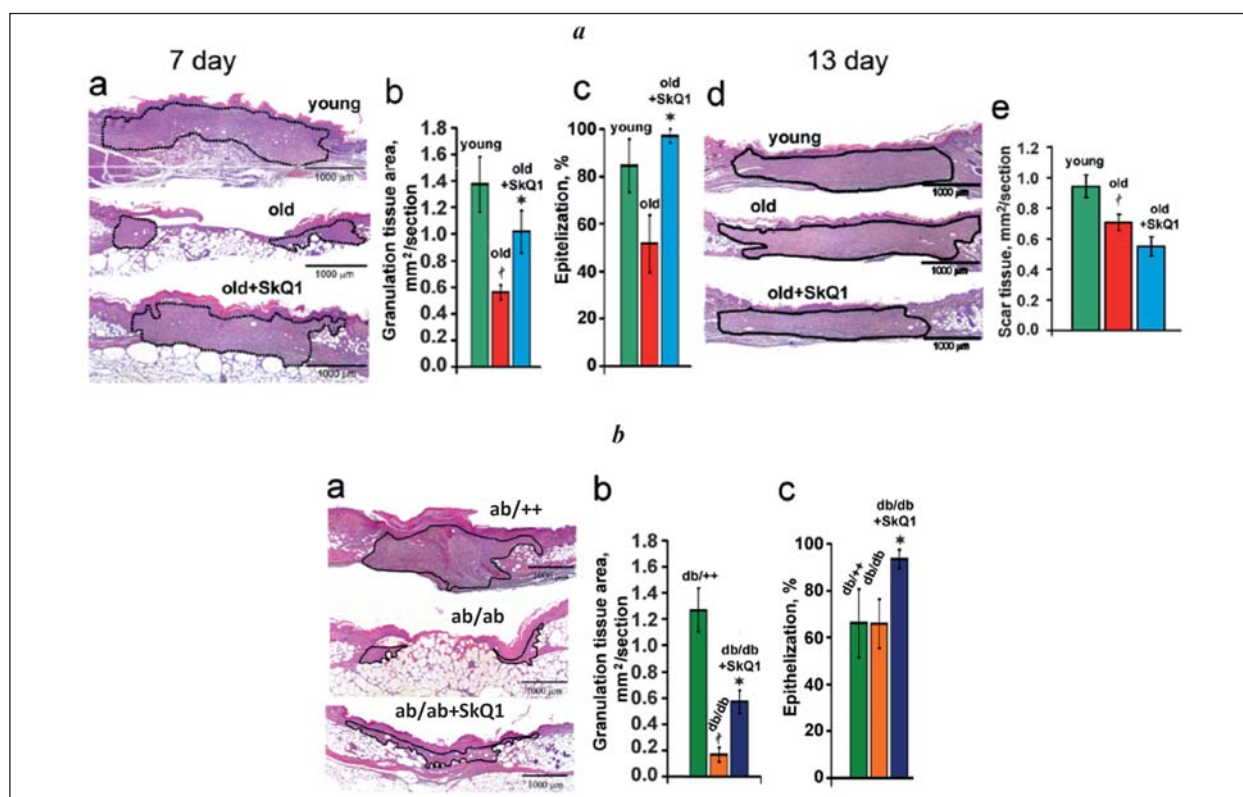


Рис. 3. Влияние SkQ1 на образование грануляционной ткани и эпителизацию ран у мышей: старых (a) и при врожденном диабете 2-го типа (b). Воспроизведено из [51, 52].

Fig. 3. SkQ1 accelerates the formation of granulation tissue and epithelization of wounds in old (a) and diabetic-prone (b) mice. Reproduced from [51, 52].

Note. Histological sections of the central region of wounds were stained with hematoxylin-eosin on day 7 (a, b, c) and day 13 (d, e) after injury; the area of the granulation or scar tissue is surrounded by dotted lines. * — $P < 0.05$.

Примечание. Гистологические срезы центральной области ран мышей окрашены гематоксилин-эозином на 7-ой (a, b, c) и 13-ый (d, e) день после ранения; область грануляционной или рубцовой ткани обведена точечными линиями; b — площадь грануляционной ткани; c — эпителизация ран; e — образование рубцовой ткани. * — $p < 0.05$.

Формирование незаживающих ран является одним из основных осложнений при диабете. В качестве модели этой патологии были использованы мыши линии C57BL leprdb (db/db) с врожденным диабетом 2-го типа [53]. Длительный прием SkQ1 не снижал основных признаков диабета (гипергликемия, ожирение, полиурия) у этих мышей, но снижал выраженность маркеров окислительного стресса. Заживление ран у диабетических мышей было резко замедлено по сравнению с гетерозиготными животными (C57BL lepr db/+). Мыши опытной группы ($n=8$) ежедневно получали SkQ1 перорально в дозе 250 нмоль/кг веса в сутки в течение 12 недель, начиная с 10-недельного возраста. Прием SkQ1 практически полностью нормализовал заживление ран у db/db мышей (рис. 2, b). Гистологический анализ ран выявил у db/db мышей те же патологические изменения, что и у старых животных. SkQ1 вызывал нормализацию как формирования грануляционной ткани, так и воспалительной фазы процесса. Особо ярко был выражен эффект стимуляции ангиогенеза под действием SkQ1. У db/db мышей не наблюдалось заметного торможения эпителизации раны, но и в

day the number of macrophages in the wounds of old mice was twice higher than in young mice. In the wounds of the old mice receiving SkQ1, the number of macrophages on the 7th day increased significantly and remained at the same level on the 13th day. Thus, the results demonstrate the abrogation of the inflammatory phase of wound healing in old animals under the action of SkQ1.

SkQ1 Accelerates Healing of Full-Thickness Skin Wounds in Mice with Type 2 Diabetes

Non-healing wounds represent one of the major complications in diabetes mellitus. As a model of this pathology the C57BL leprdb (db/db) mice genetically predisposed to type 2 diabetes development [53] were used. Long-term administration of SkQ1 did not reduce the main features of diabetes in these mice (hyperglycemia, obesity, polyuria), but reduced the expression of markers of oxidative stress. Wound healing in diabetic mice was significantly delayed compared to heterozygous animals (C57BL lepr db/+). Mice of the experimental group ($n=8$) daily received

этом случае SkQ1 заметно ускорял процесс. Аномально длительная воспалительная фаза раневого процесса продолжалась у db/db в той же степени, что и у старых животных, а прием SkQ1 ее нормализовал. Вероятно, окислительный стресс, сопровождающий диабетическую патологию, во многом определяет затрудненное заживление ран. SkQ1 значительно ускорял образование грануляционной ткани у диабетических мышей, не вызывая при этом гипертрофии рубцовой ткани (рис. 3, *b*).

Локальное введение SkQ1 ускоряет репаративные процессы в полнослойных кожных ранах у крыс

В первой серии экспериментов крысам ежедневно под кожу вокруг ран инъецировали 50 мкл 200 нМ раствора SkQ1. Забор материала для гистологического анализа проводили через 7 часов, 1–3, 5 и 14 сут. Было обнаружено статистически значимое уменьшение площади раны на пятый день эксперимента. Подсчет количества нейтрофилов на ранних сроках заживления ран показал более чем двукратное уменьшение количества нейтрофилов через 7 час. В фазе созревания грануляционной ткани SkQ1 вызывал 3-х кратное увеличение количества миофибробластов, экспрессирующих гладкомышечный бета-актин [54].

Во второй серии экспериментов крысам линии Sprague-Dawley на раны накладывали пленочное покрытие «Биоплен» с 0,019 мкг SkQ1/г пленки. Смену пленок проводили один раз в 3 дня в течение 14 сут. Статистически значимое уменьшение площади раны по сравнению с контролем было обнаружено на 4-ый и 7-ой дни. Гистологический анализ на 14-е сутки эксперимента показал, что в затянувшихся к этому времени ранах у животных, получавших SkQ1, содержатся более толстые пучки коллагеновых волокон, чем в контроле, что может быть связано с повышением активности миофибробластов [54].

Исследования противовоспалительного действия SkQ1 *in vivo*

Для старения характерен повышенный уровень системного воспаления. В экспериментах со старыми мышами было установлено, что длительный прием SkQ1 снижает воспалительную активацию эндотелия сосудов, измеренную по уровню экспрессии молекул адгезии [55]. В модели синдрома острого воспалительного ответа вызванного внутривенным введением летальных или сублетальных доз фактора некроза опухолей (TNF). SkQ1 также снижал воспалительную активацию эндотелия [56]. Интраперитонеальное введение SkQ1 не только понижало экспрессию молекул адгезии в эндотелии сосудов, но и предотвращало гибель мышей в этой модели. Подавление избы-

SkQ1 orally at a dose of 250 nmol/kg of weight per day for 12 weeks, starting at 10 weeks of age. SkQ1 almost completely normalized wound healing in db/db mice (Fig. 2, *b*). Histological analysis of wounds revealed the same pathological changes in db/db mice as in old animals. SkQ1 caused normalization of granulation tissue formation and abrogation of the inflammatory phase. SkQ1 effect of stimulation of angiogenesis was particularly pronounced. In db/db mice no inhibition of epithelialization of the wound was observed but SkQ1 markedly accelerated this process. An elongated inflammatory phase continued in db/db to the same extent as in old animals, and the SkQ1 administration normalized it. Probably, the oxidative stress accompanying diabetic pathology causes impaired wound healing in many ways. SkQ1 significantly accelerated the formation of granulation tissue in diabetic mice without scar hypertrophy (Fig. 3, *b*).

Local Administration of SkQ1 Accelerates Reparative Processes in Dermal Wounds in Rats

In the first series of experiments, rats were injected subcutaneously daily with 50 µl of 200 nM SkQ1 solution in the area around the wound. Sampling of material for histological analysis was performed after 7 hours, 1–3, 5 and 14 days. A statistically significant reduction in wound area was observed on the 5th day of the experiment. Counting the number of neutrophils in the early stages of wound healing showed a more than twofold decrease in the number of neutrophils after 7 hours in SkQ1 treated rats. In the maturation phase of the granulation tissue, SkQ1 caused a 3-fold increase in the number of myofibroblasts expressing smooth-muscle beta-actin [54].

In a second series of experiments, wounds in the Sprague-Dawley rats were covered with «Bioplene» film containing 0.019 µg of SkQ1/g. Change of films was carried out once in 3 days for 14 days. A statistically significant reduction in wound area compared to the control was detected on the 4th and 7th days. Histological analysis on the 14th day of the experiment showed that in the wounds that were closed by this time, the animals receiving SkQ1 contained thicker bundles of collagen fibers than in the control that presumably caused by an increased activity of myofibroblasts [54].

Studies of the Anti-inflammatory Effect of SkQ1 *in vivo*

Aging is characterized by an elevated level of systemic inflammation. In experiments with old mice, long-term application of SkQ1 has been shown to reduce inflammatory vascular endothelial activation, as measured by the expression level of the adhesion molecules [55]. In the model of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) caused by intravenous administration of lethal or sublethal doses of tumor

точной активации клеток эндотелия, по-видимому, является основным механизмом снижения нейтрофильной инфильтрации ран.

Действие SkQ1 было исследовано также в моделях острого асептического воспаления [54]. В первой модели воспаление индуцировали путем введения под кожу в межлопаточной области покровных стёкол. У мышей, которые получали SkQ1 в дозе 250 нмоль на 1 кг массы тела ежедневно с питьевой водой в течение 3 недель до операции, количество нейтрофилов в очаге воспаления, измеренное через 12 ч после операции, снижалось в 2 раза. Одновременно под действием SkQ1 существенно повышалось относительное содержание макрофагов, что указывало на ускоренный переход к макрофагальной стадии воспалительной реакции. Через 2 сут нейтрофилы практически исчезали из очага воспаления, как у мышей, которые получали SkQ1, так и в контрольной группе. На более поздних сроках (5–14 сут) наблюдалось накопление фибробластов в очаге воспаления, причем SkQ1 существенно ускорял этот процесс.

Во второй модели в межлопаточной области мышей формировали подкожные воздушные мешки и через 7 сут индуцировали в них острое воспаление инъекцией 1% раствора каррагинана. Эта модель является одной из общепринятых для доклинического исследования эффективности фармацевтических противовоспалительных препаратов [57] и позволяет исследовать как клеточные, так и экссудативные реакции в очаге подкожного воспаления. У мышей, получавших SkQ1 по той же схеме, что и в предыдущей модели, содержание клеток воспаления в экссудате, полученном через 4 часа после введения каррагинана, было снижено почти в 2 раза по сравнению с контролем [58]. Около 90% клеток в экссудате составляли нейтрофилы. Содержание основных про-воспалительных цитокинов TNF и IL-6 под действием SkQ1 снижалось, но этот эффект был небольшим. Более выраженные эффекты SkQ1 наблюдались в той же модели, но при внутрибрюшинном введении препарата (250 нмоль/кг массы тела) ежедневно в течение 7 сут до индукции воспаления [58]. Таким образом, SkQ1 вызывал снижение интенсивности привлечения нейтрофилов в очаг воспаления и, в меньшей степени, снижал продукцию провоспалительных цитокинов.

В модели воздушного мешка было исследовано содержание клеток воспаления в выстилающих тканях. Было показано, что численность нейтрофилов в верхней внутренней выстилке «воздушного мешка» у мышей, получавших SkQ1, была снижена в 1,5 раза по сравнению с контролем. В то же время относительное содержание моноцитов/макрофагов в выстилке у мышей, получавших SkQ1 было достоверно выше, чем в контрольной. Эти данные свидетельствуют о том, что SkQ1 способствует более быстрому переключению к макрофагальной стадии воспалительной реакции [58].

necrosis factor (TNF) SkQ1 also reduced inflammatory endothelial activation [56]. The intraperitoneal administration of SkQ1 not only reduced the expression of the adhesion molecules in the vascular endothelium, but also prevented the death of mice in this model. Suppression of excessive activation of endothelial cells appears to be the main mechanism for reducing neutrophil infiltration of wounds.

The effect of SkQ1 was also investigated in models of acute aseptic inflammation [54]. In the first model, inflammation was induced by inserting under the skin in the interscapular region of the cover glasses. In mice that received SkQ1 at a dose of 250 nmol per 1 kg of body mass daily with drinking water for 3 weeks prior to surgery, the amount of neutrophils in the inflamed area, measured 12 hours after surgery, was reduced by a factor of 2. Simultaneously, in SkQ1 treated animals, the relative content of macrophages significantly increased, which indicated an accelerated transition to the macrophage stage of the inflammation. After 2 days neutrophils practically disappeared from the inflamed area, both in mice that received SkQ1 and in the control group. At later periods (5-14 days), the accumulation of fibroblasts in the inflamed area was observed, and SkQ1 significantly accelerated this process.

In the second model, subcutaneous air sacs were formed in the interscapular region of mice and after 7 days acute inflammation was induced in the sacs by injection of a 1% solution of carrageenan. This model is one of the generally accepted for preclinical studies of the effectiveness of anti-inflammatory drugs [57] and allows to study both cellular and exudative reactions in the subcutaneous inflamed area. In mice that received SkQ1 in the same way as in the previous model, the content of inflammatory cells in the exudate obtained 4 hours after the administration of carrageenan was reduced almost 2-fold compared to the control [58]. About 90% of the cells in the exudate were neutrophils. SkQ1 induced decrease in the content of the main pro-inflammatory cytokines TNF and IL-6, but this effect was not large. More significant effects of SkQ1 were observed in the same model using intraperitoneal administration of the drug (250 nmol / kg body mass) daily for 7 days before induction of inflammation [58]. Thus, SkQ1 caused a decrease in the intensity of neutrophil infiltration into the inflamed area and, to a lesser extent, reduced the production of pro-inflammatory cytokines.

In the air sac model, the content of inflammatory cells in the lining tissues was examined. It was shown that the number of neutrophils in the upper inner lining of the air sac in mice receiving SkQ1 was reduced by 1.5 times in comparison with the control. At the same time, the relative monocyte / macrophage content in the lining in mice treated with SkQ1 was significantly higher than in the control. These data suggest that SkQ1 promotes faster transition to the macrophage stage of the inflammatory response [58].

В той же модели было исследовано влияние SkQ1 на содержание и активацию тучных клеток в очаге воспаления. В модели воздушного мешка было показано, что общая численность ТК и в особенности содержание дегранулирующих ТК в верхней внутренней выстилке была снижена у мышей получавших SkQ1 с питьевой водой [57, 58]. Как и в случае нейтрофилов, более выраженное влияние SkQ1 на содержание и степень активации ТК наблюдались в той же модели, но при внутрибрюшинном введении препарата [59]. Исследования *in vitro* (см ниже) подтвердили подавление дегрануляции ТК под действием SkQ1. Эти наблюдения позволяют предполагать, что SkQ1 эффективно понижает активацию ТК в ранах, что предотвращает гистамин-зависимое повышение проницаемости сосудов и отечность.

Механизмы стимуляции регенеративных процессов под действием SkQ1

К настоящему времени установлено, что SkQ1 оказывает влияние как на воспалительную фазу ранозаживления, так и на пролиферативную стадию. Мишенями SkQ1 являются клетки разных типов, ответственные за ранозаживление. Ниже представлены основные результаты исследования механизмов действия SkQ1 на заживление ран *in vitro* (рис. 4).

Для исследования механизмов действия SkQ1 на воспалительную активацию эндотелия были использованы культуры клеток эндотелия, активированные TNF, основным провоспалительным цитокином. Было установлено, что:

- 1) SkQ1 подавляет TNF-зависимую экспрессию молекул адгезии и их экспозицию на поверхности клеток. Как следствие, под действием SkQ1 снижается адгезия нейтрофилов к монослою клеток эндотелия [55, 56].
- 2) SkQ1 подавляет TNF-зависимую экспрессию провоспалительных цитокинов [55, 56].
- 3) SkQ1 предотвращает TNF-зависимое нарушение цитоскелета и разборку межклеточных контактов, что ведет к нарушению изолирующих свойств эндотелия [56].
- 4) Противовоспалительное действие SkQ1 определяется подавлением активности транскрипционного фактора NFκB, который контролирует экспрессию молекул адгезии и MMP-9, расщепляющий основной белок межклеточных контактов VE-кадгерин [56].
- 5) SkQ1 защищает клетки эндотелия от апоптотической гибели, вызванной высокими дозами TNF [60].

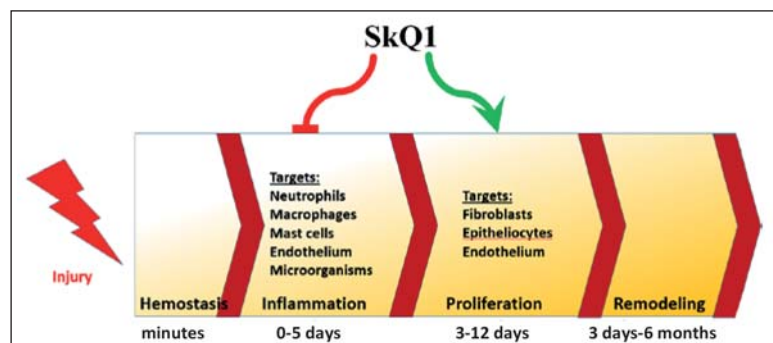


Рис. 4. Основные мишени действия SkQ1 на процесс ранозаживления.

Fig. 4. The main targets of SkQ1 action in wound healing.

Note. SkQ1 accelerates resolution of inflammation and promotes proliferative phase. Explanations are given in the text.

Примечание. SkQ1 способствует разрешению воспаления и прохождению пролиферативной фазы. Пояснения приведены в тексте. Injury – повреждение; Hemostasis – гемостаз; Inflammation – воспаление; Proliferation – пролиферация; Remodeling – ремоделинг; Targets – мишени; Neutrophils – нейтрофилы; Macrophages – макрофаги; Mast cells – тучные клетки; Endothelium – эндотелий; Microorganisms – микроорганизмы; Fibroblasts – фибробласты; Epitheliocytes – эпителиальные клетки; Endothelium – эндотелий; days, months – сутки, месяцы.

In the same air sac model, the effect of SkQ1 on the mast cells (MC) in the inflamed area was investigated. It was shown that the total number of MCs, and particularly the content of degranulated TCs in the upper inner lining tissues, was reduced in mice that received SkQ1 with drinking water [58]. As in the case of neutrophils, more significant effects of SkQ1 on the content and degree of activation of MC were observed when intraperitoneal administration of the drug was employed [59]. *In vitro* studies (see below) confirmed the suppression of MC degranulation by SkQ1. These observations suggest that SkQ1 can effectively reduce MC activation in wounds, which prevents histamine-dependent vascular permeability and tissue swelling.

Mechanisms of Regenerative Processes Stimulation Induced by SkQ1

To date, it has been established that SkQ1 accelerates both the inflammatory phase of wound healing and the proliferative phase. SkQ1 targets the different cell types responsible for wound healing. Below the main mechanisms of SkQ1 action on wound healing using the *in vitro* studies data is proposed (Fig. 4).

To study the mechanisms of SkQ1 action on inflammatory activation of the endothelium, endothelial cell cultures were activated by the major pro-inflammatory cytokine, TNF. It has been found that:

- 1) SkQ1 suppresses TNF-dependent expression of the adhesion molecules and their exposure at the cell surface. As a consequence, the adhesion of neutrophils to the monolayer of endothelial cells decreases under SkQ1 action [55, 56].
- 2) SkQ1 suppresses TNF-dependent expression of pro-inflammatory cytokines [55, 56].

Описанное выше противовоспалительное действие SkQ1 на эндотелий во многом объясняет снижение инфильтрации нейтрофилов в раны. Однако ускоренный переход к макрофагальной стадии воспалительной реакции наблюдавшийся под действием SkQ1 *in vivo* указывает на возможное участие митоАФК в регуляции активности нейтрофилов и других иммунных клеток. На иммунных клетках человека *ex vivo* было установлено, что:

1) SkQ1 стимулирует как спонтанный апоптоз нейтрофилов, так и, в особенности, апоптоз, частично подавленный под действием патоген-ассоциированных сигнальных молекул (PAMP) [56] или сигнальных молекул, связанных с повреждением (DAMP) [55].

2) SkQ1 подавляет активацию НАДФН оксидазы и связанный с этим окислительный взрыв при активации нейтрофилов компонентами, имитирующими бактериальные патогены [56].

3) SkQ1 ингибирует экзоцитоз (дегрануляцию) внутриклеточных везикул при активации нейтрофилов [56]. Сходное подавление дегрануляции под действием SkQ1 наблюдалось в тучных клетках [61].

4) Структурно сходный с SkQ1 митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ ингибировал продукцию провоспалительных цитокинов и повышению продукции противовоспалительных цитокинов (сдвиг к фенотипу M2) в макрофагах [41].

Подавление активности нейтрофилов под действием SkQ1 может препятствовать их бактерицидному действию. В тоже время установлено, что высокие концентрации SkQ1 обладают анти-септическим действием против широкого круга Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий [62]. Таким образом, SkQ1 при локальном применении может способствовать уничтожению патогенных микроорганизмов в ране, компенсируя недостаток нейтрофилов.

Исследования механизмов действия SkQ1 на прохождение пролиферативной фазы ранозаживления показали, что:

1) В культуре подкожных фибробластов человека SkQ1 вызывает дифференцировку части популяции (около 30%) фибробластов в миофибробласты [63]. Этот эффект был связан с активацией TGF β 1, основного цитокина, регулирующего дифференцировку фибробластов. Вместе с тем SkQ1 подавляет накопление миофибробластов, вызванное избытком TGF β 1, ингибируя TGF β 1-зависимые сигнальные пути [63]. Эти данные соответствуют отсутствию гипертрофированных рубцов и иных признаков фиброза у животных получавших SkQ1;

2) SkQ1 стимулирует подвижность фибробластов в модели «раны» *in vitro* при гипергликемии [51];

3) SkQ1 стимулирует ангиогенез *in vitro* благодаря активации в фибробластах TGF β 1 и стиму-

3) SkQ1 prevents TNF-dependent disruption of the cytoskeleton and disassembly of the intercellular contacts, which leads to permeabilization of the endothelium [56].

4) The anti-inflammatory effects of SkQ1 are related to inhibition of the pro-inflammatory transcription factor NF κ B, which controls the expression of the adhesion molecules and matrix metalloprotease MMP-9. The latter cleaves VE-cadherin, the main protein of the intercellular contacts [56].

5) SkQ1 protects endothelial cells from apoptotic death caused by high doses of TNF [60].

The anti-inflammatory effects of SkQ1 on the endothelium largely explain the reduction of neutrophil infiltration into the wounds. However, the *in vivo* SkQ1-induced accelerated transition of inflammation reaction toward the macrophage stage demonstrates the possible involvement of mitochondrial ROS in regulation of the activity of neutrophils and other immune cells. Experiments using human immune cells *ex vivo* have found that:

1) SkQ1 stimulates both spontaneous apoptosis of neutrophils and, in particular, apoptosis, partially suppressed by PAMP [56] or DAMP [55].

2) SkQ1 suppresses the activation of NADPH oxidase and the associated oxidative burst when neutrophils are activated by compounds that mimic bacterial pathogens [56].

3) SkQ1 inhibits the exocytosis (degranulation) of intracellular vesicles upon activation of neutrophils [56]. A similar suppression of the degranulation by SkQ1 was observed in mast cells [61].

4) MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant structurally similar to SkQ1, inhibited production of pro-inflammatory cytokines and increased production of anti-inflammatory cytokines (shift to M2-phenotype) in macrophages [41].

Suppression of neutrophils activity by SkQ1 can prevent their bactericidal effect. It was found that high concentrations of SkQ1 have an antiseptic effect against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria [62]. Thus, local application of SkQ1 contributes to the destruction of pathogenic microorganisms in the wound, compensating the deficit of neutrophils.

Evaluation of mechanisms of SkQ1 action in the proliferative phase of wound healing demonstrated that:

1) In the culture of human subcutaneous fibroblasts, SkQ1 causes differentiation of a part (approx. 30%) of fibroblasts toward myofibroblasts [63]. This effect was associated with the activation of TGF β 1, the main cytokine regulating the differentiation of fibroblasts. At the same time, SkQ1 suppresses the accumulation of myofibroblasts caused by an excess of TGF β 1, inhibiting TGF β 1-dependent signaling pathways [63]. These data correspond to the absence of hypertrophic scars and other signs of fibrosis in animals receiving SkQ1.

ляции синтеза других факторов роста, приводящих к ускорению роста сосудов [52].

4) SkQ1 способствует ускорению эпителизации в модели «раны» в монослое клеток иммортализованной линии эпителия крысы, ускоряя миграцию этих клеток к краям «раны» [54].

Заключение

Митохондрии играют определяющую роль в формировании окислительного стресса, который является ключевым фактором патогенеза труднозаживающих и хронических ран. Высокоэффективный митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 стимулирует заживление кожных ран, действуя на воспалительную и пролиферативную фазы ранозаживления в различных экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro*. Имеются основания полагать, что препараты для локальной терапии труднозаживающих ран на основе SkQ1 послужат эффективным средством борьбы с длительно незаживающими ранами у разных категорий пациентов, в том числе — при сахарном диабете, а также у пациентов с хроническими критическими состояниями и рецидивирующими инфекциями.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, проект № 14-50-00029 (разделы обзора с опытами на животных) а также при поддержке проекта РФФИ № 16-04-01074_а (разделы обзора с опытами *in vitro*). Отдельная благодарность А. Приходько за критическое прочтение текста и помощь в работе с рисунками.

Литература

1. Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341 (10): 738–746. DOI: 10.1056/NEJM199909023411006. PMID: 10471461
2. Reinke J.M., Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* 2012; 49 (1): 35–43. DOI: 10.1159/000339613. PMID: 22797712
3. Diegelmann R.F., Evans M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 2004; 9: 283–289. DOI: 10.2741/1184. PMID: 14766366
4. Dunnill C., Patton T., Brennan J., Barrett J., Dryden M., Cooke J., Leaper D., Georgopoulos N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound J.* 2017; 14 (1): 89–96. DOI: 10.1111/iwj.12557. PMID: 26688157
5. Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997; 276 (5309): 75–81. DOI: 10.1126/science.276.5309.75. PMID: 9082989
6. Darby I.A., Laverdet B., Bonté F., Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2014; 7: 301–311. DOI: 10.2147/CCID.S50046. PMID: 25395868
7. Tonnesen M.G., Feng X., Clark R.A. Angiogenesis in wound healing. *J. Invest. Dermat. Symp. Proc.* 2000; 5 (1): 40–46. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x. PMID: 11147674
8. Lazarus G.S., Cooper D.M., Knighton D.R., Margolis D.J., Pecoraro R.E., Rodeheaver G., Robson M.C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch. Dermatol.* 1994; 130 (4): 489–493. DOI: 10.1001/archderm.130.4.489. PMID: 8166487
9. Swift M.E., Kleinman H.K., DiPietro L.A. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab. Invest.* 1999; 79 (12): 1479–1487. PMID: 10616199
10. Snyder R.J. Treatment of nonhealing ulcers with allografts. *Clin. Dermatol.* 2005; 23 (4): 388–395. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2004.07.020. PMID: 16023934
11. La Fontaine J., Harkless L.B., Davis C.E., Allen M.A., Shireman P.K. Current concepts in diabetic microvascular dysfunction. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 2006; 96 (3): 245–252. DOI: 10.7547/0960245. PMID: 16707637

2) SkQ1 stimulates the mobility of fibroblasts in the «wound» model *in vitro* under hyperglycemia [53].

3) SkQ1 stimulates angiogenesis *in vitro* due to activation of TGF β 1 in fibroblasts and stimulation of synthesis of other growth factors accelerated vascular growth [52].

4) SkQ1 promotes epithelization in the «wound» model in the monolayer of immortalized rat epithelial cells, accelerating the migration of these cells to the edges of the «wound» [54].

Conclusion

Mitochondria play a critical role in the formation of oxidative stress, which is a key factor in the pathogenesis of wounds with impaired healing and chronic wounds. Highly effective mitochondrial antioxidant SkQ1 stimulates the healing of cutaneous wounds by accelerating both the inflammatory and the proliferative phases of wound healing in various models *in vivo* and *in vitro*. Reviewed data suggest that SkQ1-based topical drugs for the local wound healing possess high potential to become effective treatment for wounds with impaired healing in patients suffering from diabetes, chronic critical illness and recurring infections.

Acknowledgements. The work was supported by the Russian Science Foundation, project No. 14-50-00029 (sections on *in vivo* experiments) and also by the RFBR project No. 16-04-01074_a (sections on *in vitro* experiments). Special thanks to A. Prikhodko for critical reading of the text and help with figures.

References

1. Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341 (10): 738–746. DOI: 10.1056/NEJM199909023411006. PMID: 10471461
2. Reinke J.M., Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* 2012; 49 (1): 35–43. DOI: 10.1159/000339613. PMID: 22797712
3. Diegelmann R.F., Evans M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 2004; 9: 283–289. DOI: 10.2741/1184. PMID: 14766366
4. Dunnill C., Patton T., Brennan J., Barrett J., Dryden M., Cooke J., Leaper D., Georgopoulos N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound J.* 2017; 14 (1): 89–96. DOI: 10.1111/iwj.12557. PMID: 26688157
5. Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997; 276 (5309): 75–81. DOI: 10.1126/science.276.5309.75. PMID: 9082989
6. Darby I.A., Laverdet B., Bonté F., Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2014; 7: 301–311. DOI: 10.2147/CCID.S50046. PMID: 25395868
7. Tonnesen M.G., Feng X., Clark R.A. Angiogenesis in wound healing. *J. Invest. Dermat. Symp. Proc.* 2000; 5 (1): 40–46. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x. PMID: 11147674
8. Lazarus G.S., Cooper D.M., Knighton D.R., Margolis D.J., Pecoraro R.E., Rodeheaver G., Robson M.C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch. Dermatol.* 1994; 130 (4): 489–493. DOI: 10.1001/archderm.130.4.489. PMID: 8166487
9. Swift M.E., Kleinman H.K., DiPietro L.A. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab. Invest.* 1999; 79 (12): 1479–1487. PMID: 10616199
10. Snyder R.J. Treatment of nonhealing ulcers with allografts. *Clin. Dermatol.* 2005; 23 (4): 388–395. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2004.07.020. PMID: 16023934
11. La Fontaine J., Harkless L.B., Davis C.E., Allen M.A., Shireman P.K. Current concepts in diabetic microvascular dysfunction. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 2006; 96 (3): 245–252. DOI: 10.7547/0960245. PMID: 16707637

12. Gosain A., DiPietro L.A. Aging and wound healing. *World J. Surg.* 2004; 28 (3): 321–326. DOI: 10.1007/s00268-003-7397-6. PMID: 14961191
13. Rodriguez P.G., Felix F.N., Woodley D.T., Shim E.K. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic Surg.* 2008; 34 (9): 1159–1169. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2008.34254.x. PMID: 18513296
14. Roy S., Khanna S., Sen C.K. Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 44 (2): 180–192. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.025. PMID: 18191754
15. Bickers D.R., Lim H.W., Margolis D., Weinstock M.A., Goodman C., Faulkner E., Gould C., Gemmen E., Dall T., American Academy of Dermatology Association; Society for Investigative Dermatology. The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2006; 55 (3): 490–500. DOI: 10.1016/j.jaad.2006.05.048. PMID: 16908356
16. Mustoe T.A., O'Shaughnessy K., Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006; 117 (7 Suppl): 35S–41S. DOI: 10.1097/01.prs.0000225431.63010.1b. PMID: 16799373
17. Roy S., Khanna S., Nallu K., Hunt T.K., Sen C.K. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol. Ther.* 2006; 13 (1): 211–220. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.07.684. PMID: 16126008
18. Ojha N., Roy S., He G., Biswas S., Velayutham M., Khanna S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Sen C.K. Assessment of wound-site redox environment and the significance of Rac2 in cutaneous healing. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 44 (4): 682–691. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.056. PMID: 18068132
19. Sen C.K., Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1780 (11): 1348–1361. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.01.006. PMID: 18249195
20. Sen C.K., Khanna S., Babior B.M., Hunt T.K., Ellison E.C., Roy S. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (36): 33284–33290. DOI: 10.1074/jbc.M203391200. PMID: 12068011
21. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J. Wound Care.* 2008; 17 (9): 399–402. DOI: 10.12968/jowc.2008.17.9.30937. PMID: 18833899
22. Tandara A.A., Mustoe T.A. Oxygen in wound healing—more than a nutrient. *World J. Surg.* 2004; 28 (3): 294–300. DOI: 10.1007/s00268-003-7400-2. PMID: 14961188
23. Toledo-Pereyra L.H., Lopez-Nebolina F., Toledo A.H. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann. Transplant.* 2004; 9 (1): 81–83. PMID: 15478900
24. Willam C., Schindler R., Frei U., Eckardt K.U. Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1999; 276 (6 Pt 2): H2044–H2052. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.276.6.H2044. PMID: 10362686
25. Herrick S.E., Sloan P., McGurk M., Freak L., McCollum C.N., Ferguson M.W. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am. J. Pathol.* 1992; 141 (5): 1085–1095. PMID: 1279979
26. Oskertizian C.A. Mast cells and wound healing. *Adv. Wound Care.* 2012; 1 (1): 23–28. DOI: 10.1089/wound.2011.0357. PMID: 24527274
27. Nakamura A., Osonoi T., Terauchi Y. Relationship between urinary sodium excretion and pioglitazone-induced edema. *J. Diabetes Investig.* 2010; 1 (5): 208–211. DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00046.x. PMID: 24843434
28. Wulff B.C., Wilgus T.A. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp. Dermatol.* 2013; 22 (8): 507–510. DOI: 10.1111/exd.12169. PMID: 23802591
29. Neyens J.C., Cereda E., Meijer E.P., Lindholm C., Schols J.M. Arginine-enriched oral nutritional supplementation in the treatment of pressure ulcers: a literature review. *Wound Med.* 2017; 16: 46–51. DOI: 10.1016/j.wndm.2016.07.002
30. Blass S.C., Goost H., Tolba R.H., Stoffel-Wagner B., Kabir K., Burger C., Stehle P., Ellinger S. Time to wound closure in trauma patients with disorders in wound healing is shortened by supplements containing antioxidant micronutrients and glutamine: a PRCT. *Clin. Nutr.* 2012; 31 (4): 469–475. DOI: 10.1016/j.clnu.2012.01.002. PMID: 22284340
31. Гусейнов А.З., Молчанов Д.А., Чиглашвили Д.С., Кудрявцева О.В. Антиоксиданты и иммуномодуляторы в комплексном лечении венозных трофических язв. *Вестн. новых мед. технологий.* 2009; 16 (4): 106–107. [In Russ.]
32. Савельев В.С. (ред.). Лечение трофических язв венозной этиологии. Пособие для врачей. М.; 2000: 22. [In Russ.]
33. Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Селецкая В.В., Зеленская А.В., Хананашвили Я.А., Нефедов Д.А., Галенко-Ярошевский П.А. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине. *Журн. фундам. медицины и биологии.* 2016; 3: 4–15. [In Russ.]
34. Ловат М.Л., Аврущенко М.С., Аверина О.А., Павшинцев В.В., Острова И.В., Заржецкий Ю.В., Мороз В.В., Егоров М.В. Действие антиоксиданта SKQ1 на структурно-функциональное состояние мозга в
12. Gosain A., DiPietro L.A. Aging and wound healing. *World J. Surg.* 2004; 28 (3): 321–326. DOI: 10.1007/s00268-003-7397-6. PMID: 14961191
13. Rodriguez P.G., Felix F.N., Woodley D.T., Shim E.K. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic Surg.* 2008; 34 (9): 1159–1169. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2008.34254.x. PMID: 18513296
14. Roy S., Khanna S., Sen C.K. Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 44 (2): 180–192. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.025. PMID: 18191754
15. Bickers D.R., Lim H.W., Margolis D., Weinstock M.A., Goodman C., Faulkner E., Gould C., Gemmen E., Dall T., American Academy of Dermatology Association; Society for Investigative Dermatology. The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2006; 55 (3): 490–500. DOI: 10.1016/j.jaad.2006.05.048. PMID: 16908356
16. Mustoe T.A., O'Shaughnessy K., Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006; 117 (7 Suppl): 35S–41S. DOI: 10.1097/01.prs.0000225431.63010.1b. PMID: 16799373
17. Roy S., Khanna S., Nallu K., Hunt T.K., Sen C.K. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol. Ther.* 2006; 13 (1): 211–220. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.07.684. PMID: 16126008
18. Ojha N., Roy S., He G., Biswas S., Velayutham M., Khanna S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Sen C.K. Assessment of wound-site redox environment and the significance of Rac2 in cutaneous healing. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 44 (4): 682–691. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.056. PMID: 18068132
19. Sen C.K., Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1780 (11): 1348–1361. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.01.006. PMID: 18249195
20. Sen C.K., Khanna S., Babior B.M., Hunt T.K., Ellison E.C., Roy S. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (36): 33284–33290. DOI: 10.1074/jbc.M203391200. PMID: 12068011
21. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J. Wound Care.* 2008; 17 (9): 399–402. DOI: 10.12968/jowc.2008.17.9.30937. PMID: 18833899
22. Tandara A.A., Mustoe T.A. Oxygen in wound healing—more than a nutrient. *World J. Surg.* 2004; 28 (3): 294–300. DOI: 10.1007/s00268-003-7400-2. PMID: 14961188
23. Toledo-Pereyra L.H., Lopez-Nebolina F., Toledo A.H. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann. Transplant.* 2004; 9 (1): 81–83. PMID: 15478900
24. Willam C., Schindler R., Frei U., Eckardt K.U. Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1999; 276 (6 Pt 2): H2044–H2052. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.276.6.H2044. PMID: 10362686
25. Herrick S.E., Sloan P., McGurk M., Freak L., McCollum C.N., Ferguson M.W. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am. J. Pathol.* 1992; 141 (5): 1085–1095. PMID: 1279979
26. Oskertizian C.A. Mast cells and wound healing. *Adv. Wound Care.* 2012; 1 (1): 23–28. DOI: 10.1089/wound.2011.0357. PMID: 24527274
27. Nakamura A., Osonoi T., Terauchi Y. Relationship between urinary sodium excretion and pioglitazone-induced edema. *J. Diabetes Investig.* 2010; 1 (5): 208–211. DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00046.x. PMID: 24843434
28. Wulff B.C., Wilgus T.A. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp. Dermatol.* 2013; 22 (8): 507–510. DOI: 10.1111/exd.12169. PMID: 23802591
29. Neyens J.C., Cereda E., Meijer E.P., Lindholm C., Schols J.M. Arginine-enriched oral nutritional supplementation in the treatment of pressure ulcers: a literature review. *Wound Med.* 2017; 16: 46–51. DOI: 10.1016/j.wndm.2016.07.002
30. Blass S.C., Goost H., Tolba R.H., Stoffel-Wagner B., Kabir K., Burger C., Stehle P., Ellinger S. Time to wound closure in trauma patients with disorders in wound healing is shortened by supplements containing antioxidant micronutrients and glutamine: a PRCT. *Clin. Nutr.* 2012; 31 (4): 469–475. DOI: 10.1016/j.clnu.2012.01.002. PMID: 22284340
31. Guseinov A.Z., Molchanov D.A., Chiglaashvili D.S., Kudryavtseva O.V. Antioxidants and immunomodulators in complex treatment of venous trophic cankers. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii.* 2009; 16 (4): 106–107. [In Russ.]
32. Savelyev V.S. (ed.). Treatment of trophic ulcers of venous etiology. Manual for doctors. Moscow; 2000: 22. [In Russ.]
33. Shakhmardanov S.A., Gulevskaya O.N., Seletskaya V.V., Zelenskaya A.V., Khananashvili Ya.A., Nefedov D.A., Galenko-Yaroshevsky P.A. Antioxidants: classification, pharmacological properties the use in the practice of medicine. *Zhurnal Fundamentalnoi Meditsiny i Biologii.* 2016; 3: 4–15. [In Russ.]
34. Lovat M.L., Avrushchenko M.S., Aeverina O.A., Pavshintsev V.V., Ostrova I.V., Zarzhetsky Y.V., Moroz V.V., Egorov M.V. Effect of SkQ1 antioxidant on structural and functional conditions of the brain in postresuscitation

- постреанимационном периоде. *Общая реаниматология*. 2016; 12 (2): 6–19. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-2-6-19
35. Лутевич О.Э., Тамразова О.Б., Толстых П.И., Дербенев В.А., Медушева Е.О., Авагян А.А., Сорокатый А.А. Современные биологически активные раневые покрытия и окклюзионные повязки в комплексном лечении больных с трофическими язвами нижних конечностей венозного генеза. *Хирург*. 2011; 1: 13–18.
 36. Babior B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 2000; 109 (1): 33–44. DOI: 10.1016/S0002-9343(00)00481-2. PMID: 10936476
 37. Babior B.M. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*. 2001; 50 (4): 267–269. DOI: 10.1080/713803730. PMID: 11327320
 38. Chernyak B.V., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Antonenko Y.N., Sakharov D.V., Wirtz K.W.A., Skulachev V.P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006; 1757 (5–6): 525–534. DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.02.019. PMID: 16678116
 39. Zhou R., Yazdi A.S., Menu P., Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011; 469 (7329): 221–225. DOI: 10.1038/nature09663. PMID: 21124315
 40. Dashdorj A., Jyothi K.R., Lim S., Jo A., Nguyen M.N., Ha J., Yoon K.S., Kim H.J., Park J.H., Murphy M.P., Kim S.S. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. *BMC Med.* 2013; 11: 178. DOI: 10.1186/1741-7015-11-178. PMID: 23915129
 41. Madamanchi N.R., Runge M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ. Res.* 2007; 100 (4): 460–473. DOI: 10.1161/01.RES.0000258450.44413.96. PMID: 17332437
 42. Dikalov S.I., Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013; 305 (10): H1417–H1427. DOI: 10.1152/ajpheart.00089.2013. PMID: 24043248
 43. Tompkins A.J., Burwell L.S., Digerness S.B., Zaragoza C., Holman W.L., Brookes P.S. Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia–reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006; 1762 (2): 223–231. DOI: 10.1016/j.bbadis.2005.10.001. PMID: 16278076
 44. Skulachev M.V., Antonenko Y.N., Anisimov V.N., Chernyak B.V., Cherepanov D.A., Chistyakov V.A., Egorov M.V., Kolosova N.G., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Plotnikov E.Y., Roginsky V.A., Savchenko A.Y., Severina I.I., Severin F.F., Shkurat T.P., Tashlitsky V.N., Shidlovsky K.M., Vyssokikh M.Y., Zamyatin A.A.Jr., Zorov D.B., Skulachev V.P. Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies. *Curr. Drug Targets*. 2011; 12 (6): 800–826. DOI: 10.2174/138945011795528859. PMID: 21269268
 45. Feniouk B.A., Skulachev V.P. Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants. *Curr. Aging Sci.* 2017; 10 (1): 41–48. DOI: 10.2174/1874609809666160921113706. PMID: 27659264
 46. Bast A., Haenen G.R. The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2002; 11 (3–4): 251–258. DOI: 10.1016/S1382-6689(01)00118-1. PMID: 21782609
 47. Gonzalez F., Gottlieb E. Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis*. 2007; 12 (5): 877–885. DOI: 10.1007/s10495-007-0718-8. PMID: 17294083
 48. Яни Е.В., Катаргина Л.А., Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Савченко А.Ю., Выгодин В.А., Гудкова Е.Ю., Замыатин-мл. А.А., Скулачев М.В. Первый опыт использования препарата «Визомитин» в терапии «сухого глаза». *Практическая медицина*. 2012; 4-1 (59): 134–137.
 49. Brzheshkiy V.V., Efimova E.L., Vorontsova T.N., Alekseev V.N., Gusarevich O.G., Shaidurova K.N., Ryabtseva A.A., Andryukhina O.M., Kamenskikh T.G., Sumarokova E.S., Miljudin E.S., Egorov E.A., Lebedev O.I., Surov A.V., Korol A.R., Nasimnyk I.O., Bezditko P.A., Muzhychuk O.P., Vygodin V.A., Yani E.V., Savchenko A.Y., Karger E.M., Fedorkin O.N., Mironov A.N., Ostapenko V., Popeko N.A., Skulachev V.P., Skulachev M.V. Results of a multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical study of the efficacy and safety of visomitin eye drops in patients with dry eye syndrome. *Adv. Ther.* 2015; 32 (12): 1263–1279. DOI: 10.1007/s12325-015-0273-6. PMID: 26660938
 50. Petrov A., Perekhvatova N., Skulachev M., Stein L., Ousler G. SkQ1 ophthalmic solution for dry eye treatment: results of a phase 2 safety and efficacy clinical study in the environment and during challenge in the controlled adverse environment model. *Adv. Ther.* 2016; 33 (1): 96–115. DOI: 10.1007/s12325-015-0274-5. PMID: 26733410
 51. Demyanenko I.A., Popova E.N., Zakharova V.V., Ilyinskaya O.P., Vasilieva T.V., Romashchenko V.P., Fedorov A.V., Mansikh V.N., Skulachev M.V., Zinovkin R.A., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice. *Aging (Albany, NY)*. 2015; 7 (7): 475–485. DOI: 10.18632/aging.100772. PMID: 26197706
 52. Demyanenko I., Zakharova V., Ilyinskaya O., Vasilieva T., Fedorov A., Mansikh V., Zinovkin R., Pletjushkina O., Chernyak B., Skulachev V., Popova E. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves dermal wound healing in genetically diabetic mice. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017; 2017: 6408278. DOI: 10.1155/2017/6408278. PMID: 28761623
 53. Демьяненко И.А., Васильева Т.В., Домнина Л.В., Дугина В.Б., Егоров М.В., Иванова О.Ю., Ильинская О.П., Плетюшкина О.Ю., Попова Е.Н., Сахаров И.Ю., Федоров А.В., Черняк Б.В. Новые митохондриально-направленные антиоксиданты на основе «ионов Скулачева» ускоряют заживление кожных ран у животных. *Биохимия*. 2010; 75 (3): 337–345. PMID: 20370605
 - period. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2016; 12 (2): 6–19. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-2-6-19. [In Russ., In Engl.]
 35. Lutsevich O.E., Tamrazova O.B., Tolstykh P.I., Derbenev V.A., Medusheva E.O., Avagyan A.A., Sorokatyi A.A. Modern biologically active wound coverings and occlusive dressing in complex treatment of patients with trophic ulcers of lower limbs of venous genesis. *Khirurg*. 2011; 1: 13–18. [In Russ.]
 36. Babior B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 2000; 109 (1): 33–44. DOI: 10.1016/S0002-9343(00)00481-2. PMID: 10936476
 37. Babior B.M. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*. 2001; 50 (4): 267–269. DOI: 10.1080/713803730. PMID: 11327320
 38. Chernyak B.V., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Antonenko Y.N., Sakharov D.V., Wirtz K.W.A., Skulachev V.P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006; 1757 (5–6): 525–534. DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.02.019. PMID: 16678116
 39. Zhou R., Yazdi A.S., Menu P., Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011; 469 (7329): 221–225. DOI: 10.1038/nature09663. PMID: 21124315
 40. Dashdorj A., Jyothi K.R., Lim S., Jo A., Nguyen M.N., Ha J., Yoon K.S., Kim H.J., Park J.H., Murphy M.P., Kim S.S. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. *BMC Med.* 2013; 11: 178. DOI: 10.1186/1741-7015-11-178. PMID: 23915129
 41. Madamanchi N.R., Runge M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ. Res.* 2007; 100 (4): 460–473. DOI: 10.1161/01.RES.0000258450.44413.96. PMID: 17332437
 42. Dikalov S.I., Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013; 305 (10): H1417–H1427. DOI: 10.1152/ajpheart.00089.2013. PMID: 24043248
 43. Tompkins A.J., Burwell L.S., Digerness S.B., Zaragoza C., Holman W.L., Brookes P.S. Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia–reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006; 1762 (2): 223–231. DOI: 10.1016/j.bbadis.2005.10.001. PMID: 16278076
 44. Skulachev M.V., Antonenko Y.N., Anisimov V.N., Chernyak B.V., Cherepanov D.A., Chistyakov V.A., Egorov M.V., Kolosova N.G., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Plotnikov E.Y., Roginsky V.A., Savchenko A.Y., Severina I.I., Severin F.F., Shkurat T.P., Tashlitsky V.N., Shidlovsky K.M., Vyssokikh M.Y., Zamyatin A.A.Jr., Zorov D.B., Skulachev V.P. Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies. *Curr. Drug Targets*. 2011; 12 (6): 800–826. DOI: 10.2174/138945011795528859. PMID: 21269268
 45. Feniouk B.A., Skulachev V.P. Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants. *Curr. Aging Sci.* 2017; 10 (1): 41–48. DOI: 10.2174/1874609809666160921113706. PMID: 27659264
 46. Bast A., Haenen G.R. The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2002; 11 (3–4): 251–258. DOI: 10.1016/S1382-6689(01)00118-1. PMID: 21782609
 47. Gonzalez F., Gottlieb E. Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis*. 2007; 12 (5): 877–885. DOI: 10.1007/s10495-007-0718-8. PMID: 17294083
 48. Yani E.V., Katargina L.A., Chesnokova N.B., Beznos O.V., Savchenko A.Yu., Vygodin V.A., Gudkova E.Yu., Zamyatin A.A.Jr., Skulachev M.V. The first experience of using the drug Vizomitin in the treatment of «dry eyes». *Prakticheskaya Meditsina*. 2012; 4-1 (59): 134–137. [In Russ.]
 49. Brzheshkiy V.V., Efimova E.L., Vorontsova T.N., Alekseev V.N., Gusarevich O.G., Shaidurova K.N., Ryabtseva A.A., Andryukhina O.M., Kamenskikh T.G., Sumarokova E.S., Miljudin E.S., Egorov E.A., Lebedev O.I., Surov A.V., Korol A.R., Nasimnyk I.O., Bezditko P.A., Muzhychuk O.P., Vygodin V.A., Yani E.V., Savchenko A.Y., Karger E.M., Fedorkin O.N., Mironov A.N., Ostapenko V., Popeko N.A., Skulachev V.P., Skulachev M.V. Results of a multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical study of the efficacy and safety of visomitin eye drops in patients with dry eye syndrome. *Adv. Ther.* 2015; 32 (12): 1263–1279. DOI: 10.1007/s12325-015-0273-6. PMID: 26660938
 50. Petrov A., Perekhvatova N., Skulachev M., Stein L., Ousler G. SkQ1 ophthalmic solution for dry eye treatment: results of a phase 2 safety and efficacy clinical study in the environment and during challenge in the controlled adverse environment model. *Adv. Ther.* 2016; 33 (1): 96–115. DOI: 10.1007/s12325-015-0274-5. PMID: 26733410
 51. Demyanenko I.A., Popova E.N., Zakharova V.V., Ilyinskaya O.P., Vasilieva T.V., Romashchenko V.P., Fedorov A.V., Mansikh V.N., Skulachev M.V., Zinovkin R.A., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice. *Aging (Albany, NY)*. 2015; 7 (7): 475–485. DOI: 10.18632/aging.100772. PMID: 26197706
 52. Demyanenko I., Zakharova V., Ilyinskaya O., Vasilieva T., Fedorov A., Mansikh V., Zinovkin R., Pletjushkina O., Chernyak B., Skulachev V., Popova E. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves dermal wound healing in genetically diabetic mice. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017; 2017: 6408278. DOI: 10.1155/2017/6408278. PMID: 28761623
 53. Demianenko I.A., Vasilieva T.V., Domnina L.V., Dugina V.B., Egorov M.V., Ivanova O.Y., Ilinskaya O.P., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Sakharov I.Y., Fedorov A.V., Chernyak B.V. Novel mitochondria-targeted antioxidants, «Skulachev-ion» derivatives, accelerate dermal wound healing in animals. *Biochemistry (Mosc.)*. 2010; 75 (3): 274–280. PMID: 20370605. [In Russ., In Engl.]

54. Zinovkin R.A., Romaschenko V.P., Galkin I.I., Zakharova V.V., Pletjushkina O. Y., Chernyak B.V., Popova E.N. Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium. *Aging (Albany, NY)*. 2014; 6 (8): 661–674. DOI: 10.18632/aging.100685. PMID: 25239871
55. Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Galkin I.I., Zinovkin R.A., Chernyak B.V., Krysko D.V., Bachert C., Krysko O., Skulachev V.P., Popova E.N. Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice. *Biochim. Biophys. Acta*. 2017; 1863 (4): 968–977. DOI: 10.1016/j.bbdis.2017.01.024. PMID: 28131916
56. Duarte D.B., Vasko M.R., Fehrenbacher J.C. Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2012; Chapter 5: Unit5.6. DOI: 10.1002/0471141755.ph0506s56. PMID: 22383000
57. Borthakur A., Bhattacharyya S., Anbazhagan A.N., Kumar A., Dudeja P.K., Tobacman J.K. Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NF B-BCL10 loop. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1822 (8): 1300–1307. DOI: 10.1016/j.bbdis.2012.05.001. PMID: 22579587
58. Челомбитко М.А., Попова Е.Н., Федоров А.В., Ильинская О.П. Влияние митохондриально-направленного антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромид на активацию тучных клеток перитонеальной экссудата мыши и базофилов крысиной лейкемии RBL-2H3. In: *Science: discoveries and progress*. Чехия: Mústek; Россия: МЦНИИ; 2016: 18–28.
59. Челомбитко М.А., Аверина О.А., Васильева Т.В., Плетюшкина О.Ю., Попова Е.Н., Федоров А.В., Черняк Б.В., Шишкина В.С., Ильинская О.П. Митохондриально-направленный антиоксидант SKQ1 (10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний бромид) ингибирует деградацию тучных клеток *in vivo* и *in vitro*. *Биохимия*. 2017; 82 (12): 1858–1871.
60. Галкин И.И., Плетюшкина О.Ю., Зинювкин Р.А., Захарова В.В., Бирюков И.С., Черняк Б.В., Попова Е.Н. Митохондриально-направленные антиоксиданты предотвращают апоптоз эндотелиальных клеток, вызванный фактором некроза опухоли. *Биохимия*. 2014; 79 (2): 169–177. DOI: 10.1134/S0006297914020059. PMID: 24794727
61. Челомбитко М.А., Федоров А.В., Ильинская О.П., Зинювкин Р.А., Черняк Б.В. Роль активных форм кислорода в деградации тучных клеток. *Биохимия*. 2017; 82 (1): 19–34. DOI: 10.1134/S000629791612018X. PMID: 28259134
62. Nazarov P.A., Osterman I.A., Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 1394. DOI: 10.1038/s41598-017-00802-8. PMID: 28469140
63. Popova E.N., Pletjushkina O.Y., Dugina V.B., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izjumov D.S., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Scavenging of reactive oxygen species in mitochondria induces myofibroblast differentiation. *Antioxid. Redox. Signal.* 2010; 13 (9): 1297–1307. DOI: 10.1089/ars.2009.2949. PMID: 20446771
54. Zinovkin R.A., Romaschenko V.P., Galkin I.I., Zakharova V.V., Pletjushkina O. Y., Chernyak B.V., Popova E.N. Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium. *Aging (Albany, NY)*. 2014; 6 (8): 661–674. DOI: 10.18632/aging.100685. PMID: 25239871
55. Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Galkin I.I., Zinovkin R.A., Chernyak B.V., Krysko D.V., Bachert C., Krysko O., Skulachev V.P., Popova E.N. Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice. *Biochim. Biophys. Acta*. 2017; 1863 (4): 968–977. DOI: 10.1016/j.bbdis.2017.01.024. PMID: 28131916
56. Duarte D.B., Vasko M.R., Fehrenbacher J.C. Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2012; Chapter 5: Unit5.6. DOI: 10.1002/0471141755.ph0506s56. PMID: 22383000
57. Borthakur A., Bhattacharyya S., Anbazhagan A.N., Kumar A., Dudeja P.K., Tobacman J.K. Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NF B-BCL10 loop. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1822 (8): 1300–1307. DOI: 10.1016/j.bbdis.2012.05.001. PMID: 22579587
58. Chelombitko M.A., Popova E.N., Fedorov A.V., Ilyinskaya O.P. Effect of mitochondrial antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium bromide on the activation of mast cells of peritoneal exudate of mice and basophils of rat leukemia RBL-2H3. In: *Science: discoveries and progress*. Czech Republic: Mústek; Russia: MTsNIP; 2016: 18–28. [In Russ.]
59. Chelombitko M.A., Awerina O.A., Vasilyeva T.V., Pletjushkina O.Yu., Popova E.N., Fedorov A.V., Chernyak B.V., Shishkina V.S., Ilyinskaya O.P. Mitochondria-targeted antioxidant SKQ1 (10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium bromide) inhibits mast cells degranulation *in vivo* and *in vitro*. *Biokhimiya*. 2017; 82 (12): 1858–1871. [In Russ.]
60. Galkin I.I., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Birjukov I.S., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF-induced endothelial cell damage. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014; 79 (2): 124–130. DOI: 10.1134/S0006297914020059. PMID: 24794727. [In Russ., In Engl.]
61. Chelombitko M.A., Fedorov A.V., Ilyinskaya O.P., Zinovkin R.A., Chernyak B.V. Role of reactive oxygen species in mast cell degranulation (review). *Biochemistry (Mosc.)*. 2016; 81 (12): 1564–1577. DOI: 10.1134/S000629791612018X. PMID: 28259134. [In Russ., In Engl.]
62. Nazarov P.A., Osterman I.A., Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 1394. DOI: 10.1038/s41598-017-00802-8. PMID: 28469140
63. Popova E.N., Pletjushkina O.Y., Dugina V.B., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izjumov D.S., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Scavenging of reactive oxygen species in mitochondria induces myofibroblast differentiation. *Antioxid. Redox. Signal.* 2010; 13 (9): 1297–1307. DOI: 10.1089/ars.2009.2949. PMID: 20446771

Поступила 22.01.18

Received 22.01.18

ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ

Научно-практический журнал «Общая реаниматология»,
входящий в перечень ВАК РФ, в Scopus и другие базы данных,
предназначен для врачей анестезиологов-реаниматологов и научных сотрудников.

Тематика журнала: патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика и патологическая анатомия критических, терминальных и постреанимационных состояний; оказание догоспитальной помощи при критических состояниях; обучение населения и медицинского персонала приемам оказания неотложной помощи при критических состояниях; оптимизация работы ОРИТ; юридические и этические вопросы в области анестезиологии-реаниматологии.

Аудитория: лечебные учреждения; высшие учебные заведения медицинского профиля; медицинские учреждения последиplomного образования, Федеральные и региональные органы управления здравоохранением, медицинские научно-исследовательские институты; медицинские библиотеки.

ПОДПИСКА

В любом почтовом отделении связи по каталогу «Книга-Сервис»

• индекс 46338 — для индивидуальных подписчиков

Памяти профессора Ю. А. Чурляева

In Memory of Professor Yury A. Churlyayev

25 декабря 2017 года на 70-м году жизни после продолжительной болезни не стало Чурляева Юрия Алексеевича, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой анестезиологии и реаниматологии Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО Российской медицинской академии непрерывного последипломного образования Минздрава России, Заслуженного врача РФ, лауреата премии Правительства РФ.

Юрий Алексеевич родился 15 декабря 1948 г., после окончания лечебного факультета Алтайского государственного медицинского института в 1972 г. работал врачом участковой больницы Краснощевского района Алтайского края. С 1976 г. его трудовой путь продолжался в городской клинической больнице № 29 г. Новокузнецка. С 1979 по 1981 гг. обучался в клинической ординатуре на кафедре анестезиологии и реаниматологии Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей (ГИДУВа), после окончания которой вновь начал трудиться в вышеуказанной больнице. Здесь он вырос от рядового врача анестезиолога-реаниматолога до заведующего отделением (1984 г.) крупной клинической больницы, кандидата медицинских наук (1987 г.), доктора медицинских наук (1997 г.). В 1998 г. Ю. А. Чурляев избран заведующим кафедрой анестезиологии и реаниматологии Новокузнецкого ГИДУВа, в 1999 г. утвержден в звании профессора. Прекрасный организатор, профессор Ю. А. Чурляев в этом же году прошел по конкурсу на должность директора и возглавил Филиал научно-исследовательского института общей реаниматологии Российской академии медицинских наук.

Юрий Алексеевич был известным высококвалифицированным грамотным анестезиологом-реаниматологом, педагогом и ученым Кузбасса. Основными направлениями научной деятельности Чурляева Ю. А. были исследования фундаментальных основ критических состояний шахтеров, патогенеза критических, терминальных и постреанимационных состояний у шахтеров. Большой вклад Ю. А. Чурляев внес в исследования и разработку организационных и анестезиолого-реаниматологических проблем, касающихся шахтной травмы. Стараниями Юрия Алексеевича филиал научно-исследовательского института общей реаниматологии был головным учреждением Кузбас-



са по вопросам анестезиологии-реаниматологии, из стен которого вышли многие видные руководители здравоохранения области и просто грамотные, и высокопрофессиональные врачи анестезиологи-реаниматологи.

Профессор Чурляев был не только врачом, педагогом и ученым, но и прекрасным организатором здравоохранения, он умел налаживать отличные деловые отношения, способствующие эффективному решению задач стоящих перед клиникой и службой анестезиологии-реаниматологии города Новокузнецка. По инициативе Юрия Алексеевича в структуре филиала НИИ общей реаниматологии имени В. А. Неговского были созданы отделение нейрореанимации, на базе Городской клинической больницы № 29 и клиника анестезиологии и реаниматологии. Позже были открыты отделения реанимации и интенсивной терапии на базе городской клинической больницы №1. Результаты научных исследований профессора Ю. А. Чурляева внедрены в практическое здравоохранение в лечебных учреждениях Кузбасса.

Профессор Чурляев Ю. А. имел большой опыт педагогической работы – под его руководством сотрудники кафедры анестезиологии и реаниматологии Новокузнецкого ГИДУВа вели большую педагогическую, научную, организационную работу по вопросам анестезиологии и реаниматологии. Им создана большая школа клинических анестезиологов-реаниматологов, изучающих механизмы развития критических состояний у шахтеров и разрабатывающих новые методы коррекции у них тяжелых нарушений гомеостаза с применением современных технологий. Под руководством и при консультации профессора Ю. А. Чурляева защищено 22 кандидатские и 5 докторских диссертаций. Его ученики возглавляют отделения анестезиологии-реаниматоло-

гии городских клинических больниц № 1, 2, 7, 29 города Новокузнецка, областной больницы г. Кемерово, в ФГБУ «Новокузнецкий научно-практический центр медико-социальной экспертизы и реабилитации инвалидов» Минтруда России, кафедры анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ю. А. Чурляев проводил большую научно-организационную и общественную работу: он был членом ученого совета НИИ общей реаниматологии имени В. А. Неговского, членом диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям «Анестезиология и реаниматология» и «Патологическая физиология» при НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, членом национального совета по реанимации, членом Европейского совета по реанимации. С 2005 года Юрий Алексеевич был членом редколлегии журнала «Общая реаниматология». Журнал входит в перечень ВАК России периодических научных и научно-технических изданий, рекомендованных для публикаций основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора или кандидата наук, индексируется в Scopus, РИНЦ, Index Copernicus International PLC.

Профессор Чурляев Юрий Алексеевич автор более 40 патентов на изобретения и порядка 400 научных работ, в том числе ряда учебников и монографий.

Профессор Ю. А. Чурляев многократно выступал с докладами и лекциями на конгрессах, съездах, конференциях, симпозиумах за рубежом и в нашей стране.

Труд Юрия Алексеевича Чурляева отмечен в 2001 г. наградой Губернатора Кемеровской области, А. Г. Тулеева – медалью «За особый вклад в развитие Кузбасса» III степени. В 2002 г. ему при-

своено почетное звание «Заслуженный врач РФ». В 2005 г. он награжден медалью «За служение Кузбассу». Юрий Алексеевич неоднократно был отмечен администрацией Новокузнецка и Кемеровской области, как один из преуспевающих руководителей и организаторов здравоохранения: два благодарственных письма от Администрации Кемеровской области (1998, 2004 гг.), почетные грамоты от администрации Кемеровской области (2000 г.), Департамента науки и высшей школы Кемеровской области (2002 г.), администрации города Новокузнецка (2000 г.) и управления здравоохранения Администрации города Новокузнецка (2003 г.). В 2010 году совместно с коллективом коллег стал Лауреатом премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники «за повышение эффективности диагностики и лечения острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) на основе разработки и внедрения новейших медицинских технологий».

Высокий профессионализм, ответственность, чуткое, доброе отношение к людям, интеллигентность, скромность и порядочность снискали Юрию Алексеевичу заслуженный авторитет среди коллег, учеников и благодарных пациентов.

Ушел из жизни замечательный Человек, Врач, Ученый и Педагог. Светлая память о нем навсегда останется в сердцах всех знавших Юрия Алексеевича.

Редакция журнала «Общая реаниматология», коллектив Института общей реаниматологии имени В. А. Неговского ФНКЦ РР, сотрудники кафедры анестезиологии-реаниматологии Новокузнецкого государственного института усовершенствования врачей, друзья и коллеги выражают искренние соболезнования родным, близким Юрия Алексеевича Чурляева и скорбят вместе с ними.

Памяти профессора Н. В. Шаповаловой

In Memory of Professor Nina V. Shapovalova

22 февраля 2018 года на 86-ом году ушла из жизни видный ученый, талантливый педагог доктор медицинских наук, Почетный профессор Воронежского государственного медицинского университета им. Н. Н. Бурденко Шаповалова Нина Владимировна. Она стояла у истоков становления анестезиолого-реанимационной службы Воронежской области и по праву считается одним из ее основоположников.

Нина Владимировна родилась 30 ноября 1932 года в Новохоперске в семье служащих. В 1950 г., окончив с серебряной медалью школу, поступила в Воронежский государственный медицинский институт им. Н. Н. Бурденко. С 3 курса она начала активно заниматься в научном студенческом кружке на кафедре госпитальной хирургии под руководством профессоров В. П. Радужкевича и Б. Ф. Дивногорского. Сначала она была старостой кружка, а затем председателем научного студенческого общества. Все свободное от занятий время она отдавала работе в хирургическом кружке, часами занималась в экспериментальной лаборатории.

На заре ее научной деятельности основными направлениями исследований стали проблема тяжелой травмы и оказание помощи больным, находящимся в критическом состоянии. Еще будучи студенткой, она опубликовала результаты своих первых исследований в клинике и эксперименте. Участвовала, выступая с научным докладом, на одном из юбилейных заседаний научного студенческого общества в Минском государственном медицинском институте.

По окончании института (1956 г.) Н. В. Шаповалова — ординатор, а затем заведующая отделением травматологии и ортопедии Воронежской областной клинической больницы. И вновь практическую деятельность она умело сочетает с научными изысканиями. В 1964 г. успешно заканчивает клинико-экспериментальные исследования и защищает кандидатскую диссертацию «Заполнение костных полостей синтетическим аллопластом пороном», выполненную под руководством профессора В. П. Радужкевича.

С 1972 г. Нина Владимировна переходит на работу в Воронежский государственный медицинский институт им. Н. Н. Бурденко ассистентом кафедры госпитальной хирургии, затем травматологии и ортопедии, а с 1973 г. она становится доцентом кафедры анестезиологии и реаниматологии, возглавляемой профессором Л. Ф. Косоноговым.



Период ее творческого расцвета совпал со временем руководства кафедрой госпитальной хирургии видным ученым, заслуженным деятелем науки Российской Федерации, доктором медицинских наук, профессором В. П. Радужкевичем. Именно его она с гордостью считает своим первым учителем. Ему принадлежала идея использования вспомогательного кровообращения в комплексном лечении тяжелого травматического шока. Сформировался коллектив хирургов, анестезиологов-реаниматологов, который начал экспериментальные исследования по этой сложной и актуальной проблеме. Но, к великому сожалению, именно в этот момент уходит из жизни профессор В. П. Радужкевич.

Клинико-экспериментальные исследования по проблеме тяжелого травматического шока продолжают под руководством заведующего кафедрой анестезиологии и реаниматологии профессора Л. Ф. Косоногова, заслуженного деятеля науки Российской Федерации, талантливого клинициста, педагога и ученого. Идея использования гипербарической оксигенации в комплексной терапии шока принадлежала заведующему кафедрой патологической физиологии, заслуженному деятелю науки РСФСР, профессору А. Н. Леонову, автору адаптационно-метаболической теории лечебного действия ГБО. В результате большого и кропотливого труда в 1988 г. Н. В. Шаповалова защитила докторскую диссертацию «Вспомогательное кровообращение и гипербарическая оксигенация в комплексном лечении тяжелого травматического шока» во Всесоюзном научном центре хирургии им. академика Б. В. Петровского.

С 1989 г. Н. В. Шаповалова — заведующая курсом анестезиологии и реаниматологии факультета усовершенствования врачей. Через 3 года в 1992 г. курс трансформировался в кафедру анестезиологии

и реаниматологии ФУВ (сегодня это Институт дополнительного профессионального образования). Кафедрой Нина Владимировна руководила 18 лет.

Обладая незаурядными организаторскими способностями в течение 10 лет Н. В. Шаповалова работала деканом факультета усовершенствования врачей. Вклад ее в становление и развитие факультета был весьма значим. Факультет представлял одно из мощных учебных подразделений Воронежской государственной медицинской академии (в настоящее время – университет), имеющее хорошо оснащенную производственную базу.

При активном взаимодействии с практическим здравоохранением к педагогическому процессу охотно привлекались его лучшие представители. Кадровый состав пополнялся новыми докторами наук. Достаточно сказать, что в течение 5 лет была защищена двадцать одна докторская диссертация, опубликовано 15 монографий.

Тематическое усовершенствование и переподготовка специалистов проводилась по шестидесяти трем специальностям. Ежегодно факультет выпускал более шести тысяч слушателей. И это были не только врачи из областей Черноземья, но и из Челябинска, Оренбурга, Волгограда, Ростова и других городов. В общем, факультет был готов к тому, чтобы трансформироваться в Институт дополнительного профессионального образования, что и произошло в январе 2006 года.

Активную научную деятельность Нина Владимировна совмещала с организаторской работой. Ею, совместно с учениками, опубликовано более

трехсот научных работ в местных, центральных изданиях, за рубежом – доклады на международных форумах в Москве, Бухаресте, Риме. Кроме того, опубликовано шесть монографий, одна из которых «Вспомогательное кровообращение и ГБО при тяжелом травматическом шоке».

Под ее руководством защищено 28 кандидатских и 3 докторских диссертации. Она была членом диссертационного совета по анестезиологии и реаниматологии при Воронежской государственной медицинской академии, членом проблемной комиссии «Экстремальные и терминальные состояния», членом редакционного совета центрального научно-практического журнала «Общая реаниматология».

Жизненный путь Нины Владимировны был насыщен большим количеством ярких событий и свершений. Она была выдающейся, незаурядной личностью, наставником, воспитавшим целую плеяду врачей, научных работников, а самое главное, достойных людей. Нину Владимировну ценили сотрудники за педагогический талант, деловые качества и умение добиваться поставленных целей, а родные и близкие – за заботу, ласку, доброту и терпимость. Память о ней навсегда останется в сердцах коллег, дочери и внуков. «Смерть тех, кто творит бессмертные дела, всегда преждевременна».

Редакция журнала «Общая реаниматология», коллектив Института общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР, друзья и коллеги Нины Владимировны выражают искренние соболезнования ее родным и близким и скорбят вместе с ними.

Информация для авторов журнала «Общая реаниматология»

Правила подготовки, подачи и публикации рукописи, дополненные в соответствии с рекомендациями АНРИ (Ассоциации Научных Редакторов и Издателей, РФ) и ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) для научных изданий, входящих в международные базы данных, в редакции от 17.02.2017 г.

Information for English-Speaking Authors

Requirements for publication in the journal General Reanimatology based on «International Committee of Medical Journal Editors. Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals», which is available at <http://www.ICMJE.org>.

Правовые аспекты публикации рукописи

Условия публикации рукописи

— Рукописи публикуются при обязательном соблюдении автором этики и правил публикации (подробнее на сайте журнала: www.reanimatology.com).

— Рукописи публикуются с соблюдением норм авторского права и конфиденциального отношения к персональным данным авторов.

— Рукописи публикуются бесплатно.

— Рукописи, принятые в журнал, проходят рецензирование на оригинальность, этичность, значимость, адекватность статистической обработки данных на условиях конфиденциальности за исключением выявления фальсификации данных.

— Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать рукописи.

Причины снятия с печати и задержки публикации рукописи

— Рукописи, не соответствующие профилю журнала, не принимаются.

— Рукописи, ранее опубликованные, а также направленные в другой журнал или сборник, не принимаются.

— За некорректное оформление и недостоверность представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до снятия рукописи с печати.

— Нарушение правил оформления рукописи, несвоевременный, а также неадекватный ответ на замечания рецензентов и научных редакторов приводят к задержке публикации до исправления указанных недостатков. При игнорировании замечаний рецензентов и научных редакторов рукопись снимается с дальнейшего рассмотрения.

— Рукописи отклоненных работ редакцией не возвращаются.

Интересы сторон: Автор/Редакция

Редакция оставляет за собой право считать, что авторы, предоставившие рукопись для публикации в журнал «Общая реаниматология», согласны с условиями публикации и отклонения рукописи, а также с правилами ее оформления.

Редакция оставляет за собой право считать, что автор, ответственный за переписку с редакцией, выражает позицию всего авторского коллектива.

Автор получает информационные электронные письма обо всех этапах продвижения рукописи, включая уведомление о несоответствии рукописи профилю журнала и правилам оформления; тексты рецензий; решение редколлегии о публикации или отклонении рукописи; верстку отредактированного варианта рукописи для получения авторского допуска к печати. Дополнительную информацию о продвижении рукописи автор может получить по адресу: journal_or@mail.ru; www.reanimatology.com.

Гарантии Автора

Предоставленная в редакцию рукопись полностью оригинальна. Использование любых материалов других авторов допускается только с их разрешения и при обязательной ссылке на этих авторов.

Список авторов содержит только тех лиц, которые внесли ощутимый вклад в концепцию, проект, исполнение или интерпретацию заявленной работы, то есть тех лиц, которые соответствуют критериям авторства.

Рукопись не содержит материалов, запрещенных в открытой печати действующим законодательством России.

Гарантии редакции

Любые рукописи, полученные редакцией для рецензирования, будут восприниматься как конфиденциальные документы. Они не могут быть показаны другим лицам и обсуждены с ними, за исключением лиц, уполномоченных редакцией.

Неопубликованные материалы, находящиеся в предоставленной статье, не будут использованы в собственном исследовании научного редактора и рецензентов без письменного разрешения автора.

Рецензент не будет допущен к рассмотрению рукописи, если имеет место конфликт интересов в его конкурентных, партнерских либо других отношениях с кем-либо из авторов, компаний или организаций, связанных с материалом публикации.

Конфликт интересов сторон: Автор/Редакция

Конфликт интересов сторон Автор/Редакция решается путем переговоров сторон в соответствии с действующим законодательством РФ и международными нормативно-правовыми актами, регулирующими публикацию рукописей в медицинских журналах.

Согласие или несогласие на публикацию отредактированного варианта рукописи выражается в электронном письме автора, ответственного за переписку с редакцией.

Формы письма:

1) Авторы не имеют замечаний после ознакомления с версткой и согласны на публикацию материала в представленном виде.

2) Авторы согласны на публикацию материала после внесения в верстку следующих правок и/или замечаний (далее следует перечень).

3) Авторы не согласны на публикацию материала в представленном виде в связи... (объяснение причины отказа).

Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

Сроки продвижения рукописи

— Экспертиза на соответствие профилю журнала и правилам оформления — не более 3-х рабочих дней с момента поступления рукописи в редакцию.

— Рецензирование — не более 20-и рабочих дней с момента электронной отправки рецензенту рукописи.

— Ответ автора рецензентам — не более 7-и рабочих дней с момента электронной отправки автору рецензии.

— Заседание редколлегии — 1 раз в 2 месяца не позднее, чем за 1 месяц до выпуска тиража журнала.

— Оповещение автора о решении редколлегии и ознакомление с версткой отредактированного варианта — не позднее 3-х рабочих дней с момента выхода соответствующей информации.

Отправка материалов для публикации

Материалы для публикации на русском и английском языках следует направлять в виде электронных файлов на сайт журнала: www.reanimatology.com, или по адресу редакции: journal_or@mail.ru. Формат подписи файлов: фамилия первого автора, обозначение материала (текст, иллюстрации и др.), дата (число, месяц, год). Внимание: полностью автоматизированный перевод с русского языка на английский имеет низкое качество и не принимается. НКО Фонд «Медицина критических состояний» оказывает содействие в переводе материалов для публикации с русского языка на английский (справки по адресу редакции: journal_or@mail.ru).

Материал статей включает: 1) титульный лист; 2) резюме и ключевые слова; 3) полный текст рукописи с подписями всех авторов, под-

тверждающими участие в выполнении представляемой работы и удостоверяющими согласие с содержанием рукописи (в виде скана страницы); 4) таблицы и иллюстрации (графики, диаграммы, фотографии, рисунки и т. п.) с номером, названием и примечанием; 5) библиографический список; 6) сопроводительное письмо на русском языке на имя главного редактора журнала, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа.

Форма сопроводительного письма

Главному редактору журнала
«Общая реаниматология»

Заслуженному деятелю науки России,
член-корреспонденту РАН, профессору
В. В. Морозу

Просим рассмотреть вопрос о публикации ... (вид рукописи; Фамилии, Имена, Отчества всех авторов; название рукописи).

Авторы рукописи ознакомлены с Информацией для авторов, предоставленной редакцией журнала «Общая реаниматология», и согласны с правилами подготовки, подачи и публикации рукописи.

Данная рукопись не дублирует предыдущие публикации, в ней не затрагиваются интересы третьих сторон и не нарушаются этические нормы публикации.

Ответственный за переписку с редакцией: Имя, Отчество, Фамилия одного из авторов рукописи, e-mail, телефон.

Подпись руководителя учреждения.

Сопроводительное письмо должно быть напечатано на бланке учреждения, в котором выполнена работа.

Требования к печати

Вид: ориентация книжная, выравнивание по ширине, формат A4.

Шрифт: Times New Roman 12-го размера черного цвета.

Интервалы и отступы: межстрочный интервал в тексте — 1,5; межстрочный интервал в подписях к таблицам и иллюстрациям, в примечаниях — 1; интервал до и после абзаца — нет; отступ первой строки — 1,25 см; поля — 2,5 см со всех сторон.

Нумерация страниц: в правом нижнем углу.

Формат файлов: текст, таблицы, подписи к таблицам и иллюстрациям — Word; графики, диаграммы — Excel; рисунки — jpeg; фотографии — высокого разрешения, сохраненные в любом формате.

Рекомендуемое разрешение при сканировании: изображения с использованием линий и рисунки — 1200 dpi; фотографии, радиографии — не менее 300 dpi; фотографии, радиографии с текстом — не менее 600 dpi.

Единицы измерения должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), температура — шкале Цельсия.

Далее см. www.reanimatology.com



- Полная электронная медицинская карта пациента
- Автоматизация технологических процессов
- Интеграция анестезиологического и реанимационного оборудования
- Полный цикл назначений на медикаменты
- Карта интенсивной терапии
- Наркозная карта
- Прогностические шкалы

Downloaded by [TU Darmstadt] at 11:56 17 July 2015

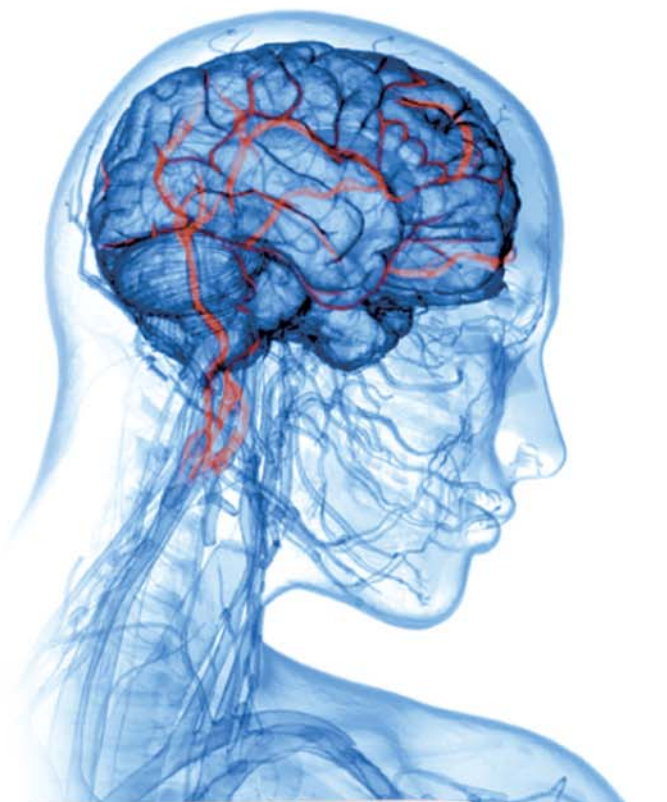
info@asklepius.ru
Тел. +7 967-262-56-09



Цитофлавин

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РАСТВОР ДЛЯ ВНУТРИВЕННО
СРЕДСТВО ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ КАПЕЛЬНО

фармакоэкономика



Гармоничная нейропротективная композиция

- Уменьшает объем ишемического поражения и снижает смертность при инсульте
- Снижает инвалидизацию
- Восстанавливает сознание и когнитивные функции
- Наименьшая сумма затрат на лечение пациентов с ОНМК



НОВАЯ
УПАКОВКА



Рег. № 003135/01 от 21.11.2008 РЕКЛАМА

ООО «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФИРМА «ПОЛИСАН»
INFO@POLYSAN.RU WWW.POLYSAN.RU

РОССИЯ, 192102, Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ,
УЛ. САЛОВА, Д. 72, КОР. 2, ЛИТ. А,
ТЕЛ.: +7 (812) 710-82-25

Интеллект на защите
здоровья
polysan

ИНФОРМАЦИЯ ПРЕДНАЗНАЧЕНА ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ