сетевой научный журнал ISSN 2313-8955

НАУЧНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

RESEARCH RESULT

Том 4 | № 2
Volume 4 | 2018

МЕДИЦИНА И ФАРМАЦИЯ

MEDICINE AND PHARMACY

Сайт журнала:
rrmedicine.ru
сетевой научный рецензируемый журнал
online scholarly peer-reviewed journal

НАУЧНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ
RESEARCH RESULT

МЕДИЦИНА И ФАРМАЦИЯ
MEDICINE AND PHARMACY

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Свидетельство о регистрации средства массовой информации Эл. № ФС 77-69078 от 14 марта 2017 г.

The Journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor)
Mass media registration certificate El. № FS 77-69078 of March 14, 2017

Том 4, №2. 2018

СЕТЕВОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Издается с 2014 г.
ISSN 2313-8955

Volume 4, № 2. 2018

ONLINE SCHOLARLY PEER-REVIEWED JOURNAL
First published online: 2014
ISSN 2313-8955

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР: ***Чурносов М.И.,*** *доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА: ***Новиков О.О.,*** *доктор фармацевтических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
РЕДАКТОР АНГЛИЙСКИХ ТЕКСТОВ: ***Ляшенко И.В.,*** *кандидат филологических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ: ***Малютина А.Ю.,*** *кандидат фармацевтических наук, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
ТЕХНИЧЕСКИЙ СЕКРЕТАРЬ: ***Цветкова З.Е.,*** *ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:
Александровский Ю.А., *член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского», Москва, РФ*
Ворсанова С.Г., *доктор биологических наук, профессор, «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева» ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва, РФ*
Жернакова Н.И., *доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
Жилякова Е.Т., *доктор фармацевтических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
Иллиг Т., *доктор естественных наук, профессор, Ганноверский объединенный биобанк, институт генетики человека, Ганновер, Германия*
Кубешова Х.М., *MD, PhD, профессор, Масариков университет, Брно, Чехия*
Куркин В.А., *доктор фармацевтических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», Самара, РФ*
Малерба Дж., *PhD, профессор медицинской генетики, Университет Вероны, Верона, Италия*
Нкенке Э., *MD, DMD, MA, доктор медицинских наук, профессор, Венский медицинский университет, Вена, Австрия*
Полоников А.В., *доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», Курск, РФ*
Прощаев К.И., *доктор медицинских наук, профессор, АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «ГЕРОНТОЛОГИЯ»», Москва, РФ*
Руженков В.А., *доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
Солих П., *доктор фармацевтических наук, профессор, Карлов университет, Градец-Кралове, Чехия*
Степанов В.А., *член-корреспондент Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор, НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, РФ*
Фрейдин М.Б., *доктор биологических наук, Королевский колледж Лондона, Лондон, Великобритания*
Халикова М.А., *кандидат фармацевтических наук, Карлов университет, Градец-Кралове, Чехия*
Хуснутдинова Э.К., *член-корреспондент Российской академии образования, доктор биологических наук, профессор, Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, РФ*
Эберт А.Д., *PhD, доктор медицинских наук, профессор, Клиника женского здоровья, гинекологии и акушерства, Берлин, Германия*
Юров И.Ю., *профессор Российской академии наук, доктор биологических наук, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, РФ*

EDITORIAL TEAM:

EDITOR-IN-CHIEF: ***M.I. Churnosov****, Doctor of Medical Sciences, Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF: ***O.O. Novikov,*** *Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
ENGLISH TEXT EDITOR: ***I.V. Lyashenko,*** *Candidate of Philological Sciences, Associate Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
EXECUTIVE SECRETARY: ***A.Yu. Malyutina,*** *Candidate of Pharmaceutical Sciences, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
TECHNICAL SECRETARY: ***Z.E. Tsvetkova,*** *Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*

EDITORIAL BOARD:
Yu.A. Aleksandrovsky, *Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia*
S.G. Vorsanova, *Doctor of Biological Sciences, Professor, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics of Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*
N.I. Zhernakova, *Doctor of Medical Sciences, Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
E.T. Zhilyakova, *Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
T. Illig, *Doctor Rerum Naturalium, Professor, Hanover Unified Biobank, Institute of Human Genetics, Hannover, Germany*
H.M. Kubeshova, *MD, PhD, Professor, Masaryk University, Brno, Czech Republic*
V.A. Kurkin, *Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Samara State Medical University, Samara, Russia*
G. Malerba, *PhD, Professor of Medical Genetics, University of Verona, Verona, Italy*
E. Nkenke, *MD, DMD, MA, Doctor Rerum Medicarum, Full Professor, Medical University of Vienna, Vienna, Austria*
A.V. Polonikov*, Doctor of Medical Sciences, Professor, Kursk State Medical University, Kursk, Russia*
K.I. Proshchaev, *Doctor of Medical Sciences, Professor, Research Medical Center "Gerontology", Moscow, Russia*
V.A. Ruzhenkov, *Doctor of Medical Sciences, Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
P. Solich, *Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic*
V.A. Stepanov, *Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Biological Sciences, Professor, Research Institute of Medical Genetics of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*
M.B. Freydin, *Doctor of Biological Sciences, King's College London, London, UK*
M.A. Khalikova, *Candidate of Pharmaceutical Sciences, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic*
E.K. Khusnutdinova, *Corresponding Member of the Russian Academy of Education, Doctor of Biological Sciences, Professor, Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia*
A.D. Ebert, *PhD, Doctor Medicinae Habilitatus, Professor, Practice for Women's Health, Gynecology & Obstetrics, Berlin, Germany*
I.Yu. Iourov, *Professor of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Biological Sciences, Mental Health Research Center, Moscow, Russia*

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
Издатель: НИУ «БелГУ». Адрес издателя: 308015 г. Белгород, ул. Победы, 85.
Журнал выходит 4 раза в год

Founder: Federal State Autonomous Educational Establishment of Higher Education
«Belgorod State National Research University»
Publisher: Belgorod State National Research University
Address of publisher: 85 Pobeda St., Belgorod, 308015, Russia
Publication frequency: 4 /year

© Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 2018
© Belgorod State National Research University, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Булынин В.В., Волков Д.В. Пути снижения риска развития синдрома мальнутриции у хирургических пациентов пожилого и старческого возраста	**3**
Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Демидова И.А., Колотий А.Д., Куринная О.С., Кравец В.С., Юров И.Ю. Биомаркеры неонкологических болезней мозга, обусловленных хромосомной нестабильностью, у детей	**8**
Данилко К.В., Назарова Л.Ш., Хабибуллина Р.Р., Хайруллина Р.Р., Слесаренко Я.С., Шамиева М.В., Муталова Э.Г., Викторова Т.В. Полиморфизм генов *IL10, CTLA4* и предрасположенность к ревматоидному артриту	**18**
Демакова Н.А. Молекулярно-генетические характеристики пациенток с гиперплазией и полипами эндометрия	**26**
Пономаренко И.В. Отбор полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях	**40**
Руженкова В.В. Учебный стресс как фактор риска формирования аддиктивного поведения, тревожных и депрессивных расстройств у иностранных студентов медиков	**55**
Текуева Д.И. Комплекс физической реабилитации в лечении пациентов старшей возрастной группы, после перенесенного инфаркта миокарда	**69**
N.N. Boyko, N.A. Makarevich, D.I. Pisarev, E.T. Zhilyakova Simplified mathematical modeling of the distribution process of licuroside and glycyram between the extractant and *Glycyrrhizae* radices	**75**
Зинченко А.А. Совместное определение β-циклодекстрана и поливинилпирролидона в многокомпонентных препаратах методом ВЭЖХ	**81**
Огай М.А., Ковтун Е.В., Чахирова А.А., Саморядова А.Б., Богатырева З.Н. Разработка и исследование фитоэкстрактов, содержащих флавоноиды	**90**

V.V. Bulynin, D.V. Volkov How to reduce the risk of developing malnutriatic syndrome in senior and senile surgical patients	**3**
S.G. Vorsanova, Yu.B. Iourov, I.A. Demidova, A.D. Kolotiy, O.A. Kurinnaya, V.S. Kravets, I.Yu. Yurov Biomarkers for childhood nonmalignant brain diseases assocaited with chromosome instability	**8**
K.V. Danilko, L.Sh. Nazarova, R.R. Khabibullina, R.R. Khairullina, Ya.S. Slesarenko, M.V. Shamieva, E.G. Mutalova, T.V. Viktorova Polymorphism of *IL10, CTLA4* genes and predisposition to rheumatoid arthritis	**18**
N.A. Demakova Molecular and genetic characteristics of patients with hyperplasia and endometric polyps	**26**
I.V. Ponomarenko Selection of polymorphic loci for association analysis in genetic-epidemiological studies	**40**
V.V. Ruzhenkova Educational stress as a factor of the risk of formation of additive behavior, alert and depressive disorders in foreign medical students	**55**
D.I. Tekueva A complex of physical rehabilitation in the treatment of patients after myocardial infarction	**69**
N.N. Boyko, N.A. Makarevich, D.I. Pisarev, E.T. Zhilyakova Simplified mathematical modeling of the distribution process of licuroside and glycyram between the extractant and *Glycyrrhizae* radices	**75**
A.A. Zinchenko Joint determination of β-cyclodextran and polyvinyl pyrrolidone in multi-component preparations with a HPLC method	**81**
M.A. Ogay, E.V. Kovtun, A.A. Chakhirova, A.B Samoryadova, Z.N. Bogatyreva Development and investigation of phytoextracts containing flavonoids	**90**

УДК 616.3:616-008.9:616-008.1 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-1**

Булынин В.В.[1],
Волков Д.В.[2]

СИНДРОМА МАЛЬНУТРИЦИИ У ХИРУРГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», 394036, Россия, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10
E-mail: dr.bulinin@mail.ru
[2] Автономная некоммерческая организация «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология», 125319, г. Москва, ул. 1-я Аэропортовская, 6
E-mail: sggorelik@mail.ru

Аннотация. *Актуальность.* Современные технологии энтерального и парентерального питания, наряду с антибактериальной терапией, респираторной и инотропной поддержкой, рациональной инфузионной терапией стали сегодня неотъемлемой частью комплекса лечебных мероприятий, проводимых у пациентов с перитонитом, сепсисом, политравмой, полиорганной дисфункцией. Несмотря на это среди пациентов, перенесших оперативное вмешательство, синдром мальнутриции диагностируется в 14-15%. По нашему мнению, это связано, в первую очередь, с недостаточной оценкой трофического статуса больного. *Цель исследования.* Сравнение различных методов оценки нутритивного статуса и расчета реальной энергопотребности и пластического материала (белка) у пациентов с перитонитом. *Материалы и методы.* Истории болезни 85 пациентов, оперированных по поводу перитонита различной этиологии в ОГБУЗ ГКБ №1 г. Белгорода. Данные, полученные из клинических, лабораторных, антропометрических методов исследования, были направлены на изучение нутритивного статуса пациента известным методом, предложенным Луфт В.М. и Костюченок А.Л. (2001) в сравнительном аспекте с методом опроса пациента по шкале «Мини-исследование нутритивного статуса» (MNA). Энергетическая потребность рассчитывалась по степени катаболизма и при использовании оригинальной программы для смартфонов «Оптимизация питания пациентов с синдромом мальнутриции» на основе формулы Харриса-Бенедикта. *Результаты.* Первым этапом проведенного исследования явился сравнительный анализ методов определения трофического статуса, который позволил сделать вывод о том, что в ургентной хирургии для быстрой диагностики трофического статуса наиболее удобен метод опроса с использованием шкалы MNA. На втором этапе нашего исследования при проведении сравнительного анализа оценки энергетических потребностей пациента с перитонитом было доказано, что экономически более выгодной и удобной шкалой для оценки нутритивного статуса является шкала

MNA, а для расчета реальной энергопотребности и белка у пациентов в экстренной хирургии оправдано применение разработанной нами оригинальной программы «Оптимизация питания пациентов с синдромом мальнутриции» на основе дополненной формулы Харриса-Бенедикта. *Заключение.* Таким образом, своевременная предоперационная и ранняя послеоперационная нутритивная поддержка у пациентов пожилого и старческого возраста, перенесших оперативное вмешательство, в особенности у больных с перитонитом, помогает снизить риск возникновения синдрома мальнутриции, а также уменьшить расходы на лечение и пребывание в стационаре.

Ключевые слова: нутритивная поддержка; перитонит; синдром мальнутриции; энергетическая потребность

Информация для цитирования: Булынин В.В., Волков Д.В. Пути снижения риска развития синдрома мальнутриции у хирургических пациентов пожилого и старческого возраста // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С. 3-7. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-1

V.V. Bulynin[1], D.V. Volkov[2]

HOW TO REDUCE THE RISK OF DEVELOPING MALNUTRIATIC SYNDROME IN SENIOR AND SENILE SURGICAL PATIENTS

[1] Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko
10 Studencheskaya St., Voronezh, Russia, 394036
E-mail: dr.bulinin@mail.ru
[2] Research Medical Center «Gerontology»,
6 1st Aeroportovskaya St., Moscow, Russia, 125319
E-mail: sggorelik@mail.ru

Abstract. *Background*. Modern technologies of enteral and parenteral nutrition, along with antibiotic therapy, respiratory and inotropic support, and rational infusion therapy, are now an integral part of the complex of therapeutic measures performed in patients with peritonitis, sepsis, polytrauma, and multiple organ dysfunction. Despite this, among patients who underwent operative intervention, malnutrition syndrome is diagnosed in 14-15%. In our opinion, this is due, first of all, to an insufficient assessment of the trophic status of the patient. *The aim of the study*. To compare different methods for assessing a nutritional status and calculating real energy requirements and plastic material (protein) in patients with peritonitis. *Materials and methods*. The medical history of 85 patients operated on for peritonitis of various etiologies in Belgorod City Hospital 1. The data obtained from clinical, laboratory, anthropometric research methods were aimed at studying the nutritional status of patients by the known method proposed by Luft V.M. and Kostyuchenok A.L. (2001) in a comparative aspect with the method of questioning patients on the scale "Mini research of nutritional status" (MNA). The energy requirement was calculated by the degree of catabolism and using the original program for smartphones "Optimizing the Nutrition of Patients with Malnutrition Syndrome" based on the Harris-Benedict formula. *Results.* The first stage of the study was a comparative analysis of methods for determining the trophic status, which showed that it was possible to conclude that in urgent surgery for rapid diagnosis of trophic status, the most convenient method for interviewing was the use of the

MNA scale. At the second stage of our study, when conducting a comparative analysis of the energy needs of a patient with peritonitis, it was proven that the MNA scale is a more cost effective and convenient scale for assessing the nutritional status, and in order to calculate real energy requirements and protein in patients in emergency surgery, the use of the original program "Optimizing the Nutrition of Patients with Malnutrition Syndrome" on the basis of the supplemented Harris-Benedict formula is justified. *Conclusion.* Thus, timely preoperative and early postoperative nutritional support in elderly and senior patients who underwent surgery, especially in patients with peritonitis, helps reduce the risk of malnutrition syndrome, as well as reduce the costs of treatment and hospital stay.

Keywords: nutritional support; peritonitis; malnutrition syndrome; energy demand.
Information for citation: BulyninVV, Volkov DV. Puti snizheniya riska razvitiya sindroma mal'nutritsii u khirurgicheskikh patsientov pozhilogo i starcheskogo vozrasta [How to reduce the risk of developing malnutriatic syndrome in senior and senile surgical patients]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):3-7.
DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-1

Введение. С того времени, как Чарльз Баттерворт впервые опубликовал свою статью под названием «Скелет в больничном шкафу» в 1974 г. уже было известно о том, что синдром мальнутрции является одним из определяющих факторов в выздоровлении пациентов после хирургической операции [8]. Однако, и по прошествии 40 лет, проблема остается актуальной. Доказано, что пациенты, перенесшие оперативное вмешательство, более подвержены риску развития синдрома мальнутриции, что обусловлено не только послеоперационным стрессом и присоединением контаминантной инфекции, но и сопровождающимся ускорением метаболических процессов вцелом [2, 5, 6, 9, 10].

Цель исследования: сравнить различные методы оценки нутритивного статуса и расчета реальной энергопотребности и пластического материала (белка) у пациентов с перитонитом.

Материал и методы исследования. Для проведения данного исследования были отобраны истории болезни 85 пациентов, перенесших оперативное вмешательство по поводу перитонита различной этиологии в ОГБУЗ ГКБ №1 г. Белгорода. Данные, полученные из клинических, лабораторных, антропометрических методов исследования, были направлены на изучение нутритивного статуса пациента известным методом, предложенным Луфт В.М. и Костюченок А.Л. (2001) в сравнительном аспекте с методом опроса пациента по шкале «Мини-исследование нутритивного статуса» (MNA) [3, 4, 7]. Энергетическая потребность рассчитывалась по степени катаболизма (потеря массы тела в последние три месяца и потеря азота) и при использовании оригинальной программы для смартфонов «Оптимизация питания пациентов с синдромом мальнутриции» (Свидетельство о государственной регистрации №2016614483) на основе формулы Харриса-Бенедикта с учетом факторов, определяющих энергетическую потребность у пациентов [1].

Результаты исследования. Первым этапом проведенного исследования явился сравнительный анализ методов определения трофического статуса. Рассчет по лабораторно-антропометрическим показателям, характеризующим степень выраженности недостаточности питания у пациентов с перитонитом показал, что среди пациентов среднего и молодого возраста на момент поступления нутритивный статус определен как нормальный, однако после оперативного лечения у 67.3% пациентов имелась легкая степень недостаточности питания. У 55.6% пациентов пожилого и старческого возраста, осмотренных до оперативного лечения,

определена легкая степень недостаточности питания, у 40.0% из них через 5 суток после операции было отмечено ухудшение нутритивного статуса до средней степени тяжести. У 44.4% пациентов пожилого и старческого возраста, осмотренных до оперативного лечения определена средняя степень недостаточности питания без ухудшения нутритивного статуса после операции. Опрос пациентов по шкале MNA показал наличие риска синдрома мальнутриции у пациентов с легкой степенью недостаточности питания и синдрома мальнутриции у пациентов со средней степенью недостаточности питания до оперативного лечения. После операции у всех пациентов диагностирован синдром мальнутриции. У тех пациентов пожилого и старческого возраста, у которых на момент поступления был нормальный трофический статус по методике Луфт В.М., и Костюченок А.Л.(2001), по шкале MNA диагностировано отсутствие риска и синдрома мальнутриции. Тем не менее, у этих пациентов после операции определен синдром недостаточности питания. Сравнительный анализ методик определения недостаточности питания позволил сделать вывод о том, что в ургентной хирургии для быстрой диагностики трофического статуса наиболее удобен метод опроса с использованием шкалы MNA.

Вторым этапом нашего исследования был проведен сравнительный анализ оценки энергетических потребностей пациента с перитонитом. Энергетические потребности рассчитывались по степени катаболизма (потеря массы тела в последние три месяца и потеря азота) и при использовании формулы Харриса-Бенедикта с учетом факторов, определяющих энергетическую потребность у пациентов с перитонитом, к которым (кроме антропометрических) относят – фактор активности, фактор повреждения, температурный фактор, дефицит (избыток) массы тела. В среднем разница между расчетными показателями составляла 7.9% при расчете суточного калоража и 7.4% при расчете потребности в белке. Это можно объяснить тем, что подсчет энергетических потребностей по степени катаболизма не учитывал антропометрические данные. Проведенные нами исследования показали, что использование шкалы MNA позволяет не только уменьшить сроки пребывания больных в стационаре, но и улучшить результаты лечения больных, перенесших оперативное вмешательство, что является экономически более выгодным. Для расчета реальной энергопотребности и белка у пациентов в экстренной хирургии целесообразно использовать оригинальную программу «Оптимизация питания пациентов с синдромом мальнутриции» на основе дополненной формулы Харриса-Бенедикта.

Заключение. Таким образом, своевременная предоперационная и ранняя послеоперационная нутритивная поддержка у пациентов пожилого и старческого возраста, перенесших оперативное вмешательство, в особенности у больных с перитонитом, помогает снизить риск возникновения синдрома мальнутриции, а также уменьшить расходы на лечение и пребывание в стационаре. Использование оригинальной программы для смартфона позволит оптимизировать процесс расчета необходимыми энергетическими и пластическими материалами.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Горелик С.Г., Прощаев К.И., Масленникова Д.Г. Клинико-экономические особенности хирургической помощи пациентам старческого возраста // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2013. Т.VI, N 3. С. 393-398.
2. Искусственное питание в неотложной хирургии и травматологии / под общ. ред. А.С. Ермолова, М.М. Абакумова. М.: НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, 2001. 389 с.
3. Луфт В.М., Костюченко А.Л. Клиническое питание в интенсивной медицине. Санкт-Петербург, 2002. 173 с.
4. Методические рекомендации Министерства здравоохранения и социального разви-

тия Российской Федерации от 29 августа 2006 г. № 4630-РХ «Парентеральное питание в интенсивной терапии и хирургии». Москва, 2006. 45 с.

5. Нутритивная поддержка больных в критических состояниях / Т.С. Попова [и др.]. М.: ООО «Издат. дом «М-Вести», 2002. 320 с.

6. Оробцова М.В., Горелик С.Г. Реабилитация после операции [Текст] // Медицинская сестра. 2015. N 4. С. 21-22.

7. Основные клинические синдромы в гериатрической практике / А.Н. Ильницкий [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. 2011. N 22(117). Вып.16/1. С. 100-104.

8. Butterworth C.E. The skeleton in the hospital closet // Nutrition Today. 1974. N 9. P. 4-8.

9. Damuleviciene G. Nutritional status of elderly surgical patients // Medicine (Kaunas). 2008. Vol. 44(8). P. 609-618.

10. Lim S.C. Nutrition and the role of tube feeding in the elderly // J.J. Geronto. 2016. Vol. 2(1). P. 017.

References

1. Gorelik SG, Proschayev KI, Maslennikova DG. Kliniko-ekonomicheskiye osobennosti khirurgicheskoy pomoshchi patsiyentam starcheskogo vozrasta [Clinical and economic features of surgical care for patients of senile age]. Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii. 2013;VI(3):393-398. Russian.

2. Ermolova AS, Abakumova MM, editors. Iskusstvennoye pitaniye v neotlozhnoy khirurgii i travmatologii [Artificial nutrition in emergency surgery and traumatology]. Moscow: NII skoroy pomoshchi im. N.V. Sklifosovskogo; 2001. 389 p. Russian.

3. Luft VM, Kostyuchenko AL. Klinicheskoye pitaniye v intensivnoy meditsine [Clinical nutrition in intensive medicine]. St. Petersburg; 2002. 173 p. Russian.

4. Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation. Parenteralnoye pitaniye v intensivnoy terapii i khirurgii [Parenteral nutrition in intensive care and surgery]: methodological recommendations N 4630-PH. Moscow; 2006 Aug 29. 45 p. Russian.

5. Popova TS, Shestopalov AE, Tamazashvili TSh, Leiderman IN. Nutritivnaya podderzhka bol'nykh v kriticheskikh sostoyaniyakh [Nutritional support of patients in critical conditions]. Moscow: OOO «Izdat. dom «M-Vesti»; 2002. 320 p. Russian.

6. Orobtsova MV, Gorelik SG. Reabilitatsiya posle operatsii [Tekst] [Rehabilitation after surgery [Text]]. Meditsinskaya sestra. 2015;4:21-22. Russian.

7. Ilnitsky AN, Zhuravleva YaV, Perelygin KV, et al. Osnovnyye klinicheskiye sindromy v geriatricheskoy praktike [Main clinical syndromes in geriatric practice]. Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy. 2011; 16/1(22(117)):100-104. Russian.

8. Butterworth CE. The skeleton in the hospital closet. Nutrition Today. 1974;9:4-8.

9. Damuleviciene G. Nutritional status of elderly surgical patients. Medicine (Kaunas). 2008; 44(8):609-618.

10.Lim SC. Nutrition and the role of tube feeding in the elderly. J.J. Geronto. 2016;2(1):017.

Булынин Виктор Викторович, доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной хирургии.
Волков Дмитрий Викторович, кандидат медицинских наук, доцент.

Bulynin Viktor Viktorovoch, Doctor of Medical Sciences, Professor of Department of Hospital Surgery.
Volkov Dmitriy Viktorovich, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor.

Статья поступила в редакцию 24 января 2018 г.

УДК575:616.89:616-053.2 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-2**

Ворсанова С.Г.[1,2],
Юров Ю.Б.[1,2],
Демидова И.А.[1,2],
Колотий А.Д.[1,2],
Куринная О.С.[1,2],
Кравец В.С.[1,2],
Юров И.Ю.[1,2,3]

БИОМАРКЕРЫ НЕОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ МОЗГА, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ХРОМОСОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТЬЮ, У ДЕТЕЙ

[1] Обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»,
117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, 1
[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «научный центр психического здоровья»,
115522, Россия, г. Москва, Каширское ш., 34
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждениедополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»,
125993, Россия, г. Москва, ул. Барикадная, 2/1, стр.1
E-mail: ivan.iourov@gmail.com

Аннотация. *Актуальность***.** За последнее десятилетие было предоставлено исчерпывающее количество данных о том, что хромосомная нестабильность является не только молекулярным и клеточным механизмом онкологических заболеваний, но также может быть причиной болезней мозга у детей. *Цель исследования.* В связи с вышесказанным, целью настоящей работы явилась критическая оценка распространенности хромосомной нестабильности у детей с нервно-психическими заболеваниями для понимания механизмов ее возникновения, разработки тактики диагностики, как данной формы хромосомной патологии, так и геномных вариаций ее вызывающих. *Материалы и методы.* На основе цитогенетических и молекулярно-цитогенетических исследований 1000 детей с умственной отсталостью, аутизмом, эпилепсией и/или врожденными пороками развития был оценен потенциал анализа хромосомной нестабильности и биоинформатической оценки данных молекулярного кариотипирования для определения молекулярных (клеточных) механизмов заболевания. *Результаты.* Было обнаружено, что у 10.8% детей с вышеуказанными формами нервно-психических нарушений выявляется хромосомная нестабильность. Биоинформатический анализ позволил сделать вывод о том, что данная форма хромосомной патологии является результатом нарушения «молекулярный путей» (pathways) сохранности стабильности генома, репарации/репликации ДНК, а также регуляции клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток за счет регулярных геномных вариаций. *Заключение*. Полученные данные свидетельствуют о том, что хромосомная нестабильность может быть биомаркером для неонкологических болезней мозга у детей. Более того, в настоящей работе предложен алгоритм идентификации молекулярных и клеточных механизмов заболеваний мозга у детей, обусловленных хромосомной нестабильностью.

Ключевые слова: биомаркеры; болезни мозга; хромосомная нестабильность; хромосомные аномалии; молекулярное кариотипирование; биоинформатика; геномные вариации.
Информация для цитирования: Биомаркеры неонкологических болезней мозга, обусловленных хромосомной нестабильностью, у детей / С.Г. Ворсанова [и др.] // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С. 8-17. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-2

S.G. Vorsanova[1,2], Yu.B. Yurov[1,2], I.A. Demidova[1,2], A.D. Kolotiy[1,2], O.A. Kurinnaya[1,2], V.S. Kravets[1,2], I.Yu. Iourov[1,2,3]

BIOMARKERS FOR CHILDHOOD NONMALIGNANT BRAIN DISEASES ASSOCAITED WITH CHROMOSOME INSTABILITY

[1] Academician Y.E. Veltishchev Research Clinical Institute of Pediatrics,
Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanova St., Moscow, Russia, 117997
[2]Mental Health Research Center,
34 Kashirskoe Shosse, Moscow, Russia, 115522
[3] Russian Medical Academy of Continuous Postgraduate Education,
build. 1, 2/1 Barikadnaya St., Moscow, Russia, 125993
E-mail: ivan.iourov@gmail.com

Abstract. *Background*. Over the past ten years, there has been provided a sufficient amount of data demonstrating that chromosome instability is not limited to being a molecular and cellular mechanism for oncologic diseases but may be also a cause of childhood brain diseases. *The aim of the study.* Thus, the study is aimed at the evaluation of chromosome instability occurrence in children with neuropsychiatric diseases for understanding the mechanism and for developing diagnostic tactics to uncover genomic variations causative for chromosome instability. *Materials and methods.* The article presents the cytogenetic, molecular cytogenetic and bioinformatics studies of 1000 children with intellectual disability, autism, epilepsy, and/or congenital malformations for uncovering molecular (cellular) mechanisms of the disease. *Results.* Chromosome instability is found to occur in 10.8% of children with the aforementioned diseases. Bioinformatics analysis has highlighted genomic alterations to genome stability maintenance, DNA reparation/replication, cell cycle, and programmed cell death pathways as a cause of this type of chromosomal pathology. *Conclusion*. Our data suggest that chromosome instability is a biomarker for nonmalignant brain diseases in children. Moreover, we propose an algorithm for identification of molecular and cellular mechanisms of childhood brain diseases resulted from chromosome instability.

Keywords: biomarkers; brain diseases; chromosome instability; chromosomal abnormalities; molecular karyotyping; bioinformatics; genomic variations.
Information for citation: Vorsanova SG, Yurov YuB, Demidova IA, et al. Biomarkery neonkologicheskikh bolezney mozga, obuslovlennykh khromosomnoy nestabil'nost'yu, u detey [Biomarkers for childhood nonmalignant brain diseases asso-

caited with chromosome instability]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):8-17. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-2

Введение. Современные достижения в области медицинской генетики позволили обнаружить широкий спектр геномной патологии, ассоциированной с умственной отсталостью, аутизмом, эпилепсией и/или врожденными пороками развития [2, 4, 25]. Особое место среди различных форм генетических нарушений, ассоциированных с патологией центральной нервной системы, занимает хромосомная нестабильность. В настоящее время известно, что эта форма соматической вариабельности генома на хромосомном уровне является одним из распространенных механизмов болезней, вызванных нарушением развития центральной нервной системы, а также нейродегенеративных заболеваний [1, 4, 9, 15]. Более того, ранее было высказано предположение о том, что некоторые формы хромосомной нестабильности (например, спорадическая анеуплоидия и неспецифические структурные хромосомные аномалии) могут быть использованы в качестве маркеров для идентификации аномальных процессов (каскадов процессов), приводящих к патологии центральной нервной системы [15, 24].

В современной литературе геномная (хромосомная) нестабильность преимущественно рассматривается в онкологическом контексте, являясь как одним из основных механизмов широко распространенных жизнеугрожающих раковых заболеваний, так и надежным биомаркером малигнизации клеточных популяций [4, 11, 17, 19, 21]. Тем не менее, известно, что хромосомная нестабильность может быть одним из ключевых элементов патогенетического каскада молекулярных и клеточных процессов, связанных с нарушениями репродукции [19], почечной патологией [16], нервными и психическими болезнями [15, 22], а также причиной различных изменений психики, вызванных отрицательным воздействием окружающей среды на организм человека [18]. Помимо этого, предполагается, что подобные изменения соматического генома могут быть одной из причин старения организма на тканевом и клеточным уровнях [23]. Однако, анализируя работы, посвященные хромосомной нестабильности, можно сделать обоснованный вывод о том, что она практически некогда не рассматривалась в контексте биомаркеров болезней мозга, несмотря на значимую роль в патогенезе нарушений центральной нервной системы [1, 4, 15, 22, 24]. Биомаркеры представляют собой изменения в тканях, клетках или биологических жидкостях организма, характерные для определенного патологического состояния, которые могут быть объективно и воспроизводимо измерены с помощью методов клеточной или молекулярной биологии [8, 20]. Поскольку хромосомная нестабильность полностью соответствует данному определению, ее оценка в качестве биомаркера аномальных процессов, приводящих к нарушению функционирования центральной нервной системы у детей, является обоснованной.

Цель исследования. Целью настоящего исследования явилась оценка потенциала использования наличия различных форм хромосомной нестабильности в качестве биомаркеров неонкологических болезней мозга у детей при молекулярной и клеточной диагностике геномной патологии с целью идентификации механизмов патогенеза заболевания.

Материалы и методы. Тысяча детей с умственной отсталостью, аутизмом, эпилепсией и/или врожденными пороками развития были исследованы с помощью цитогенетических методов G- и C-окрашивания [3]. При цитогенетическом анализе хромосомной нестабильности исследовалось не менее 30 метафазных пластинок (клеток) для каждого пациента. Молекулярно-цитогенетическое исследование проводилось методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ориги-

нальных хромосомоспецифичных ДНК проб [1, 3, 4] и включало в себя анализ 100 метафазных пластинок и 1000 интерфазных ядер для каждого исследованного пациента. Данные результатов молекулярного кариотипирования (разрешение сканирования генома не менее 1 тыс. пн) были обработаны с использованием оригинального биоинформатического метода оценки функциональных последствий геномных вариаций в виде изменения числа копий последовательностей ДНК и геномной нестабильности [4, 15], основанный на исследовании межтканевой вариабельности экспрессии генов, вовлеченных в перестройку *in silico*, интерактомном анализе белков, кодируемых этими генами, и идентификации возможных изменений «молекулярных путей» (pathways), вызванных регулярными (наследуемыми или *de novo*) геномными вариациями.

Результаты и обсуждение. У 108 детей с умственной отсталостью, аутизмом, эпилепсией и/или врожденными пороками развития (10.8%) была обнаружена хромосомная нестабильность, которая проявлялась в виде анеуплоидии, крупных структурных перестроек (транслокации, делеции, дупликации, инверсии), ломкости хромосом и хромосомных разрывов. В случаях проявления хромосомной нестабильности в виде анеуплоидии была использована FISH с оригинальными хромосомоспецифичными ДНК пробами. Хромосомная нестабильность в виде мносомии и трисомии была подтверждена. В 31-ом случае было использовано молекулярное кариотипирования в сочетании с оригинальным биоинформатическим методом поиска геномных вариаций, которые могли бы быть причиной хромосомной нестабильности. Во всех исследованных случаях были выявлены вариации числа копий последовательностей ДНК в количестве от 4 до 9 на каждый геном, которые имеют функциональные последствия для таких «молекулярных путей» (pathways), как сохранность стабильности генома, репарация/репликация ДНК, регуляция клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток. Согласно литературным данным [4, 5, 12, 15, 17], подобные нарушения вышеуказанных «кластеров» молекулярных и клеточных процессов приводят к хромосомной нестабильности. Таким образом, учитывая полученные данные и предыдущие исследования [1, 4, 6, 12-15, 26], можно сделать вывод о том, что в описываемых случаях умственной отсталости, аутизма, эпилепсии и врожденных пороков развития хромосомная нестабильность является одним из ключевых элементов патогенетического каскада заболевания и, как следствие, может быть признана механизмом возникновения фенотипических проявлений. Примечательно, что изменения «молекулярных путей» регуляции клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток, в основном, ассоциировались с такими формами хромосомной нестабильности, как анеуплоидия. Геномные вариации, связанные с модифицирующим эффектом «молекулярных путей» сохранности стабильности генома и репликации/репарации ДНК были преимущественно обнаружены при нестабильности, проявляющейся в виде крупных структурных перестроек, ломкости хромосом и хромосомных разрывов. Следовательно, обоснован вывод о том, что различные типы хромосомной нестабильности могут служить биомаркерами аномальных процессов, приводящих к нарушению функционирования центральной нервной системы у детей.

В настоящее время известно большее число геномных вариаций, приводящих к хромосомной нестабильности [4, 5, 17]. В частности, нарушения определенных молекулярных и клеточных процессов, ассоциированных с регуляцией сохранности стабильности генома и репликации/репарации ДНК, могут быть причиной ломкости хромосом [7, 10]. Примечательно, что в настоящей работе были выявлены вариации числа копий последовательностей ДНК, затрагивающие гены, которые вовлечены в соответствующие «молекулярные пути», у детей с ломкостью хромосом. Наименее изученными формами хромосомной нестабильности с точки зрения причин их возникновения являются тканеспецифические измене-

ния числа, нарушения морфологии и разрывы хромосом. Тем не менее, в литературе имеются данные, позволяющие выделить ряд процессов-кандидатов возникновения этих форм хромосомной нестабильности, которые входят в «молекулярные пути» сохранности стабильности генома, репарацию/репликацию ДНК, регуляцию клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток [1, 14, 15, 26]. В связи с вышесказанным, видится необходимым учитывать регулярные геномные вариации, которые ассоциированы с хромосомной нестабильностью, при молекулярной диагностике с целью определения механизма заболевания.

Вариабельность соматического генома является одним из основных механизмов генетической вариабельности на клеточном, тканевом и межиндивидуальном уровнях [6]. Примечательно, что изменения структуры и поведения генома в соматических клетках являются также элементом патогенетического каскада процессов при психических и нейродегенеративных заболеваниях [1-4, 22]. Более того, изменения структуры и морфологии хромосом могут быть результатом отрицательного воздействия окружающей среды, приводя к функциональным нарушениям различных систем организма человека, включая центральную нервную систему [12, 13, 18]. Следовательно, помимо определения причинно-следственной связи между фактом наличия хромосомной нестабильности и вариабельностью генома, имеет значение также мониторинг и более детальный цитогенетический (молекулярно-цитогенетический) анализ типов изменения структуры, числа и морфологии хромосом. К сожалению, на сегодняшний день подобный подход к диагностическим исследованиям хромосомной нестабильности крайне редок.

Учитывая потенциальную диагностическую ценность анализа особенностей и причин возникновения хромосомной нестабильности, являющейся биомаркером патологических процессов при нервно-психических болезнях у детей, было признано целесообразным пересмотреть общепринятую последовательность действий при идентификации хромосомных аномалий. Цитогенетический анализ и молекулярное кариотипирование обычно рассматриваются, как два последовательных этапа диагностики хромосомных аномалий, несмотря на то, что массивы данных, полученных с помощью каждого из этих методов, являются взаимодополняющими, а не иерархическими (например, нередко ошибочно утверждается, что данные цитогенетического анализа вторичны по отношению к результатам молекулярного кариотипирования, или же диагностика хромосомной патологии сводится к проведению исключительно молекулярного кариотипирования) [4, 24]. Проведенное исследование указывает на то, что для увеличения эффективности диагностики хромосомных аномалий за счет идентификации механизма заболевания требуется ряд дополнений. В частности, цитогенетический анализ целесообразно дополнить цитогенетическими и молекулярно-цитогенетическими исследованиями генома в большем числе клеток, регистрируя все типы изменения структуры, числа и морфологии хромосом, а молекулярное кариотипирование, в свою очередь, дополнить биоинформатической оценкой последствий регулярных (структурных) геномных вариаций в контексте их возможного эффекта на «молекулярные пути» сохранности стабильности генома, репарации/репликации ДНК регуляции клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток. В результате внедрения в протоколы диагностики хромосомной (геномной) патологии у детей предлагаемых дополнений алгоритм идентификации молекулярных и клеточных механизмов заболевания, обусловленного хромосомной нестабильностью, будет выглядеть следующим образом: параллельно получается два массива данных: (1) цитогенетические и молекулярно-цитогенетические данные о характере хромосомной нестабильности; (2) данные молекулярного кариотипирования; далее, с помощью биоинформатического анализа второго массива и корреляции его с первым получается возможность определения причины

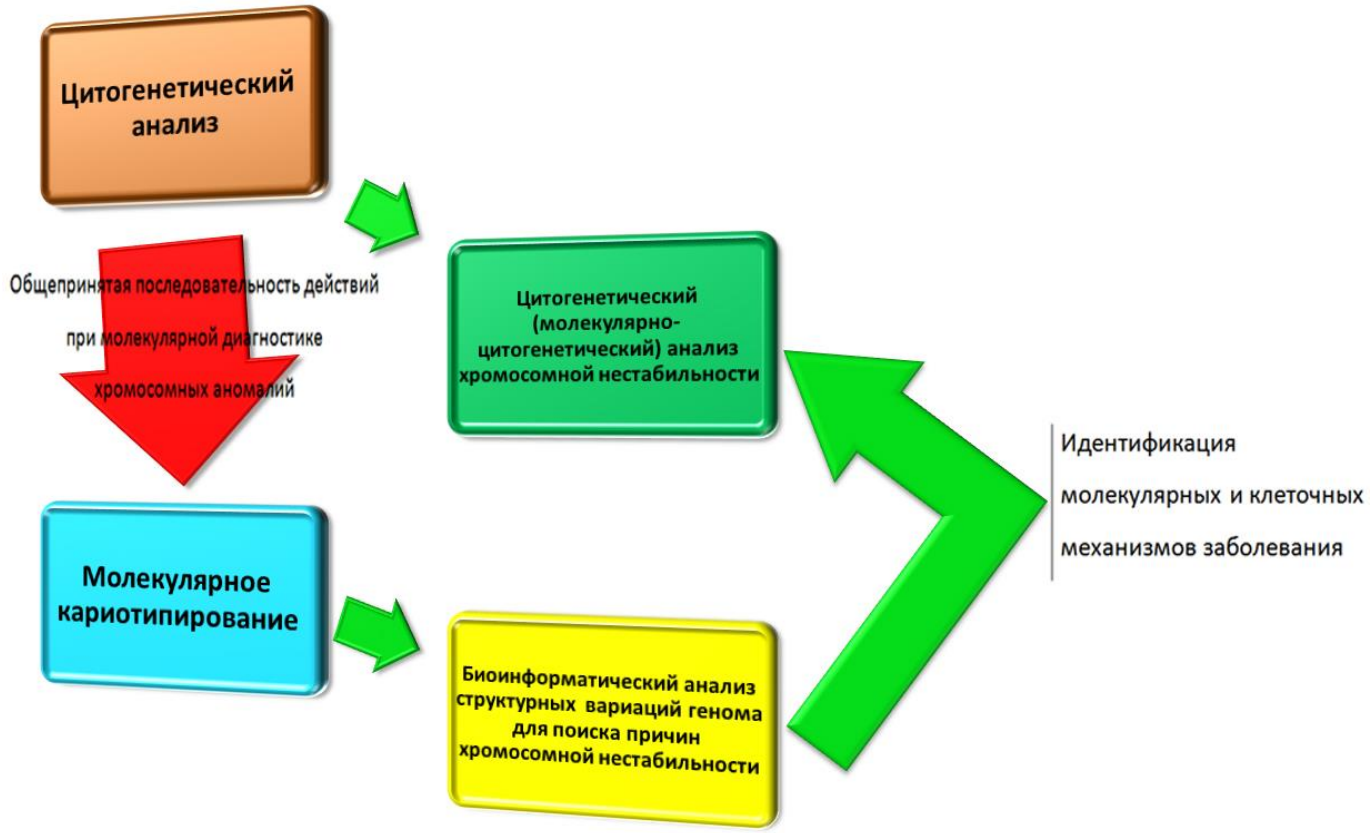

Рис. Схематическое изображение алгоритма идентификации молекулярных и клеточных механизмов заболевания, обусловленного хромосомной нестабильностью. В отличие от общепринятой последовательности действий при молекулярной диагностике хромосомной патологии рекомендуется проводить более детальный анализ хромосомной нестабильности и определение ее возможных причин по данным молекулярного кариотипирования

Fig. Schematic representation of the algorithm for identification of molecular and cellular mechanisms of the disease caused by chromosomal instability. In contrast to the generally accepted sequence of actions for molecular diagnostics of chromosomal pathology, it is recommended to conduct a more detailed analysis of chromosomal instability and to determine its possible causes according to data of molecular karyotyping

хромосомной нестабильности, в частности, и механизма заболевания, в целом. На рисунке схематически изображен предлагаемый алгоритм идентификации молекулярных и клеточных механизмов заболевания, обусловленного хромосомной нестабильностью.

Заключение. У детей с умственной отсталостью, аутизмом, эпилепсией и/или врожденными пороками развития хромосомная нестабильность, выявляемая с помощью цитогенетического анализа, наблюдается в не менее чем 10% случаев. По данным биоинформатического анализа результатов молекулярного кариотипирования хромосомная нестабильность является результатом нарушения «молекулярный путей» (pathways) сохранности стабильности генома, репарации/репликации ДНК, регуляции клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток. Суммируя результаты цитогенетического, молекулярно-цитогенетического и биоинформатического анализа, показано, что различные формы хромосомной нестабильности могут рассматриваться в качестве биомаркеров аномальных процессов, приводящих к нарушению функционирования центральной нервной системы у детей.

Изменения процессов сохранности стабильности генома, репарации/репликации ДНК, клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток на молекулярном и клеточном уровнях вызваны, в свою очередь, регулярными геномными вариациями, модифицирующими соответствующие «молекулярные пути». Таким образом, обоснован вывод о том, что общепринятая последовательность действий при диагностике хромосомной патологии, которая ограничивается проведением цитогенетического анализа и последующего молекулярного кариотипирования, требует существенной доработки.

В настоящей работе предложено рассматривать цитогенетические анализ и молекулярное кариотипирование не как два последовательных диагностических исследования, а как две взаимодополняющие процедуры, необходимые для идентификации не только хромосомной патологии, но и механизма заболевания. Для реализации этой идеи предлагается цитогенетический анализ дополнить цитогенетическими/молекулярно-цитогенетическими исследованиями хромосомной нестабильности, а молекулярное кариотипирование – биоинформатической оценкой последствий геномных вариаций в контексте их возможного эффекта на «молекулярные пути» сохранности стабильности генома, репарации/репликации ДНК, регуляции клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток. Сочетание цитогенетических, геномных и постгеномных/интепретационных технологий обладает большим потенциалом для молекулярной и клеточной диагностики с последующей разработкой тактики лечения и прогнозирования течения заболеваний у детей, обусловленных хромосомной нестабильностью.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Нестабильность хромосом в нервных клетках человека в норме и при нервно-психических заболеваниях / Ю.Б. Юров [и др.] // Генетика. 2010. Т. 46, N 10. С. 1352-1355.

2. Современные представления о молекулярной генетике и геномике аутизма / С.Г. Ворсанова [и др.] // Фундаментальные Исследования. 2013. N 4. Часть 2. С. 356-367.

3. Цитогенетические, молекулярно-цитогенетические и клинико-генеалогические исследования матерей детей с аутизмом: поиск семейных генетических маркеров аутистических расстройств / С.Г. Ворсанова [и др.] // Журнал Неврологии и Психиатрии им. С.С. Корсакова. 2009. Т. 109, N 6. С. 54-64.

4. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Геномные и хромосомные болезни центральной нервной системы: молекулярные и цитогенетические аспекты. М.: Медпрактика-М, 2014. 384 с.

5. Aguilera A., García-Muse T. Causes of genome instability // Annual Reviewers of Genetics. 2013. Vol. 47. P. 1-32.

6. Astolfi P.A., Salamini F., Sgaramella V. Are we Genomic Mosaics? Variations of the Genome of Somatic Cells can Contribute to Diversify our Phenotypes // Current Genomics. 2010. Vol. 11(6). P. 379-386.

7. Bjerregaard V.A., Özer Ö., Hickson I.D., Liu Y. The Detection and Analysis of Chromosome

Fragile Sites // Methods in Molecular Biology. 2018. Vol. 1672. P. 471-482.

8. Bonassi S., Au W.W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction // Mutation Research. 2002. Vol. 511(1). P. 73-86.

9. Coppedè F., Migliore L. DNA damage in neurodegenerative diseases // Mutation Research. 2015. Vol. 776. P. 84-97.

10. Debatisse M., Le Tallec B., Letessier A., Dutrillaux B., Brison O. Common fragile sites: mechanisms of instability revisited // Trends in Genetics. 2012. Vol. 28(1). P. 22-32.

11. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer // Drug Discovery Today. 2002. Vol. 7(22). P. 1128-1137.

12. Heng H.H., Liu G., Stevens J.B., Abdallah B.Y., Horne S.D., Ye K.J., Bremer S.W., Chowdhury S.K., Ye C.J. Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities // Cytogenetic and Genome Research. 2013. Vol. 139(3). P. 144-157.

13. Heng H.H., Regan S.M., Liu G., Ye C.J. Why it is crucial to analyze non clonal chromosome aberrations or NCCAs? // Molecular Cytogenetics. 2016. Vol. 9. Article. 15. 12 p.

14. Horne S.D., Chowdhury S.K., Heng H.H. Stress, genomic adaptation, and the evolutionary trade-off // Frontiers in Genetics. 2014. Vol. 5. Article. 92. 6 p.

15. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Kolotii A.D., Yurov Y.B. Increased chromosome instability dramatically disrupts neural genome integrity and mediates cerebellar degeneration in the ataxia-telangiectasia brain // Human Molecular Genetics. 2009. Vol. 18(14). P. 2656-2669.

16. Khan Z., Pandey M., Samartha R.M. Role of cytogenetic biomarkers in management of chronic kidney disease patients: A review // International Journal of Health Sciences (Qassim). 2016. Vol. 10(4). P. 576-589.

17. Liu G., Stevens J.B, Horne S.D., Abdallah B.Y., Ye K.J., Bremer S.W., Ye C.J., Chen D.J., Heng H.H. Genome chaos: survival strategy during crisis // Cell Cycle. 2014. Vol. 13(4). P. 528-537.

18. Liu G., Ye C.J., Chowdhury S.K., Abdallah B.Y., Horne S.D., Nichols D., Heng H.H. Detecting chromosome condensation defects in gulf war illness patients // Current Genomics. 2018. Vol. 19(3). P. 200-206.

19. Mandrioli D., Belpoggi F., Silbergeld E.K., Perry M.J. Aneuploidy: a common and early evidence-based biomarker for carcinogens and reproductive toxicants // Environmental Health. 2016. Vol. 15(1). Article. 97. 10 p.

20. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations // NeuroRx. 2004. Vol. 1(2). P. 182-188.

21. Peterson S.E., Loring J.F. Genomic instability in pluripotent stem cells: implications for clinical applications // The Journal of Biological Chemistry. 2014. Vol. 289(8). P. 4578-4584.

22. Smith C.L., Bolton A., Nguyen G. Genomic and epigenomic instability, fragile sites, schizophrenia and autism // Current Genomics. 2010. Vol. 11(6). P. 447-469.

23. Vijg J. Somatic mutations, genome mosaicism, cancer and aging // Current Opinion in Genetics & Development. 2014. Vol. 26. P. 141-149.

24. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Soloviev I.V., Iourov I.Y. Molecular cytogenetic diagnosis and somatic genome variations // Current Genomics. 2010. Vol. 11(6). P. 440-446.

25. Waye M.M.Y., Cheng H.Y. Genetics and epigenetics of autism: A Review // Psychiatry and Clinical Neurosciences. 2018. Vol. 72(4). P. 228-244.

26. Ye C.J., Regan S., Liu G., Alemara S., Heng H.H. Understanding aneuploidy in cancer through the lens of system inheritance, fuzzy inheritance and emergence of new genome systems // Molecular Cytogenetics. 2018. Vol. 11. Article. 31. 13 p.

References

1. Yurov YB, Vorsanova SG, Solov'ev IV, Iourov IYu. Instability of chromosomes in human nerve cells (normal and with neuromental diseases). Russian Journal of Genetics. 2010;46(10):1194-1196.

2. Vorsanova SG, Yurov YB, Silvanovich AP, Demidova IA, Iourov IYu. Sovremennyye predstavleniya o molekulyarnoy genetike i genomike autizma [Modern ideas about molecular genetics and genomics of autism]. Fundamental Research. 2013;4-2:356-367. Russian.

3. Vorsanova SG, Voinova VYu, Iourov IYu, Kurinnaya OS, Demidova IA, Yurov YB. Tsitogeneticheskiye, molekulyarno-tsitogeneticheskiye i kliniko-genealogicheskiye issledovaniya materey detey s autizmom: poisk semeynykh geneticheskikh markerov autisticheskikh rasstroystv [Cytogenetic, molecular cytogenetic and clinical genealogy studies of mothers of children with autism: the search for family genetic markers of autistic disorders]. Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova. 2009;109(6):54-64. Russian.

4. Iourov IYu, Vorsanova SG, Yurov YB. Genomnyye i khromosomnyye bolezni tsentral'noy nervnoy sistemy: molekulyarnyye i tsitogeneticheskiye aspekty [Genomic and chromosomal diseas-

es of the central nervous system: molecular and cytogenetic aspects]. Moscow: Medpraktika-M; 2014. 384 p. Russian.

5. Aguilera A, García-Muse T. Causes of genome instability. Annual Reviewers of Genetics. 2013;47:1-32.

6. Astolfi PA, Salamini F, Sgaramella V. Are we Genomic Mosaics? Variations of the Genome of Somatic Cells can Contribute to Diversify our Phenotypes. Current Genomics. 2010;11(6):379-386.

7. Bjerregaard VA, Özer Ö, Hickson ID, Liu Y. The Detection and Analysis of Chromosome Fragile Sites. Methods in Molecular Biology. 2018;1672:471-482.

8. Bonassi S, Au WW. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. Mutation Research. 2002;511(1):73-86.

9. Coppedè F, Migliore L. DNA damage in neurodegenerative diseases. Mutation Research. 2015;776:84-97.

10. Debatisse M, Le Tallec B, Letessier A, Dutrillaux B, Brison O. Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. Trends in Genetics. 2012;28(1):22-32.

11. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. Drug Discovery Today. 2002;7(22):1128-1137.

12. Heng HH, Liu G, Stevens JB, Abdallah BY, Horne SD, Ye KJ, Bremer SW, Chowdhury SK, Ye CJ. Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. Cytogenetic and Genome Research. 2013;139(3):144-157.

13. Heng HH, Regan SM, Liu G, Ye CJ. Why it is crucial to analyze non clonal chromosome aberrations or NCCAs? Molecular Cytogenetics. 2016;9. Article 15. 12 p.

14. Horne SD, Chowdhury SK, Heng HH. Stress, genomic adaptation, and the evolutionary trade-off. Frontiers in Genetics. 2014; 5. Article 92. 6 p.

15. Iourov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Kolotii AD, Yurov YB. Increased chromosome instability dramatically disrupts neural genome integrity and mediates cerebellar degeneration in the ataxia-telangiectasia brain. Human Molecular Genetics. 2009;18(14):2656-2669.

16. Khan Z, Pandey M, Samartha RM. Role of cytogenetic biomarkers in management of chronic kidney disease patients: A review. International Journal of Health Sciences (Qassim). 2016;10(4):576-589.

17. Liu G, Stevens JB, Horne SD, Abdallah BY, Ye KJ, Bremer SW, Ye CJ, Chen DJ, Heng HH. Genome chaos: survival strategy during crisis. Cell Cycle. 2014;13(4):528-537.

18. Liu G, Ye CJ, Chowdhury SK, Abdallah BY, Horne SD, Nichols D, Heng HH. Detecting chromosome condensation defects in gulf war illness patients. Current Genomics. 2018;19(3): 200-206.

19. Mandrioli D, Belpoggi F, Silbergeld EK, Perry MJ. Aneuploidy: a common and early evidence-based biomarker for carcinogens and reproductive toxicants. Environmental Health. 2016;15(1). Article 97. 10 p.

20. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. NeuroRx. 2004;1(2):182-188.

21. Peterson SE, Loring JF. Genomic instability in pluripotent stem cells: implications for clinical applications. The Journal of Biological Chemistry. 2014;289(8):4578-4584.

22. Smith CL, Bolton A, Nguyen G. Genomic and epigenomic instability, fragile sites, schizophrenia and autism. Current Genomics. 2010;11(6):447-469.

23. Vijg J. Somatic mutations, genome mosaicism, cancer and aging. Current Opinion in Genetics & Development. 2014;26:141-149.

24. Vorsanova SG, Yurov YB, Soloviev IV, Iourov IY. Molecular cytogenetic diagnosis and somatic genome variations. Current Genomics. 2010;11(6):440-446.

25. Waye MMY, Cheng HY. Genetics and epigenetics of autism: A Review. Psychiatry and Clinical Neurosciences. 2018;72(4):228-244.

26. Ye CJ, Regan S, Liu G, Alemara S, Heng HH. Understanding aneuploidy in cancer through the lens of system inheritance, fuzzy inheritance and emergence of new genome systems. Molecular Cytogenetics. 2018;11. Article 31. 13 p.

Ворсанова Светлана Григорьевна, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕ, заведующая лабораторией.

Юров Юрий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕ, заведующий лабораторией.

Демидова Ирина Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник.

Колотий Алексей Дмитриевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник.

Куринная Оксана Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник.

Кравец Виктор Сергеевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник.

Юров Иван Юрьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией.

Vorsanova Svetlana Grigorievna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Scientist of Russia, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Head of the Laboratory.
Yurov Yuri Borisovich, Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Scientist of Russia, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Head of the Laboratory.
Demidova Irina Aleksandrovna, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher.
Kolotiy Alexey Dmitrievich, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher.
Kurinnaya Oksana Sergeevna, Candidate of Biological Sciences, Researcher.
Kravets Victor Sergeevich, Candidate of Biological Sciences, Researcher.
Iourov Ivan Yurievich, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Russian Academy of Sci-ences, Head of Laboratory.

Статья поступила в редакцию 12 марта 2018 г.

УДК 575.174.015.3:616.72-002.772 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-3**

Данилко К.В.[1], Назарова Л.Ш.[1], Хабибуллина Р.Р.[1], Хайруллина Р.Р.[1], Слесаренко Я.С.[1], Шамиева М.В.[2], Муталова Э.Г.[1], Викторова Т.В.[1,3]

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *IL10, CTLA4* И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К РЕВМАТОИДНОМУ АРТРИТУ

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет», 450008, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, 3
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», 450008, Россия, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3А
[3]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук 450054, Россия, г. Уфа, просп. Октября, 71
E-mail: kse-danilko@yandex.ru

Аннотация. *Актуальность.* Ревматоидный артрит (РА) – это системное аутоиммунное заболевание, сопровождающееся хроническим воспалением синовиальной оболочки суставов и широким спектром внесуставных проявлений. Проблема ранней диагностики и выявления новых маркеров РА остается на сегодняшний день весьма актуальной. *Цель исследования.* Целью данной работы был поиск ассоциаций вариантов полиморфных локусов -592C>A гена *IL10* и +6230G>A гена *CTLA4* с развитием РА у жителей Республики Башкортостан. *Материалы и методы.* В исследование было включено 204 пациента с РА и 324 индивида контрольной группы из Республики Башкортостан. Изучение полиморфных локусов генов *IL10* и *CTLA4* проводилось методом ПЦР в реальном времени, а статистическая обработка результатов – с использованием критерия $\chi 2$ и оценкой отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI). *Результаты.* При исследовании полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* было установлено, что генотип CC служит маркером повышенного риска развития РА (p=0.042, OR=1.467, 95% CI 1.015-2.122), в то время как генотип CA ассоциирован со снижением риска заболевания (p=0.017, OR=0.634, 95% CI 0.436-0.922). После стратификации согласно этнической принадлежности обе ассоциации оказались характерны для представителей башкирского этноса (CC: p=0.036, OR=3.221, 95%CI 1.070-9.879 и CA: p=0.008, OR=0.224, 95%CI 0.071-0.692). Различия между пациентами с РА и индивидами контрольной группы русской этнической принадлежности достигли уровня статистической значимости только по генотипу CA (p=0.027, OR=0.470, 95%CI 0.239-0.923). У татар распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* в группе пациентов с РА и в контрольной группе оказалось статистически неотличимым (p>0.8). Для вариантов полиморфного локуса +6230G>A гена *CTLA4* ассоциаций с развитием РА не наблюдалось. *Заключение.* Таким образом, в данной работе выявлена взаимосвязь вариантов полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* с развитием РА у жителей Республики Башкортостан (с учетом этнических особенностей). Доказательств наличия существенного вклада полиморфизма +6230G>A гена *CTLA4* в формирование предрасположенности к РА не установлено.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; полиморфный локус; ген; *IL10*; *CTLA4;* ассоциация
Информация для цитирования: Полиморфизм генов *IL10, CTLA4* и предрасположенность к ревматоидному артриту / К.В. Данилко [и др.] // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С. 18-25. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-3

K.V. Danilko[1], L.Sh. Nazarova[1], R.R. Khabibullina[1], R.R. Khairullina[1], Ya.S. Slesarenko[1], M.V. Shamieva[2], E.G. Mutalova[1], T.V. Viktorova[1,3]

POLYMORPHISM OF *IL10, CTLA4* GENES AND PREDISPOSITION TO RHEUMATOID ARTHRITIS

[1]Bashkir State Medical University,
3 Lenin St., Ufa, Russia, 450008
[2]Bashkir State Pedagogical University n. a. M. Akmulla,
3A Oktyabrskoy Revolyutsii St., Ufa, Russia, 450008
[3]RAS Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre,
71 Oktyabrya Ave., Ufa, Russia, 450054
E-mail: kse-danilko@yandex.ru

Abstract. *Background.* Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease, accompanied by chronic inflammation of the joints synovial membrane and a wide spectrum of extra-articular manifestations. Today, the problem of early diagnosis and detection of new RA markers remains very relevant. *The aim of the study*. The aim of this work was to search for associations of variants of the *IL10* gene -592C>A and of the *CTLA4* gene +6230G>A polymorphic loci with the RA development in the Republic of Bashkortostan population. *Materials and methods.* The study included 204 RA patients and 324 controls from the Republic of Bashkortostan (Russian Federation). The molecular genetic analysis of the *IL10* gene -592C>A (rs1800872) and of the *CTLA4* gene +6230G>A (CT60 G>A, rs3087243) polymorphic loci was performed using the real-time polymerase chain reaction. Statistical analysis of the data was carried out using the chi-square (χ^2) test with the Yates correction. The differences were considered statistically significant at $p<0.05$. For the identified markers, the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI) was calculated. *Results.* When studying the *IL10* gene -592C>A polymorphic locus, it was established that the CC genotype is associated with an increased risk of the RA development (p=0.042, OR=1.467, 95% CI 1.015-2.122), while the CA genotype – with a reduced risk of the disease (p=0.017, OR=0.634, 95% CI 0.436-0.922). After stratification according to ethnicity, both associations were characteristic to the Bashkirs (CC: p=0.036, OR=3.221, 95% CI 1.070-9.879 and CA: p=0.008, OR=0.224, 95% CI 0.071-0.692). The differences between Russian RA patients and controls reached a statistical significance level only for the CA genotype (p=0.027, OR=0.470, 95% CI 0.239-0.923). The frequency distribution of the *IL10* gene -592C>A polymorphic locus genotypes and alleles between the Tatar RA patients and controls was statistically indistinguishable (p>0.8). Associations with the RA development for the *CTLA4* gene +6230G>A polymorphic locus variants were not observed. *Conclusion.* Thus, in this paper, the relationship between the *IL10* gene -592C>A polymorphic locus variants with the RA development in the Republic of Bashkortostan population was revealed (taking into account ethnic fea-

tures). The evidence of any significant contribution of the *CTLA4* gene +6230G>A polymorphism to the RA predisposition was not established.
Keywords: rheumatoid arthritis; polymorphic locus; gene; *IL10*; *CTLA4*; association.
Information for citation: Danilko KV, Nazarova LSh, Khabibullina RR, et al. Po-limorfizm genov *IL10, CTLA4* i predraspolozhennost' k revmatoidnomu artritu [Poly-morphism of *IL10, CTLA4* genes and predisposition to rheumatoid arthritis]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):18-25. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-3

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – это системное аутоиммунное заболевание, сопровождающееся хроническим воспалением синовиальной оболочки суставов и широким спектром внесуставных проявлений [4, 7, 20, 23]. Распространенность данной патологии в популяции составляет 0.5-1.5% [10].

Диагностика РА на ранних этапах нередко затруднена, поскольку соответствующие симптомы могут наблюдаться и при других ревматических заболеваниях. Примерно у половины пациентов базисные противовоспалительные препараты недостаточно эффективно контролируют клинические проявления заболевания и прогрессирование разрушения суставов, что у большинства больных через 10-15 лет приводит к стойкой потере трудоспособности [3]. Известно, что до 50% больных РА становятся инвалидами уже в первые 5 лет от начала болезни [5]. В связи с вышесказанным проблема ранней диагностики и лечения РА остается весьма актуальной, так же, как и поиск новых эффективных биомаркеров заболевания [6, 8].

Согласно современным представлениям, РА относится к группе мультифакторных заболеваний, и в его возникновении предполагается участие как факторов внешней среды (инфекционных агентов, курения и других), так и наследственной предрасположенности [3, 6, 10]. В основе патогенеза РА лежат нарушения Т- и В-клеточного иммунного реагирования, приводящие к усилению продукции провоспалительных цитокинов и аутоантител, индуцирующих воспаление, а также разрушение суставных и других тканей организма [9].

Интерлейкин 10 (IL10) является одним из основных противовоспалительных цитокинов и играет важную роль в регуляции иммунного ответа. Предполагается, что полиморфные варианты гена *IL10*, в том числе, обусловленные заменой -592C>A (rs1800872) в промоторной области гена, могут влиять на риск развития некоторых аутоиммунных заболеваний [1, 12, 24].

Согласно последним данным, центральную роль в развитии клинико-иммунологических проявлений РА играет патологическая активация Т-клеток [7]. Цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA4) – это поверхностный антиген Т-лимфоцитов, участвующий в регуляции активности соответствующих клеток [11, 18, 21]. В гене *CTLA4* описано несколько полиморфных локусов, в том числе однонуклеотидная замена G>A в положении +6230 (CT60 G>A, rs3087243). Данный полиморфный локус, предположительно, связан с развитием целого ряда аутоиммунных заболеваний, в том числе сахарного диабета 1 типа, аутоиммунного тиреоидита, болезни Грейвса, системной красной волчанки и РА [2, 13, 14].

Целью данной работы был поиск ассоциаций вариантов полиморфных локусов -592C>A гена *IL10* и +6230G>A гена *CTLA4* с развитием РА у жителей Республики Башкортостан.

Материалы и методы. Исследование было выполнено по типу случай-контроль и одобрено экспертным советом по биомедицинской этике Башкирского государственного медицинского университета. В основную группу было включено 204 больных с РА, проходивших обследование и лечение в Городской клинической больнице № 13 (г. Уфа) в 2013-2014 гг., а в контрольную группу – 324 индивида без аутоиммунных заболеваний. Все участники исследования

были жителями Республики Башкортостан (Российская Федерация) и подписали добровольное информированное согласие.

Образцы ДНК были выделены из лимфоцитов периферической венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [22]. Молекулярно-генетический анализ полиморфных локусов -592C>A гена *IL10* и +6230G>A гена *CTLA4* был выполнен с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (праймеры и зонды производства ООО «ДНК-Синтез», Российская Федерация).

Статистический анализ данных проводился в программах Statistica v. 10.0 и Microsoft Excel с применением критерия хи-квадрат (χ^2) с поправкой Йейтса. Различия считались статистически значимыми при $p<0.05$. Для выявленных маркеров рассчитывался показатель отношения шансов (OR) с указанием 95% доверительного интервала (95% CI).

Результаты исследования. Анализ полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* показал, что генотип CA у пациентов с РА встречался статистически значимо реже, чем в контроле (p=0.017, OR=0.634, 95% CI 0.436-0.922) (таблица 1). Напротив, доля генотипа CC в группе больных оказалась существенно повышена (p=0.042, OR=1.467, 95% CI 1.015-2.122).

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов -592C>A гена *IL10* и +6230G>A гена *CTLA4* у пациентов с РА и индивидов контрольной группы

Table 1

The frequency distribution of the *IL10* gene -592C>A and *CTLA4* gene +6230G>A polymorphic loci genotypes and alleles in RA patients and controls

Локус		-592C>A гена *IL10*					+6230G>A гена *CTLA4*				
Варианты		AA	CA	CC	A	C	AA	AG	GG	A	G
Пациенты с РА	Абс.	22	76	104	120	284	16	88	100	120	288
	%	10.89	37.62	51.49	29.70	70.30	7.84	43.14	49.02	29.41	70,59
Контроль	Абс.	30	158	136	218	430	34	129	160	197	449
	%	9.26	48.77	41.98	33.64	66.36	10.53	39.94	49.54	30.50	69,50
χ^2		0,212	5.812	4.161	1.595	1.595	0.760	0.405	0.001	0.093	0.093
p		0,646	0.017*	0.042*	0.207	0.207	0.384	0.525	0.980	0.761	0.761
OR		1,198	0.634	1.467	0.834	1.200	0.724	1.141	0.980	0.950	1.053
95% CI		0,645-2,221	0.436-0.922	1.015-2.122	0.632-1.100	0.910-1.584	0.371-1.400	0.787-1.654	0.680-1.413	0.718-1.257	0.796-1.394

Примечание: здесь и далее статистически значимые различия между пациентами с РА и индивидами контрольной группы отмечены знаком *

Далее был выполнен сходный анализ с учетом этнической принадлежности индивидов. Обе ассоциации, выявленные в общей выборке (по генотипам CA и CC полиморфного локуса -592C>A гена *IL10*), оказались характерны для башкир (CA: p=0.008, OR=0.224, 95% CI 0.071-0.692 и CC: p=0.036, OR=3.221, 95% CI 1.070-9.879) (таблица 2). Сходные закономерности были установлены также для представителей русского этноса, однако только по генотипу CA различия между пациентами с РА и контролем достигли уровня статистической значимости (p=0.027, OR=0.470, 95% CI 0.239-0.923), а по генотипу CC наблюдалась лишь тенденция к наличию ассоциации (p=0.060). В то же время у татар распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* в группе пациентов с РА и в контрольной группе оказалось статистически неотличимым (p>0.8).

При исследовании полиморфного локуса +6230G>A гена *CTLA4* предикторов развития РА выявлено не было, в том числе при анализе с учетом этнической принадлежности индивидов (таблицы 1, 2).

Таблица 2

Распределение частот генотипов полиморфных локусов -592C>A гена *IL10* и +6230G>A гена *CTLA4* у пациентов с РА и индивидов контрольной группы в зависимости от этнической принадлежности

Table 2

The frequency distribution of the *IL10* gene -592C>A and *CTLA4* gene +6230G>A polymorphic loci genotypes in RA patients and controls depending on ethnicity

Локус			-592C>A гена *IL10*			+6230G>A гена *CTLA4*		
Генотипы			AA	CA	CC	AA	AG	GG
Русские	Пациенты с РА	абс. (%)	5 (6.25)	30 (37.50)*	45 (56.25)	7 (8.75)	37 (46.25)	36 (45.00)
	Контроль	абс. (%)	3 (3.66)	46 (56.10)	33 (40.24)	9 (10.71)	35 (41.67)	40 (47.62)
Башкиры	Пациенты с РА	абс. (%)	6 (20.00)	8 (26.67)*	16 (53.33)*	2 (6.25)	15 (46.88)	15 (46.88)
	Контроль	абс. (%)	5 (11.90)	26 (61.90)	11 (26.19)	4 (10.00)	14 (35.00)	22 (55.00)
Татары	Пациенты с РА	абс. (%)	10 (12.82)	32 (41.03)	36 (46.15)	6 (7.69)	30 (38.46)	42 (53.85)
	Контроль	абс. (%)	22 (11.00)	86 (43.00)	92 (46.00)	21 (10.55)	80 (40.20)	98 (49.25)

Обсуждение. В нашем исследовании было установлено, что генотип CC полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* ассоциирован с повышением риска развития РА, в то время как генотип CA – со снижением риска заболевания. Выявлены также некоторые этнические особенности, в частности, статистически значимые различия по генотипу CC между пациентами с РА и индивидами контрольной группы были обнаружены только у башкир, а у татар ни по одному из вариантов данного полиморфного локуса ассоциаций не наблюдалось. Следует отметить, что в исследовании Гусевой И.А. с соавт. (2016), выполненном на выборке индивидов из России, подавляющее большинство которых проживали в Москве и Московской области и идентифицировали себя как русские, не было обнаружено взаимосвязи вариантов полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* с развитием РА [6]. Тем не менее в восточно-китайской популяции Хань и в итальянской популяции генотип CC существенно чаще встречался у пациентов с РА (в сравнении с контролем), и это в целом согласуется с результатами настоящего исследования [12, 24].

Для вариантов полиморфного локуса +6230G>A гена *CTLA4* ассоциаций с развитием РА в нашей работе не наблюдалось, что согласуется с данными Barton A. et al. (2004) (в британской популяции) и Orozco G. et al. (2004) (в испанской популяции) [15, 17]. Тем не менее в нескольких работах на выборках большего объема, в том числе при проведении мета-анализа, была показана слабая ассоциация минорного аллеля A со снижением риска развития РА у индивидов европейского происхождения [14, 16, 19].

Полученные данные позволяют рассматривать полиморфизм гена *IL10* в положении -592 его промоторной области как один из факторов, влияющих на предрасположенность к развитию РА. Однако для подтверждения результатов требуется проведение исследований на независимых когортах.

Заключение. Таким образом, в данной работе выявлена взаимосвязь вариантов полиморфного локуса -592C>A гена *IL10* с развитием РА у жителей Республики Башкортостан (с учетом этнических особенностей). Доказательств наличия существенного вклада полиморфизма +6230G>A гена *CTLA4* в формирование предрасположенности к РА не установлено.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Ассоциация полиморфного локуса гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ювенильного идиопатического артрита / Л.Ш. Назарова [и др.] // Вестник РГМУ. 2015. N 4. С. 28-31.

2. Ассоциация полиморфного маркера G6230A гена *CTLA4* с сахарным диабетом 1-го типа у больных русского происхождения / О.И. Копылова [и др.] // Проблемы Эндокринологии. 2012. Т. 58, N 4. С. 14-17.

3. Балабанова Р.М. Ревматоидный артрит: диагностика, лечение // Врач. 2012. N 5. С. 6-9.

4. Гончар Г.А. Гендерные особенности течения ревматоидного артрита // Боль. Суставы. Позвоночник. 2013. N 2(10). С. 75-79.

5. Зинчук И.Ю., Амирджанова В.Н. Социальное бремя ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология. 2014. Т. 52, N 3. С. 331-335.

6. Исследование полиморфизмов генов-кандидатов иммунного ответа как маркеров риска развития ревматоидного артрита и продукции аутоантител / И.А. Гусева [и др.] // Научно-практическая ревматология. 2016. Т. 54, N 1. С. 21-30.

7. Насонов Е.Л. Абатацепт при ревматоидном артрите: новая форма, новые механизмы, новые возможности // Научно-практическая ревматология. 2015. Т. 53, N 5. С. 522-541.

8. Насонов Е.Л. Применение ингибиторов фактора некроза опухоли при ревматоидном артрите: место этанерцепта // Научно-практическая ревматология. 2008. Т. 46, N 5s. С. 1-20.

9. Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е. Применение генно-инженерных биологических препаратов для лечения ревматоидного артрита: общая характеристика (лекция) // Научно-практическая ревматология. 2013. Т. 51, N 2. С. 163-169.

10. Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е., Балабанова Р.М. Ревматоидный артрит // Ревматология. Национальное руководство / Под. ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 290-331.

11. Полиморфизм гена *CTLA4* (49A/G) в русской популяции у больных сахарным диабетом 1 типа и здоровых доноров / Д.Д. Абрамов [и др.] // Сахарный диабет. 2007. Т. 10, N 3. С. 2-3.

12. Association between polymorphisms of interleukin 10 with inflammatory biomarkers in East Chinese Han patients with rheumatoid arthritis / L. Ge [et al.] // Joint Bone Spine. 2015. Vol. 82(3). P. 18-186.

13. Association of the *CTLA4* gene CT60/rs3087243 single-nucleotide polymorphisms with Graves' disease / W. Fang [et al.] // Biomedical Reports. 2015. Vol. 3(5). P. 691-696.

14. Confirmation of *STAT4*, *IL2/IL21*, and *CTLA4* polymorphisms in rheumatoid arthritis / N.A. Daha [et al.] // Arthritis & Rheumatism. 2009. Vol. 60(5). P. 1255-1260.

15. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-CT60 polymorphism in rheumatoid arthritis / G. Orozco [et al.] // Tissue Antigens. 2004. Vol. 64(6). P. 667-670.

16. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci / E.A. Stahl [et al.] // Nature Genetics. 2010. Vol. 42(6). P. 508-514.

17. Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis / A. Barton [et al.] // Arthritis & Rheumatism. 2004. Vol. 50(3). P. 748-752.

18. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains / P. Dariavach [et al.] // European Journal of Immunology. 1988. Vol. 18(12). P. 1901-1905.

19. Investigation of potential non-HLA rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers / D. Plant [et al.] // Annals of the Rheumatic Diseases. 2010. Vol. 69(8). P. 1548-1553.

20. Lipsky P.E. Rheumatoid Arthritis // Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th ed. / Ed. E. Braunwald, A.S. Fauci, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson. New York: McGraw-Hill, 2001. P. 1928-1937.

21. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4 / P. Waterhouse [et al.] // Science. 1995. Vol. 270(5238). P. 985-988.

22. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods in Molecular Biology. 1984. Vol. 2. P. 31-34.

23. Multiple exta-articular manifestations are associated with poor survival in patients with rheumatoid arthritis / C. Turesson [et al.] // Annals of the Rheumatic Diseases. 2006. Vol. 65(11). P. 1533-1534.

24. Polymorphisms in STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 and MIR146A genes are asso-

ciated differently with prognostic factors in Italian patients affected by rheumatoid arthritis / C. Ciccacci [et al.] // Clinical and Experimental Immunology. 2016. Vol. 186(2). P. 157-163.

References

1. Nazarova LSh, Danilko KV, Malievsky VA, Viktorova TV. Assotsiatsiya polimorfnogo lokusa gena *IL10* s razvitiyem persistiruyushchego oligoartikulyarnogo varianta yuvenil'nogo idiopaticheskogo artrita [Association of the *IL10* gene polymorphism with the development of persistent oligoarticular juvenile idiopathic arthritis]. Bulletin of RSMU. 2015;(4):28-31. Russian.

2. Kopylova OI, Kuraeva TL, Lavrikova EIu, et al. Assotsiatsiya polimorfnogo markera G6230A gena *CTLA4* s sakharnym diabetom 1-go tipa u bol'nykh russkogo proiskhozhdeniya [Association of the polymorphous marker G6230A of the *CTLA4* gene with type 1 diabetes mellitus in the patients of Russian descent]. Problems of endocrinology. 2012;58(4):14-17. Russian.

3. Balabanova RM. Revmatoidnyy artrit: diagnostika, lecheniye [Rheumatoid arthritis: diagnosis, treatment]. Vrach. 2012;(5):6-9. Russian.

4. Gonchar GA. Gendernyye osobennosti techeniya revmatoidnogo artrita [Gender peculiarities of the rheumatoid arthritis course]. Pain. Joints. Spine. 2013;(2(10)):75-79. Russian.

5. Zinchuk IY, Amirdzhanova VN. Sotsial'noye bremya revmatoidnogo artrita [Social burden of rheumatoid arthritis]. Rheumatology Science and Practice. 2014;52(3):331-335. Russian.

6. Guseva IA, Demidova NV, Soroka NE, et al. Issledovaniye polimorfizmov genov-kandidatov immunnogo otveta kak markerov riska razvitiya revmatoidnogo artrita i produktsii autoantitel [Investigation of candidate gene polymorphisms in an immune response as markers for the risk of developing rheumatoid arthritis and producing autoantibodies]. Rheumatology Science and Practice. 2016;54(1):21-30. Russian.

7. Nasonov EL. Abatatsept pri revmatoidnom artrite: novaya forma, novyye mekhanizmy, novyye vozmozhnosti [Abatacept for rheumatoid arthritis: a novel formulation, new mechanisms, new possibilities]. Rheumatology Science and Practice. 2015;53(5):522-541. Russian.

8. Nasonov EL. Primenenie ingibitorov faktora nekroza opukholi pri revmatoidnom artrite: mesto etanertsepta [The use of tumor necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis: the place of etanercept]. Rheumatology Science and Practice. 2008;46(5s):1-20. Russian.

9. Nasonov EL, Karateev DE. Primeneniye genno-inzhenernykh biologicheskikh preparatov dlya lecheniya revmatoidnogo artrita: obshchaya kharakteristika (lektsiya) [The use of genetically engineered biological agents for the treatment of rheumatoid arthritis: general characteristics (a lecture)]. Rheumatology Science and Practice. 2013;51(2):163-169. Russian.

10. Nasonov EL, Karateev DE, Balabanova RM. Revmatoidnyy artrit [Rheumatoid arthritis]. In: Nasonov EL, Nasonova VA, editors. Revmatologiya. Natsional'noe rukovodstvo [Rheumatology. National guidelines]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. P. 290-331. Russian.

11. Abramov DD, Dedov II, Trofimov DY, et al. Polimorfizm gena *CTLA4* (49A/G) v russkoy populyatsii u bol'nykh sakharnym diabetom 1 tipa i zdorovykh donorov [Polymorphism of the *CTLA4* gene (49A/G) in the Russian population in patients with type 1 diabetes mellitus and healthy donors]. Diabetes mellitus. 2007;10(3):2-3. Russian.

12. Ge L, Huang Y, Zhang H, et al. Association between polymorphisms of interleukin 10 with inflammatory biomarkers in East Chinese Han patients with rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine. 2015 May;82(3):182-186.

13. Fang W, Zhang Z, Zhang J, et al. Association of the *CTLA4* gene CT60/rs3087243 single-nucleotide polymorphisms with Graves' disease. Biomed Rep. 2015 Sep;3(5):691-696.

14. Daha NA, Kurreeman FA, Marques RB, et al. Confirmation of *STAT4*, *IL2/IL21*, and *CTLA4* polymorphisms in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2009 May;60(5):1255-1260.

15. Orozco G, Torres B, Núñez-Roldán A, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-CT60 polymorphism in rheumatoid arthritis. Tissue Antigens. 2004 Dec;64(6):667-670.

16. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. Nat Genet. 2010 Jun;42(6):508-514.

17. Barton A, Jury F, Eyre S, et al. Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2004 Mar;50(3):748-752.

18. Dariavach P, Mattéi MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. Eur J Immunol. 1988 Dec;18(12):1901-1905.

19. Plant D, Flynn E, Mbarek H, et al. Investigation of potential non-HLA rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers. Ann Rheum Dis. 2010 Aug;69(8):1548-1553.

20. Lipsky PE. Rheumatoid Arthritis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al., editors. Harrison's principles of internal medicine. 15th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1928-1937.

21. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science. 1995 Nov 10;270(5238):985-988.

22. Mathew CG. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. Methods Mol Biol. 1984;2:31-34.

23. Turesson C, McClelland RL, Christianson TJH, Matteson EL. Multiple extra-articular manifestations are associated with poor survival in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2006 Nov;65(11):1533-1534.

24. Ciccacci C, Conigliaro P, Perricone C, et al. Polymorphisms in STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 and MIR146A genes are associated differently with prognostic factors in Italian patients affected by rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 2016 Nov;186(2):157-163.

Данилко Ксения Владимировна, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биологии, старший научный сотрудник ЦНИЛ БГМУ.
Назарова Лилия Шамилевна, ассистент кафедры терапии и клинической фармакологии ИДПО БГМУ.
Хабибуллина Роза Рашитовна, ассистент кафедры госпитальной терапии № 1 БГМУ.
Хайруллина Резеда Руслановна, старший лаборант кафедры биологии БГМУ.
Слесаренко Яна Сергеевна, младший научный сотрудник ЦНИЛ БГМУ.
Шамиева Мария Виталиевна, студент БГПУ им. М. Акмуллы.
Муталова Эльвира Газизовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой госпитальной терапии № 1 БГМУ.
Викторова Татьяна Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биологии БГМУ, главный научный сотрудник лаборатории физиологической генетики ИБГ УНЦ РАН.

Danilko Ksenia Vladimirovna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biology, Senior Researcher of the Central Research Laboratory, Bashkir State Medical University.
Nazarova Liliia Shamilevna, Assistance Lecturer of the Department of Therapy and Clinical Pharmacology, Institute of Postgraduate Education, Bashkir State Medical University.
Khabibullina Roza Rashitovna, Assistance Lecturer of the Department of Hospital Therapy No. 1, Bashkir State Medical University.
Khairullina Rezeda Ruslanovna, Senior Laboratory Assistant of the Department of Biology, Bashkir State Medical University.
Slesarenko Yana Sergeevna, Researcher of the Central Research Laboratory, Bashkir State Medical University.
Shamieva Mariia Vitalievna, Student, Bashkir State Pedagogical University n. a. M. Akmulla.
Mutalova Elvira Gazizovna, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Hospital Therapy No. 1, Bashkir State Medical University.
Viktorova Tatiana Viktorovna, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Biology, Bashkir State Medical University; Chief Researcher of the Laboratory of Physiological Genetics, IBG USC RAS.

Статья поступила в редакцию 16 марта 2018 г.

УДК 618.14 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-4**

Демакова Н.А.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОК С ГИПЕРПЛАЗИЕЙ И ПОЛИПАМИ ЭНДОМЕТРИЯ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Южный федеральный университет»,
344090, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1
E-mail: demakova05@gmail.com

Аннотация: *Актуальность.* Гиперпластические процессы эндометрия (ГПЭ) являются одними из наиболее частых гинекологических заболеваний, приводят к потере репродуктивной функции и снижению качества жизни женщин, являются основой для формирования злокачественных опухолей эндометрия. *Цель исследования.* Изучить вовлеченность генов-кандидатов цитокинов в формирование гиперплазии и полипов эндометрия. *Материалы и методы.* Выборка для исследования составила 243 женщины с гиперпластическими процессами эндометрия и 249 женщин контрольной группы. В выборки больных и контроля были включены женщины русской национальности. Всем больным с ГПЭ и женщинам контрольной группы методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК проводилось генотипирование девяти молекулярно-генетических маркеров*: -308 G/A TNFα, +252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, +1663G/A TNFR2, -403A/G RANTES, A/G I-TAC (rs4512021), +1931A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801G/A SDF1*. *Результаты.* Установлено, что с развитием гиперплазии эндометрия ассоциированы четырнадцать комбинаций полиморфных маркеров *-308 G/A TNFα, +252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2, +1931 A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801 G/A SDF1*. Данные комбинации увеличивают риск развития ги- Формирование полипов эндометрия ассоциировано с тремя комбинациями генетических вариантов: *+252 AA Ltα* и *+36 AG TNFR1* (OR=2.22); *+252 AA Ltα* и*+36 A TNFR1* (OR=1,71); *+36 A TNFR1* и *-801 GG SDF1* (OR=1,70). *Заключение.* Комбинации полиморфных локусов *308 G/A TNFα, +252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, + 1663A/G TNFR2, +1931 A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801 G/A SDF1* ассоциированы с развитием гиперплазии эндометрия, а сочетания полиморфизмов *+ 252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, -801 G/A SDF1* ассоциированы с развитием полипов эндометрия.

Ключевые слова: гиперпластические процессы эндометрия; полип эндометрия; генетический полиморфизм

Информация для цитирования: Демакова Н.А. Молекулярно-генетические характеристики пациенток с гиперплазией и полипами эндометрия // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С. 26-39. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-4

N.A. Demakova

MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH HYPERPLASIA AND ENDOMETRIC POLYPS

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Southern Federal University", 194/1 Stachki Ave., Rostov-on-Don, Russia, 344090
E-mail: demakova05@gmail.com

Abstract. *Background*. Hyperplastic processes of the endometrium (GGE) are among the most frequent gynecological diseases, leading to a loss of reproductive function and a decrease in the quality of life of women, and are the basis for the formation of malignant endometrial tumors. *The aim of the study*. To study the involvement of cytokine candidate genes in the formation of endometrial hyperplasia and polyps. *Materials and methods.* The sample for the study was 243 women with hyperplastic endometrial processes and 249 women in the control group. Samples of patients and control included women of Russian nationality. All patients with GGE and women of the control group were subjected to genotyping of nine molecular-genetic markers by the polymerase chain reaction of DNA synthesis: *-308 G/A TNFα, +252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, + 1663G/A TNFR2, 403A/G RANTES, A/G I-TAC (rs4512021), + 1931A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801G/A SDF1*. *Results.* It was found that with the development of endometrial hyperplasia, fourteen combinations of polymorphic markers *-308 G/A TNFα, +252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2, +1931 A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801 G/A SDF1*. These combinations increase the risk of developing endometrial hyperplasia (OR = 2.05-4.11). The formation of endometrial polyps is associated with three combinations of genetic variants: *+252 AA Ltα and +36 AG TNFR1 (OR = 2.22); +252 AA Ltα and + 36 A TNFR1 (OR = 1.71); +36 A TNFR1* and *-801 GG SDF1* (OR = 1.70). *Conclusion.* Combinations of polymorphic loci *308 G/A TNFα, +252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2, +1931 A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801 G/A SDF1* are associated with the development of endometrial hyperplasia, and the combinations of the polymorphisms *+252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, -801 G/A SDF1* are associated with the development of endometrial polyps.

Keywords: hyperplastic processes of the endometrium; polyps of the endometrium; genetic polymorphism
Information for citation: Demakova NA. Molekulyarno-geneticheskiye kharakteristiki patsiyentok s giperplaziyey i polipami endometriya [Molecular and genetic characteristics of patients with hyperplasia and endometric polyps]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):26-39. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-4

Введение. Одной из актуальных проблем современной медицины являются гиперпластические процессы эндометрия (ГПЭ), частота которых в структуре гинекологических заболеваний составляет от 15 до 50% [8, 10, 15, 18, 22]. ГПЭ являются причиной не только снижения качества жизни женщины, но и могут привести к потере репродуктивной функции [3, 16, 20, 21]. А в 20-25% случаев ГПЭ являются основой для формирования злокачественных опухолей эндометрия [1, 2, 12].

Большинство работ, посвященных изучению патогенеза ГПЭ, указывают на нарушения гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси с формированием относительной или абсолютной гиперэстрогении, сочетающейся с недостаточностью прогестерона [6]. Однако в последнее время взгляды на патогенез ГПЭ несколько изме-

нились. Работы последних лет доказывают, что в формировании ГПЭ имеют место: гормон-независимая пролиферация [3], воспаление [7, 23], сниженный апоптоз [9, 11], патологический неоангиогенез [10, 17], а также нарушения иммунного статуса в эндометрии [10, 24]. Регуляция данных процессов осуществляется за счет взаимодействия широкого спектра цитокинов: факторов некроза опухолей, хемокинов, факторов роста, интерферонов и др. [4, 13, 23].

Согласно гистологической классификация ВОЗ (1997) выделяют два основных вида гиперпластических процессов эндометрия: полипы эндометрия (ПЭ) и гиперплазия эндометрия (ГЭ). Морфологически полипы эндометрия могут иметь некоторые признаки эндометриальной гиперплазии, но по происхождению они принципиально отличаются от доброкачественной эндометриальной гиперплазии [7].

Цель исследования: изучение вовлеченности генов-кандидатов в формирование гиперплазии и полипов эндометрия с использованием биоинформатического анализа.

Материалы и методы. Осуществлен анализ результатов наблюдений 243 женщин с ГПЭ (с гиперплазией эндометрия (n=69) и с полипами эндометрия (n=174)) и 249 женщин контрольной группы. Женщины с ГПЭ включались в соответствующую группу больных только после подтверждения диагноза, с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования пациенток. В контрольную группу вошли практически здоровые женщин без гинекологических патологий. Всем больным с ГПЭ и женщинам контрольной группы проводилось генотипирование девяти молекулярно-генетических маркеров*: -308 G/A TNFα, +252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, +1663G/A TNFR2, -403A/G RANTES, A/G I-TAC (rs4512021), +1931A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801G/A SDF1.*

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [19]. Анализ исследуемых локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров и зондов.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов «STATISTICA for Windows 6.0» и «Microsoft Excel 2007». Для анализа соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использован критерий x2 [5]. Изучение вклада комбинаций генетических полиморфизмов цитокинов в развитие ГПЭ проводили с помощью программного обеспечения APSampler [14].

Результаты исследования и их обсуждение. В результате проведенного анализа носительства сочетаний аллелей и генотипов исследуемых локусов цитокинов выявлен целый ряд достоверных различий между анализируемыми группами пациенток с ГПЭ и контролем (таблица). В формировании значимых комбинаций генетических вариантов, отличающих пациенток с гиперплазией эндометрия от группы контроля участвуют следующие генетические полиморфизмы: *-308 G/A TNFα, +252 A/G Ltα,+36 A/G TNFR1, +1663A/G TNFR2, +1931 A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801 G/A SDF1* (табл.1). Выявлена наибольшая частота сочетания аллелей *-308 A TNFα,+36 G TNFR1, +1663A TNFR2* и *+1931 A MIP1β* среди пациенток с гиперплазией эндометрия, которая составила 23.33%, тогда как в контрольной группе этот показатель равен 6.90% (p=0.0006, p_{cor} =0.009). Такая комбинация генетических вариантов цитокинов служит фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=4.11, 95%CI 1.88-9.01). Установлено, что у женщин с гиперплазией эндометрия, частота сочетания аллелей *-308 A TNFα, +36G TNFR1* и *+1663 A TNFR2* составила 24.19%, что в 2.84 раза больше по сравнению с группой контроля (8.51%, p=0.0014, p_{cor} =0.011). Это сочетание является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=3.43, 95%CI 1.64-7.19). Такое сочетание генетических вариантов наблюдается у 6.75% больных с полипами эндометрия.

Таблица 1

Распространенность сочетаний некоторых аллелей/генотипов генов цитокинов у больных с ГПЭ в зависимости от их морфологических вариантов (начало)

Table 1

The prevalence of combinations of some alleles / genotypes of cytokine genes in patients with HEP, depending on their morphological variants (beginning)

Полиморфизмы	Сочетания (аллели/ генотипы)	Контрольная группа (n=248)		Больные с ГПЭ (n= 243)						
				с гиперплазией эндометрия (n= 69)			с полипами эндометрия (n= 174)			Различия между больными ГПЭ с гиперплазией эндометрия и с полипами эндометрия $\chi 2$ (p), OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	
-308G/A TNFα (rs 1800629), +36 A/G TNFR1 (rs 767455), +1663A/G TNFR2 (rs	*-308 A TNF α* совместно с *+36 G TNFR1, +1663A TNFR2* и *+1931 A*	16/232	6.90	14/60	23.33	**0.0006 (0.009)** 4.11 (1.88-9.01)	9/161	5.59	0.76 (12.16) 1.25 (0.51-3.16)	12.92 **(0.001)**
-308G/A TNFα (rs 1800629), +36 A/G TNFR1 (rs 767455), +1663A/G TNFR2 (rs 1061624)	*-308 A TNF α* совместно с *+36 G TNFR1* и *+1663A TNFR2*	20/235	8.51	15/62	24.19	**0.0014 (0.011)** 3.43 (1.64-7.19)	11/163	6.75	0.65 (5.20) 0.78 (0.34-1.77)	11.72 **(0.001)**
-308G/A TNFα (rs 1800629), +1663A/G TNFR2 (rs 1061624), +1931A/T MIP1β (rs	*-308 A TNF α* совместно с *+1663A TNFR2, +1931 A MIP1β* и	23/234	9.83	16/62	25.81	**0.0017 (0.027)** 3.19 (1.56-6.51)	12/157	7.64	0.58 (9.28) 0.76 (0.34-1.66)	11.57 **(0.001)**

Полиморфизмы	Сочетания (аллели/ генотипы)	Контрольная группа (n=248)		Больные с ГПЭ (n= 243)						
				с гиперплазией эндометрия (n= 69)			с полипами эндометрия (n= 174)			Различия между больными ГПЭ с гиперплазией эндометрия и с полипами эндометрия χ2 (p), OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	
1719153), -801G/A SDF1 (rs 1801157)	*-801 G SDF1*									
+252A/G Ltα (rs 909253), +36 A/G TNFR1 (rs 767455), +1931A/T MIP1β (rs 1719153)	*+252 G Ltα* совместно с *+36 G TNFR1* и *+1931 A MIP1β*	66/240	27.50	31/65	47.69	**0.0019 (0.015)** 2.40 (1.37-4.22)	50/163	30.68	0.56 (4.48) 1.17 (0.74-1.75)	5.16 (**0.023**)
-308G/A TNFα (rs 1800629), +1663A/G TNFR2 (rs 1061624), -801G/A SDF1 (rs 1801157)	*-308 A TNF α* совместно с *+1663 A TNFR2* и *-801 G SDF1*	28/236	11.86	18/64	28.13	**0.0021 (0.016)** 2.91 (1.48-5.70)	16/170	9.41	0.53 (4.24) 0.77 (0.38-1.54)	11.65 **(0.001)**
-308G/A TNFα (rs 1800629), +252A/G Ltα (rs 909253), +1663A/G TNFR2 (rs 1061624)	*-308 A TNF α* совместно с *+252 G Ltα* и *+1663 A TNFR2*	28/232	11.86	18/64	28.13	**0.0021 (0.016)** 2.91 (1.48-5.70)	16/170	9.41	0.53 (4.24) 0.77 (0.38-1.54)	11.65 **(0.001)**
+252A/G Ltα (rs 909253), +1931A/T MIP1β (rs	*+252 G Ltα* совместно с	53/244	21.72	27/67	40.30	**0.0022 (0.012)**	34/170	20.00	0.76 (4.56) 0.90 (0.54-	9.33 **(0.003)**

Полиморфизмы	Сочетания (аллели/ генотипы)	Контрольная группа (n=248)		Больные с ГПЭ (n= 243)						
				с гиперплазией эндометрия (n= 69)			с полипами эндометрия (n= 174)			Различия между больными ГПЭ с гиперплазией эндометрия и с полипами эндометрия χ2 (p), OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	
1719153)	*+1931 AA MIP1β*					2.43 (1.37-4.32)			1.50)	
-308G/A TNFα (rs 1800629), +1663A/G TNFR2 (rs 1061624), +1931A/T MIP1β (rs 1719153)	*-308 A TNF α* совместно с *+1663A TNFR2* и *+1931 A MIP1β*	24/235	10.21	16/62	25.81	**0.0023 (0.016)** 3.06 (1.51-6.21)	15/167	8.98	0.81 (6.48) 0.87 (0.42-1.79)	9.55 **(0.003)**
-308G/A TNFα (rs 1800629), +1663A/G TNFR2 (rs 1061624)	*-308 A TNF α* совместно с *+1663A TNFR2*	29/238	12.19	18/64	28.13	**0.0026 (0.010)** 2.82 (1.44-5.51)	17/170	10.00	0.60 (2.40) 0.80 (0.41-1.57)	10.63 **(0.002)**
-308G/A TNFα (rs 1800629), +36 A/G TNFR1 (rs 767455), +1931A/T MIP1β (rs 1719153)	*-308 A TNF α* совместно с *+36 G TNFR1* и *+1931 A MIP1β*	28/241	11.62	17/65	26.15	**0.004 (0.032)** 2.69 (1.37-5.31)	18/163	11.04	0.99 (7.92) 0.95 (0.48-1.85)	7.05 **(0.009)**
+1663A/G TNFR2 (rs 1061624), C/G MCP1 (rs2857657)	*+1663 A TNFR2* совместно с *CC MCP1*	101/239	42.26	39/64	60.94	**0.006 (0.036)** 2.13 (1.21-3.74)	72/170	42.35	1.00 (6.00) 1.00 (0.66-1.53)	5.72 (**0.017**)
+252A/G Ltα (rs 909253), +36 A/G TNFR1 (rs	*+252 G Ltα* совместно с	78/243	32.10	33/67	49.25	**0.0077 (0.030)**	53/166	31.93	1.00 (4.00) 0.99 (0.64-	5.43 (**0.02**)

Полиморфизмы	Сочетания (аллели/ генотипы)	Контрольная группа (n=248)		Больные с ГПЭ (n= 243)						
				с гиперплазией эндометрия (n= 69)			с полипами эндометрия (n= 174)			Различия между больными ГПЭ с гиперплазией эндометрия и с полипами эндометрия $\chi 2$ (p), OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	
767455)	*+36 G TNFR1*					2.05 (1.18-3.56)			1.55)	
-308G/A TNFα (rs 1800629), +36 A/G TNFR1 (rs 767455)	*-308 A TNF α* совместно с *+36 G TNFR1*	34/244	13.93	18/67	26.87	**0.012 (0.04)** 2.27 (1.18-4.35)	20/166	12.05	0.69 (2.76) 0.85 (0.45-1.59)	6.63 (**0.01**)
+252A/G Ltα (rs 909253), +36 A/G TNFR1 (rs 767455)	*+252 AA Ltα* совместно с *+36 AG TNFR1*	59/243	24.28	15/67	22.39	0.87 (7.83) 0.90 (0.45-1.79)	69/166	41.57	**0.0001 (0.0009)** 2.22 (1.44-3.40)	6.81 (**0.01**)
+36 A/G TNFR1 (rs 767455), +1931A/T MIP1β (rs 1719153) C/G MCP1 (rs2857657)	*+36 AG TNFR1* совместно с *+1931 A MIP1β* и *C MCP1*	97/243	39.92	34/65	52.31	0.10 (1.20) 1.65 (0.92-2.97)	95/163	58.28	**0.0002 (0.0024)** 2.10 (1.41-3.15)	0.45 (0.50)
+36 A/G TNFR1 (rs 1719153)	*+36 AG TNFR1* совместно с *+1931 A MIP1β*	102/243	41.98	34/65	52.31	0.18 (1.08) 0.52 (0.75-2.72)	98/163	60.12	**0.0002 (0.0012)** 2.08 (1.39-3.12)	0.87 (0.35)
-308G/A TNFα (rs 1800629), +252A/G Ltα (rs 909253),	*-308 G TNFα* совместно с *+252 G Ltα ,*	28/241	11.62	5/67	7.46	0.45 (7.20) 0.61 (0.20-1.76)	6/166	3.62	**0.002 (0.032)** 0.29 (0.12-0.71)	0.83 (0.36)

Полиморфизмы	Сочетания (аллели/ генотипы)	Контрольная группа (n=248)		Больные с ГПЭ (n= 243)						
				с гиперплазией эндометрия (n= 69)			с полипами эндометрия (n= 174)			Различия между больными ГПЭ с гиперплазией эндометрия и с полипами эндометрия $\chi 2$ (p), OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	n/N	%	Различия с группой контроля p (p_{cor}), OR (95% CI)	
+36 A/G TNFR1 (rs 767455), -801G/A SDF1 (rs 1801157)	*+36 A TNFR1* и *-801 A SDF1*									
+252A/G Lta (rs 909253), +36 A/G TNFR1 (rs 767455), -801G/A SDF1 (rs 1801157)	*+252 G Lta* совместно с *+36 A TNFR1* и *-801 A SDF1*	29/242	11.98	5/67	7.46	0.41 (7.20) 0.59 (0.19-1.70)	7/166	4.22	**0.004 (0.032)** 0.32 (0.14-0.76)	0.47 (0.49)
+36 A/G TNFR1 (rs 767455), A/G I-TAC (rs4512021)	*+36 GG TNFR1* совместно с *G I-TAC*	49/239	20.50	11/66	16.67	0.60 (3.60) 0.78 (0.35-1.67)	17/162	10.49	**0.005 (0.030)** 0.46 (0.25-0.82)	0.14 (0.29)
+252A/G Lta (rs 909253), +36 A/G TNFR1 (rs 767455),	*+252 AA Lta* совместно с *+36 A TNFR1*	91/243	37.45	22/67	32.84	0.06 (0.36) 0.56 (0.31-1.03)	84/166	50.60	**0.0056 (0.0336)** 1.71 (1.15-2.55)	5.38 (**0.02**)
+36 A/G TNFR1 (rs 767455),-801G/A SDF1 (rs 1801157)	*+36 A TNFR1* совместно с *801 GG SDF1*	114/245	46.53	22/67	40.00	0.06 (0.36) 0.56 (0.31-1.03)	99/166	59.64	**0.0059 (0.0354)** 1.70 (1.14-2.53)	12.69 (**0.001**)

Обнаружена ассоциация сочетания аллелей -308 A TNF α, +1663A TNFR2, +1931 *A MIP1β* и *-801 G SDF1* с гиперплазией эндометрия. Такая комбинация встречается среди 25,81% больных с гиперплазией эндометрия и у 9.83% женщин контрольной группы (p=0.0017, p_{cor}=0.027). Данная комбинация полиморфных вариантов генов цитокинов является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=3.19, 95%CI 1.56-6.51). В группе пациенток с полипами эндометрия данное сочетание аллелей встречалось у 7.64% индивидов (p=0.58 при сравнении с контрольной группой и χ^2=11.57, p=0.001 при сравнении с больными с гиперплазией эндометрия).

Выявлены достоверные различия в концентрациях сочетания трех генетических маркеров *+252 G Ltα, +36 G TNFR1* и +1931 A *MIP1β* между больными с гиперплазией эндометрия (47.69%) и контрольной группой (27.50%). Такое сочетание аллелей является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (p=0.0019, p_{cor}=0.015, OR= 2.40, 95%CI 1.37-4.22). У пациенток с полипами эндометрия частота данной комбинации генетических вариантов составила 30.68%, что соответствует аналогичному показателю контрольной группы (p=0.56) и значительно ниже этого показателя среди больных с гиперплазией эндометрия (χ2=5.16, p=0.023).

Установлено, что сочетание аллелей *-308 A TNFα, +1663 A TNFR2* и *-801 G SDF1* встречается у 28.13% пациенток с гиперплазией эндометрия, что в 2.37 раза превышает аналогичный показатель группы контроля (11.86%) и в 2.99 раза больше значения соответствующего показателя группы пациенток с полипами эндометрия (9.41%, χ^2=11.65, p=0.001). Следует отметить, что такое сочетание аллелей является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (p=0.0021, pcor=0.016, OR= 2.91, 95%CI 1.48-5.70).

Зарегистрированы различия в концентрациях сочетаний аллелей *-308 A TNFα, +252 G Ltα* и *+1663 A TNFR2* между группой больных с гиперплазией эндометрия и контрольной группой. Это сочетание наблюдается среди 28,13% пациенток с гиперплазией эндометрия, тогда как в группе контроля частота данной комбинации составила 11.86% (p=0.0021, p_{cor}=0.016). Такая комбинация генетических вариантов цитокинов служит фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=2.91, 95%CI 1.48-5.70). Такое сочетание встречается у 9.41% пациенток с полипами эндометрия.

Комбинация генетических факторов, которая наблюдается у 40.30% больных с гиперплазией эндометрия и у 21.72% женщин контрольной группы, включает сочетание двух генетических маркеров: *+252 G Ltα* и *+1931 AA MIP1β* (p=0.0022, p_{cor} =0.012). Данное сочетание является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=2.43, 95%CI 1.27-4.32). Следует отметить, что это сочетание встречается среди 20.00% пациенток с полипами эндометрия, что достоверно меньше показателя группы больных с гиперплазией эндометрия (40.30%, χ^2=9.33, p=0.003) и аналогично данным группы контроля (21.72%, χ^2=0.76, p=4.56).

Сочетание аллелей *-308 A TNFα,+1663A TNFR2* и *+1931 A MIP1β* встречается у 25.81% пациенток с гиперплазией эндометрия, что в 2.53 раза превышает аналогичный показатель группы контроля (10.21%, p=0.0023, p_{cor} =0.016) и в 2.87 раз больше значения соответствующего показателя группы пациенток с полипами эндометрия (8.98%, χ^2=9.55, p=0.003). Такое сочетание аллелей является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=3.06, 95%CI 1.51-6.21).

Также выявлена «рисковая» комбинация аллелей *-308 A TNFα* и *+1663A TNFR2*, которая встречалась у 28.13% больных с гиперплазией эндометрия и среди 12.19% женщин контрольной группы (p_{cor} =0.010, OR=2.82, 95% CI 1.44-5.51). Это сочетание генетических вариантов цитокинов наблюдалось среди 10.00% женщин с полипами эндометрия, что соответствует аналогично-

му показателю контрольной группы (p=0.60) и значительно ниже данного показателя среди больных с гиперплазией эндометрия (χ2=10.63, p=0.002).

Выявлена ассоциация сочетания аллелей *-308 A TNFα, +36 G TNFR1* и *+1931 A MIP1β* с формированием гиперплазии эндометрия. Эта комбинация встречается среди 26.15% больных с гиперплазией эндометрия и у 11.62% женщин контрольной группы (p_{cor} =0.032). Такая комбинация генетических вариантов цитокинов является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=2.69, 95%CI 1.37-5.31). Среди пациенток с полипами эндометрия данное сочетание аллелей встречалось у 11.04% индивидов (p=0.99 при сравнении с контрольной группой и χ^2=7.05, p=0.009 при сравнении с больными с гиперплазией эндометрия).

Установлены различия в частоте сочетания аллеля *+36 A TNFR1* с генотипом *CC MCP1* между группой больных с гиперплазией эндометрия и контрольной группой. Частота этой комбинации генетических вариантов в контрольной группе составила 42.26%, тогда как среди пациенток с ГПЭ данный показатель равен 60.94% (p=0.006, p_{cor} =0.036). Такое сочетание является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=2.13, 95%, CI 1.21-3.74). Следует отметить, что это сочетание встречается среди 42.35% пациенток с полипами эндометрия, что достоверно меньше показателя группы больных с гиперплазией эндометрия (60.94%, χ^2=5.72, p=0.017) и аналогично данным среди женщин контрольной группы (42.26%, p=1.00).

Зарегистрированы достоверные различия в концентрации сочетания двух генетических маркеров *+252 G Ltα* и *+36 G TNFR1* между больными с гиперплазией эндометрия (49.25%) и контрольной группой (32.10%). Это сочетание аллелей является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (p=0.0077, p_{cor}=0.030, OR=2.05, 95%CI 1.18-3.56). Среди пациенток с полипами эндометрия частота данной комбинации генетических вариантов составила 31.93%, что соответствует аналогичному показателю контрольной группы (p=1.00) и достоверно ниже данного показателя среди больных с гиперплазией эндометрия (χ^2=5.43, p=0.02).

Показано, что у женщин с гиперплазией эндометрия, частота сочетания *-308 A TNFα* и *+36 G TNFR1* составила 26.87%, что в 1.93 раза больше по сравнению с контрольной группой (13.93%, p=0.012, p_{cor}=0.04). Это сочетание является фактором риска развития гиперплазии эндометрия (OR=2.27, 95%CI 1.18-4.35). Это сочетание генетических вариантов наблюдается у 12.05% больных с полипами эндометрия.

Наряду с этим, при анализе носительства сочетаний генетических вариантов цитокинов, установлен ряд достоверных отличий между группой пациенток с полипами эндометрия и контролем. В формировании значимых комбинаций генетических вариантов, отличающих больных с полипами эндометрия от контрольной группы участвуют следующие генетические полиморфизмы: *-308 G/A TNFα,+252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1, A/G I-TAC (rs4512021), +1931A/T MIP1β, C/G MCP1 (rs2857657), -801G/A SDF1* (см. табл.).

Так, сочетание генотипов *+252 AA Ltα* и *+36 AG TNFR1* выявлено среди 41.57% пациенток с полипами эндометрия, что в 1.71 раза больше аналогичного показателя контрольной группы (24.28%, p=0.0001, p_{cor} =0.0009) и в 1.86 раза больше соответствующего показателя группы пациенток с гиперплазией эндометрия (22.39%, χ^2=6.81, p=0.01). Такое сочетание генотипов служит фактором риска развития полипов эндометрия (OR=2.22, 95%CI 1.44-3.40).

Установлены достоверные различия в частоте сочетания генотипа *+252 AA Ltα* с аллелем *+36 A TNFR1* между группой пациенток с полипами эндометрия и контрольной группой. Частота этой комбинации генетических вариантов в группе контроля составила 37.45%, тогда как среди пациенток с полипами эндометрия данный показатель равен 50.60% (p=0.0056, p_{cor} =0.0336).

Такое сочетание является фактором риска развития полипов эндометрия (OR=1.71, 95%CI 1.15-2.55). Следует отметить, что это сочетание встречается среди 32.84% женщин с гиперплазией эндометрия, что достоверно ниже соответствующего показателя в группе больных с полипами эндометрия (50.60%, χ^2=5.38, p=0.02) и аналогично данным среди женщин контрольной группы (37.45%, p=0.06).

Также выявлено сочетание генетических вариантов цитокинов *+36 A TNFR1* и *-801 GG SDF1*, которое служит фактором риска развития полипов эндометрия (OR=1.70, 95%CI 1.14-2.53). Частота этого сочетания среди пациенток с полипами эндометрия составила 59.64%, а в группе контроля данный показатель ровнялся 46.53% (p=0.0059, p_{cor} =0.0354). Данное сочетание было зарегистрировано среди 40.00% больных с гиперплазией эндометрия, что достоверно отличается от аналогичного показателя среди пациенток с полипами эндометрия (59.64%, χ2=12.69 p=0.001).

Следует отметить, что сочетания генетических вариантов цитокинов +36 AG TNFR1, +1931 A MIP1β и C MCP1; +36 AG TNFR1 и +1931 A MIP1β; -308 G TNFα, +252 G Ltα, +36 A TNFR1 и -801 A SDF1; +252 G Ltα и -801 A SDF1; +36 GG TNFR1 и G I-TAC не являются «специфическими» маркерами развития полипов эндометрия, так как хотя их частоты среди женщин с полипом эндометрия и превышают соответствующие показатели индивидуумов контрольной группы (p_{cor} < 0.03-0.001), однако они не отличаются (p>0.05) от аналогичных данных пациенток с гиперплазией эндометрия.

Заключение. В результате проведенного исследования, выявлены сочетания генетических вариантов исследуемых цитокинов, ассоциированные с определенными морфологическими формами гиперпластических процессов эндометрия. Факторами риска развития гиперплазии эндометрия служат следующие сочетания генетических вариантов: *-308 A TNFα,+36 G TNFR1, +1663A TNFR2* и *+1931 A MIP1β* (OR=4.11); *-308 A TNFα, +36G TNFR1* и *+1663 A TNFR2* (OR=3.43); *-308 A TNFα, +1663A TNFR2, +1931 A MIP1β* и *-801 G SDF1* (OR=3.19); *-308 A TNFα, +1663A TNFR2, +1931 A MIP1β* и *-801 G SDF1* (OR=3.19); *+252 G Ltα, +36 G TNFR1* и +1931 A *MIP1β* (OR= 2.40); *-308 A TNFα, +1663 A TNFR2* и *-801 G SDF1* (OR= 2.91); *-308 A TNFα, +252 G Ltα* и *+1663 A TNFR2* (OR= 2.91); *+252 G Ltα* и *+1931 AA MIP1β* (OR=2.43); *-308 A TNFα,+1663A TNFR2* и *+1931 A MIP1β* (OR=3.06); *-308 A TNFα* и *+1663A TNFR2* (OR=2.82); *-308 A TNFα, +36 G TNFR1* и *+1931 A MIP1β* (OR=2.69); *+1663 A TNFR2* и *CC MCP1*(OR=2.13); *+252 G Ltα* и *+36 G TNFR1* (OR= 2.05); *-308 A TNFα* и *+36 G TNFR1* (OR=2.27). Выявлено, что генетическими факторами риска развития полипов эндометрия являются следующие сочетания генетических маркеров: *+252 AA Ltα* и *+36 AG TNFR1* (OR=2.22); *+252 AA Ltα* и *+36 A TNFR1* (OR=1.71); *+36 A TNFR1* и *-801 GG SDF1* (OR=1.70). Обращает на себя внимание тот факт, что генетические полиморфизмы *+252 A/G Ltα, +36 A/G TNFR1* и *-801G/A SDF1* принимают участие в формировании, как полипов эндометрия, так и гиперплазии эндометрия.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Доброхотова Ю.Э. Методы лечения атипической гиперплазии эндометрия // Лечебное дело. 2011. N 1. С. 71-79.

2. Запорожан В.Н., Татарчук Т.Ф., Дубинина В.Г., Косей Н.В. Современная диагностика и лечение гиперпластических процессов эндометрия // Репродуктивная эндокринология. 2012. N 1. С. 5-12.

3. Киселев В.И. Гиперпластические процессы органов женской репродуктивной системы: теория и практика // Москва: Медпрактика-М, 2011. 467 с.

4. Лысенко О.В. Новые подходы к терапии гиперпластических процессов и полипов эндометрия // Цитокины и воспаление. 2011. Т. 10, N 4. С. 125-129.

5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных: применение пакета

прикладных программ STATISTICA // Москва: Медиа Сфера, 2006. 305 с.

6. Сидорова И., Унанян А., Власов Р., Евтина И., Карпов Д. Гиперпластические процессы эндометрия: особенности клиники и терапии // Врач. 2011. N 6. С. 58-60.

7. Стрижаков А.Н. Доброкачественные заболевания матки // Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 281 с.

8. Ткаченко Л.В., Свиридова Н.И., Исаева Л.В., Богатырева Л.Н. Комбинированный метод лечения рецидивирующих гиперпластических процессов эндометрия у женщин с метаболическим синдромом // Уральский медицинский журнал. 2011. N 4(82). С. 72-75.

9. Чернуха Г.Е. Экспрессия генов, регулирующих апоптоз, при разных типах гиперплазии эндометрия и эндометриоидной карциноме / Г.Е. Чернуха, М.Р. Думановская, О.В. Бурменская, Е.С. Шубина, Е.А. Коган, Д.Ю. Трофимов // Акушерство и гинекология. N 1. С. 63-69.

10. Шешукова Н.А. Гиперпластические процессы эндометрия: особенности пролиферативной активности при сочетании с хроническим эндометритом // Акушерство, гинекология и репродукция. 2011. N 3. С. 10-15.

11. Chandra V., Fatima I., Saxena R., Kitchlu S., Sharma S., Hussain M., Hajela K., Bajpai P., Dwivedi A. Apoptosis induction and inhibition of hyperplasia formation by 2-[piperidinoethoxyphenyl]-3-[4-hydroxyphenyl]-2H-benzo(b)pyran in rat uterus // Am. J. Obstet. Gynecol. 2011. Vol. 205(4). P. 362.

12. Daya D. Endometrial hyperplasia and carcinoma with superimposed secretory changes: a double whammy // Int. J. Gynecol. Pathol. 2014. Vol. 33(2). P. 105-106.

13. Eritja N., Mirantes C., Llobet D., Yeramian A., Bergadà L., Dosil M., Domingo M., Matias-Guiu X., Dolcet X. Long-term estradiol exposure is a direct mitogen for insulin/EGF-primed endometrial cells and drives PTEN loss-induced hyperplasic growth // Am. J. Pathol. 2013. Vol. 183(1). P. 277-287.

14. Favorov A., Lvovs D., Speier W., Parmigiani G., Ochs M. OnionTree XML: A Format to Exchange Gene-Related Probabilities // J. Biomol. Struct. Dyn. 2010. Vol. 29(2). P. 417-423.

15. Giuntoli R.L., Gerardi M.A., Yemelyanova A.V., Ueda S.M., Fleury A.C., Diaz-Montes T.P., Bristow R.E. Stage Inoninvasive andminimallyinvasive uterine serous carcinoma: comprehensive staging associated with improved survival // Int. J. Gynecol. Cancer. 2012. Vol. 22(2). P. 273-279.

16. Goncharenko V.M., Beniuk V.A., Kalenska O.V., Demchenko O.M., Spivak M.Y., Bubnov R.V. Predictive diagnosis of endometrial hyperplasia and personalized therapeutic strategy in fertile age women // EPMA J. 2013. Vol. 4(1). P. 24.

17. Hvingel B., Lieng M., Roald B., Orbo A. Vascular markers CD31, CD34, actin, VEGFB, and VEGFR2, are prognostic markers for malignant development in benign endometrial polyps // Open J. Obstet. Gynecol. 2012. Vol. 2(1). P. 18-26.

18. Lacey Jr.J.V., Sherman M.E., Rush B.B., Ronnett B.M., Ioffe O.B., Duggan M.A., Glass A.G., Richesson D.A., Chatterjee N., Langholz B. Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia // J. Clin. Oncol. 2010. Vol. 28(5). P. 788-792.

19. Miller B. A potential prognostic factor in adenocarcinoma of the endometrium // Gynecol. Oncol. 1994. Vol. 54(2). P. 137-141.

20. Munro M.G., Dickersin K., Clark M.A., Langenberg P., Scherer R.W., Frick K.D. The Surgical Treatments Outcomes Project for Dysfunctional Uterine Bleeding: summary of an Agency for Health Research and Quality-sponsored randomized trial of endometrial ablation versus hysterectomy for women with heavy menstrual bleeding // Menopause. 2011. Vol. 18(4). P. 445-452.

21. Trimble C.L., Method M., Leitao M., Lu K., Ioffe O., Hampton M., Robert H., Zaino R., Mutter G.L. Management of endometrial precancers // Obstet. Gynecol. 2012. Vol. 120(5). P. 1160-1175.

22. Truskinovsky A.M. Hyperplasia and carcinoma in secretory endometrium: a diagnostic challenge // Int. J. Gynecol. Pathol. 2014. Vol. 33(2). P. 107-113.

23. Wang T., Rohan T.E., Gunter M.J., Xue X., Wactawski-Wende J., Rajpathak S.N., Cushman M., Strickler H.D., Kaplan R.C., Wassertheil-Smoller S., Scherer P.E. A prospective study of inflammation markers and endometrial cancer risk in postmenopausal hormone nonusers // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2011. Vol. 20(5). P. 971-977.

24. Witkiewicz A.K., McConnell T., Potoczek M., Emmons R.V., Kurman R.J. Increased natural killer cells and decreased regulatory T cells are seen in complex atypical endometrial hyperplasia and well-differentiated carcinoma treated with

progestins // Hum. Pathol. 2010. Vol. 41(1). P. 26-32.

References

1. Dobrokhotova Yu. Metody lecheniya atipicheskoy giperplazii endometriya [Methods of treatment of atypical endometrial hyperplasia]. Russian.

2. Zaporozhan VN, Tatarchuk TF, Dubinina VG, Kosey NV. Sovremennaya diagnostika i lecheniye giperplasticheskikh protsessov endometriya [Modern diagnostics and treatment of endometrial hyperplastic processes]. Reproduktivnaya endokrinologiya. 2012;1:5-12. Russian.

3. Kiselev VI. Giperplasticheskiye protsessy organov zhenskoy reproduktivnoy sistemy: teoriya i praktika [Hyperplastic processes of the organs of the female reproductive system: theory and practice]. Moscow: Medpraktika-M; 2011. 467 p. Russian.

4. Lysenko OV. Novyye podkhody k terapii giperplasticheskikh protsessov i polipov endometriya [New approaches to the therapy of Russian.

5. Rebrova OYu. Statisticheskiy analiz meditsinskikh dannykh: primeneniye paketa prikladnykh programm STATISTICA. Moscow: Russian.

6. Sidorova I, Unanyan A, Vlasov R, Evtina I, Karpov D. Giperplasticheskiye protsessy endometriya: osobennosti kliniki i terapii [Hyperplastic processes of the endometrium: Russian.

7. Strizhakov AN. Dobrokachestvennyye zabolevaniya matki [Benign uterine diseases]. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. 281 p. Russian.

8. Tkachenko LV, Sviridova NI, Isayeva LV, Bogatyreva LN. Kombinirovannyy metod lecheniya retsidiviruyushchikh giperplasticheskikh protsessov endometriya u zhenshchin s metabolicheskim sindromom [Combined method of treatment of recurrent endometrial hyperplastic processes in women with metabolic syndrome]. Ural'skiy meditsinskiy zhurnal. 2011;4(82):72-75. Russian.

9. Chernukha GE, Dumanovskaya MR, Burmenskaya OV, et al. Ekspressiya genov, reguliruyushchikh apoptoz, pri raznykh tipakh giperplazii endometriya i endometrioidnoy [Expression of the genes that regulate apoptosis, with different types of endometrial hyperplasia and Russian.

10. Sheshukova NA. Giperplasticheskiye protsessy endometriya: osobennosti proliferativnoy aktivnosti pri sochetanii s khronicheskim endometritom [Hyperplastic processes of the endometrium: features of proliferative activity in combination with chronic endometritis]. Akusherstvo, gynekologia i reproductsia. 2011;3:10-15. Russian.

11. Chandra V, Fatima I, Saxena R, Kitchlu S, Sharma S, Hussain M, Hajela K, Bajpai P, Dwivedi A. Apoptosis induction and inhibition of hyperplasia formation by 2-[piperidinoethoxyphenyl]-3-[4-hydroxyphenyl]-2H-benzo(b)pyran in rat uterus. Am. J. Obstet. Gynecol. 2011;205(4):362.

12. Daya D. Endometrial hyperplasia and carcinoma with superimposed secretory changes: a double whammy. Int. J. Gynecol. Pathol. 2014;33(2):105-106.

13. Eritja N, Mirantes C, Llobet D, Yeramian A, Bergadà L, Dosil M, Domingo M, Matias-Guiu X, Dolcet X. Long-term estradiol exposure is a direct mitogen for insulin/EGF-primed endometrial cells and drives PTEN loss-induced hyperplasic growth. Am. J. Pathol. 2013;183(1):277-287.

14. Favorov A, Lvovs D, Speier W, Parmigiani G, Ochs M. OnionTree XML: A Format to Exchange Gene-Related Probabilities. J. Biomol. Struct. Dyn. 2010;29(2):417-423.

15. Giuntoli RL, Gerardi MA, Yemelyanova AV, Ueda SM, Fleury AC, Diaz-Montes TP, Bristow RE. Stage Inoninvasive andminimallyinvasive uterine serous carcinoma: comprehensive staging associated with improved survival. Int. J. Gynecol. Cancer. 2012;22(2):273-279.

16. Goncharenko VM, Beniuk VA, Kalenska OV, Demchenko OM, Spivak MY, Bubnov RV. Predictive diagnosis of endometrial hyperplasia and personalized therapeutic strategy in fertile age women. EPMA J. 2013;4(1):24.

17. Hvingel B, Lieng M, Roald B, Orbo A. Vascular markers CD31, CD34, actin, VEGFB, and VEGFR2, are prognostic markers for malignant development in benign endometrial polyps. Open J. Obstet. Gynecol. 2012;2(1):18-26.

18. Lacey JrJV, Sherman ME, Rush BB, Ronnett BM, Ioffe OB, Duggan MA, Glass AG, Richesson DA, Chatterjee N, Langholz B. Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia. J. Clin. Oncol. 2010;28(5):788-792.

19. Miller B. A potential prognostic factor in adenocarcinoma of the endometrium. Gynecol. Oncol. 1994;54(2):137-141.

20. Munro MG, Dickersin K, Clark MA, Langenberg P, Scherer RW, Frick KD. The Surgical Treatments Outcomes Project for Dysfunctional Uterine Bleeding: summary of an Agency for Health Research and Quality-sponsored randomized trial of endometrial ablation versus hysterectomy for women with heavy menstrual bleeding. Menopause. 2011;18(4):445-452.

21. Trimble CL, Method M, Leitao M, Lu K, Ioffe O, Hampton M, Robert H, Zaino R, Mutter GL. Management of endometrial precancers. Obstet. Gynecol. 2012;120(5):1160-1175.

22. Truskinovsky AM. Hyperplasia and carcinoma in secretory endometrium: a diagnostic challenge. Int. J. Gynecol. Pathol. 2014;33(2): 107-113.

23. Wang T, Rohan TE, Gunter MJ, Xue X, Wactawski-Wende J, Rajpathak SN, Cushman M, Strickler HD, Kaplan RC, Wassertheil-Smoller S, Scherer PE. A prospective study of inflammation markers and endometrial cancer risk in postmenopausal hormone nonusers. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2011;20(5):971-977.

24. Witkiewicz AK, McConnell T, Potoczek M, Emmons RV, Kurman RJ. Increased natural killer cells and decreased regulatory T cells are seen in complex atypical endometrial hyperplasia and well-differentiated carcinoma treated with progestins. Hum. Pathol. 2010;41(1):26-32.

Демакова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Академии биологии и биотехнологии.

Demakova Natalia Alexandrovna, Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer, Academy of Biology and Biotechnology.

Статья поступила в редакцию 10 ноября 2017 г.

УДК 575 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-5**

Пономаренко И.В.

ОТБОР ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ДЛЯ АНАЛИЗА АССОЦИАЦИЙ ПРИ ГЕНЕТИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет»
305041, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3
E-mail: ponomarenko215@yandex.ru

Аннотация. *Актуальность.* Изучение роли наследственных факторов в формировании многофакторных признаков является актуальным, а применительно к мультифакториальным заболеваниям эти исследования имеют важное значение для медицины. При планировании генетико-эпидемиологических исследований мультифакториальных признаков (заболеваний) важное значение имеет отбор полиморфных локусов для поиска ассоциаций с исследуемым фенотипом (заболеванием). *Цель исследования.* Провести систематический анализ данных, имеющихся в современной литературе, о подходах к отбору полиморфных локусов при проведении ассоциативных исследований. *Материалы и методы.* В обзор включены современные данные зарубежных и отечественных статей, найденные в Pubmed по данной теме. *Результаты.* Согласно современным представлениям при отборе полиморфных локусов генов-кандидатов для изучения ассоциаций с мультифакториальным признаком (заболеванием) следует учитывать следующие критерии: 1) наличие ассоциации с исследуемым признаком по результатам ранее проведенных полногеномных (GWAS) и/или ассоциативных (в том числе репликативных) исследований; 2) наличие ассоциации с фенотипами, имеющими с исследуемым признаком, общие биологические пути; 3) регуляторный потенциал (regSNP); 4) влияние на экспрессию генов (eSNP); 5) связь с несинонимическими заменами (nsSNP); 6) tagger SNP (tagSNP) 7) частота полиморфизма не менее 5% 8) функциональные эффекты (regSNP, eSNP, nsSNP) SNPs, находящихся в неравновесии по сцеплению ($r^2 \geq 0.8$) с отобранными для ассоциативного анализа полиморфизмами. В работе приведена характеристика современных мировых баз данных по функциональной геномике и биоинформатических методов анализа, используемых для *in silico* анализа регуляторного и eQTL значения SNPs, оценки их блочной структуры (SIFT, PolyPhen-2, HaploReg, rSNPs MAPPER, RegulomeDB, rSNPBase, SNP FuncPred, Blood eQTL browser, GTExportal, HaploView, LD TAG SNP Selection). *Заключение.* При отборе полиморфных локусов для ассоциативных исследований следует учитывать их ассоциации с исследуемым признаком по данным ранее проведенных исследований, регуляторный потенциал и влияние на экспрессию генов, nsSNP и tagSNP, популяционную частоту не менее 5%, функциональные эффекты сильно сцепленных с ними SNPs.

Ключевые слова: полиморфизм; ассоциации; регуляторный потенциал; eSNP; nsSNP; tagSNP

Информация для цитирования: Пономаренко И.В. Отбор полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях //

Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С. 40-54. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-5

I.V. Ponomarenko

SELECTION OF POLYMORPHIC LOCI FOR ASSOCIATION ANALYSIS IN GENETIC-EPIDEMIOLOGICAL STUDIES

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
"Kursk State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation
3 K. Marx St., Kursk 305041, Russia
E-mail: ponomarenko215@yandex.ru

Abstract. *Background.* The study of the role of hereditary factors in the formation of multifactorial signs is relevant, and in relation to multifactorial diseases, these studies are important for medicine. When planning genetic and epidemiological studies of multifactorial signs (diseases), it is important to select polymorphic loci to find associations with the studied phenotype (disease). *The aim of the study.* To carry out a systematic analysis of the data available in the modern literature on the approaches to the selection of polymorphic loci in the course of associative studies. *Materials and methods.* The review includes the current data of foreign and domestic articles on this topic found in Pubmed. *Results.* According to modern concepts, the selection of polymorphic loci of candidate genes to explore associations with a multifactorial trait (disease) requires the following criteria: 1) the presence of the association with the studied trait on the results of previously conducted genome-wide association (GWAS) and/or associative (i.e. replication) of research; 2) the presence of associations with phenotypes possessing common biological pathways with the studied trait; 3) regulatory capacity (regSNP); 4) influence on gene expression (eSNP); 5) association with nonsynonymous substitutions (nsSNP); 6) tagger SNP (tagSNP) 7) polymorphism frequency no less than 5% 8) functional effects (regSNP, eSNP, nsSNP) of SNPs in non-equilibrium by coupling ($r2 \geq 0.8$) with polymorphisms selected for association analysis. The paper presents the characteristics of modern world databases on functional genomics and bioinformatics analysis methods used for *in silico* analysis of regulatory and eqtl SNPs values, evaluation of their block structure (SIFT, PolyPhen-2, HaploReg, rSNPs MAPPER, RegulomeDB, rSNPBase, SNP FuncPred, Blood eQTL browser, GTExportal, HaploView, LD TAG SNP Selection). *Conclusion.* The selection of polymorphic loci for associative studies should take into account their association with the studied feature according to the previous studies, the regulatory potential and the effect on gene expression, nsSNP and tagSNP, population frequency of at least 5%, and the functional effects of strongly coupled SNPs.

Key words: polymorphism; associations; regulatory potential; eSNP; nsSNP; tagSNP.
Information for citation: Ponomarenko IV. Otbor polimorfnykh lokusov dlya analiza assotsiatsiy pri genetiko-epidemiologicheskikh issledovaniyakh [Selection of polymorphic loci for association analysis in genetic-epidemiological studies]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):40-54. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-5

Введение. Одним из ключевых моментов любого генетико-эпидемиологического исследования, направленного на поиск ассоциаций полиморфных локусов генов-кандидатов с формированием многофакторного признака (как нормального, например,

рост, вес, возраст менархе и др., так патологического, т.е. мультифакториального заболевания) является выбор полиморфных локусов определенных генов-кандидатов для исследования. Именно от того насколько «качественно» исследователь, планирующий свою работу, отберет полиморфные локусы для анализа ассоциаций будет напрямую зависеть «успех» его научного поиска. Если при отборе генов-кандидатов для исследования минимальным требованием для его включения в исследование является вовлеченность продукта данного гена в механизмы развития исследуемого многофакторного признака (этиопатогенез мультифакториального заболевания) (эту информацию можно получить в многочисленных руководствах по молекулярным механизмам развития различных заболеваний, а также в современных онлайн базах данных - *KEGG PATHWAY* (www.genome.jp/kegg/pathway.html), *Reactome Pathway* (www.reactome.org), *Gene Ontology* (http://geneontology.org), *PharmGKB* (www.pharmgkb.org), *GeneMANIA* (http://genemania.org) и др.), то при отборе полиморфных локусов, планируемых для исследования в данных генах-кандидатах, следует учитывать не только локализацию данного полиморфизма в/около рассматриваемого гена-кандидата и его ассоциации с данным фенотипом (заболеванием), полученные в ранее проведенных исследованиях в различных популяциях, но и его потенциальные фенотипические эффекты, основанные на связи данного полиморфизма с эпигенетическими изменениями и экспрессией генов. Именно эти доказанные (а не гипотетические) фенотипические эффекты «значимых» полиморфных локусов могут являться медико-биологической основой выявленных ассоциаций и должны учитываться при планировании любого генетико-эпидемиологического исследования. К настоящему времени в современной литературе накоплен значительный фактический материал, являющийся результатом работы достаточно большого числа международных консорциумов в области изучения эпигенетики, экспрессии генов человека – ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements) Consortium (https://www.encodeproject.org/), NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium (http://www.roadmapepigenomics.org/), Consortium Genotype-Tissue Expression (http://www.gtexportal.org/), что диктует необходимость некоторой систематизации этих данных и их использование при отборе полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях многофакторных признаков (в том числе мультифакториальных заболеваний).

Цель исследования. Провести систематический анализ данных, имеющихся в современной литературе о подходах к отбору полиморфных локусов при проведении ассоциативных исследований.

Материалы и методы. В обзор включены современные данные зарубежных и отечественных статей, найденные в Pubmed, о подходах к отбору полиморфных локусов при проведении ассоциативных исследований многофакторных признаков (заболеваний).

Результаты исследования и их обсуждение.

Одним из основных требований при отборе полиморфного локуса для генетико-эпидемиологического исследования многофакторных признаков (заболеваний) является наличие его ассоциации с данным признаком (заболеванием), установленное в ранее проведенных исследованиях [3, 8, 33]. Основным ориентиром здесь являются данные полногеномных исследований (GWAS), результаты которых представлены в открытом доступе в каталоге полногеномных исследований (GWAS) National Human Genome Research Institute (http://www.genome.gov/gwastudies/). При этом в данном случае исследователь планирует проведение репликативного исследования в «своей» популяции [15], которая имеет своеобразие в генетических характеристиках («свою» историю формирования, миграционные потоки и т.д.), средовых

условиях существования (климато-географические факторы и др.), кофакторах, которые играют значимую роль в развитии исследуемого фенотипа (заболевания) в данной выборке (например, артифициальные аборты являются фактором риска развития доброкачественных пролиферативных заболеваний матки у населения России, но не у населения Центральной Европы и Северной Америки и т.д.). Дополнительным аргументом для включения GWAS-значимого полиморфизма в исследование является подтверждение его значимой ассоциации в других GWAS исследованиях или независимых репликативных исследованиях. При отсутствии полногеномных исследований (например, GWAS исследования не проведены для гиперплазии эндометрия и ряда других заболеваний) или неоднозначности немногочисленных GWAS исследований отдельных многофакторных признаков (заболеваний) в исследование правомочно включать полиморфные локусы, которые, показали свою «значимость» в других, ранее проведенных ассоциативных исследованиях и в первую очередь «крупномасштабных» ассоциативных исследованиях (например, в работе He C. et al. [10], посвященной поиску ассоциаций генов-кандидатов с возрастом менархе для исследования были отобраны 18862 SNPs в 278 генах 9 различных функциональных групп. На выборке из 24341 женщин значимые ассоциации с возрастом менархе были установлены 42 SNPs 9 генов – *FSHB, LHCGR, POMC, UGT2B4, GHRH, CD40LG, FGFR1, KISS1, NKX2-1*. В работе Goddard K.A. et al. [14] при изучении ассоциации 775 SNP в 190 генах с развитием преэклампсии на выборке из 350 пар мать-ребенок с преэклампсией и 600 контрольных пар установлено 6 генов, ассоциированных с развитием ПЭ: *IGF1, IL4R, IGF2R, GNB3, CSF1, THBS4*).

При этом, следует отметить, что целый ряд многофакторных признаков и в т.ч. заболеваний характеризуются коморбидностью (достаточно часто встречается совместно) и синтропией (неслучайное сочетание двух и более болезней у индивидуума и его ближайших родственников, имеющее эволюционно-генетическую основу [5]. Синтропия определяется общими механизмами развития данных заболеваний и вовлеченностью в их формирование общих (синтропных) генов (функционально взаимодействующие ко-регулируемые гены, локализованные во всем пространстве генома человека, вовлеченные в общие для данной синтропии биохимические и физиологические пути) [6]. В соответствии с этим, при отборе полиморфных локусов для исследования следует учитывать наличие ассоциации «кандидатного» полиморфизма с фенотипами, имеющими с исследуемым признаком, общие биологические пути и вследствие этого имеющего для организма (как в норме, так и при развитии заболевания) более значимую – «ключевую» роль. Так, например, согласно данным литературы, среди генов-кандидатов менархе особое место занимают гены, ассоциированные также с антропометрическими характеристиками (рост, индекс массы тела и др.) (*LIN28B, FTO, TNNI3K, MAP2K5, FANCL, STK33, GPRC5B, POMC/RBJ* и др.), в связи с тем, что они вовлечены в общие биологические пути формирования менархе, роста, распределения жировой ткани, развития ожирения и др. [13, 22, 28]. Поэтому при изучении молекулярно-генетических факторов менархе для анализа ассоциаций предпочтительнее отбирать полиморфные локусы, которые так же показали в ранее проведенных исследованиях ассоциации с антропометрическими характеристиками.

При оценке функционального значения полиморфизма при его расположении в кодирующей части генома (экзонах) важно оценить является ли эта нуклеотидная замена несинонимической (т.е. приводит к замене аминокислоты в кодируемом полипептиде) и если это так, то необходимо понимать каков предикторный потенциал данной аминокислотной замены. Для выявления «миссенс-мутаций» (nsSNP) и оценке их предиктивного потенциала может использо-

ваться программное обеспечение SIFT (Sorting Tolerant From Intolerant) [18] (http://sift.jcvi.org/) и PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) (prediction of functional effects of human nsSNPs) [11] (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml). В качестве примера использования этих он-лайн программ для оценки предикторного потенциала миссенс-замен приведем наши неопубликованные результаты изучения ассоциаций полиморфизма генов-кандидатов с развитием гиперплазии эндометрия. Нами установлено, rs4889 (1q32.1), сильно сцепленный с rs7538038 (r^2=0.98), который ассоциирован с развитием гиперплазии эндометрия, обусловливает замену Pro81Arg в полипептиде KISS1. Согласно базы данных PolyPhen-2 (prediction of functional effects of human nsSNPs) аминокислотная замену Pro81Arg в полипептиде KISS1 имеет предикторный класс «POSSIBLY DAMAGING» с score=0.524 (чувствительность 0.88, специфичность – 0.90). Так же, нами показано, что rs4633 (ассоциирован с гиперплазией эндометрия и приводит к синонимичной замене аминокислоты в белковом продукте гена *COMT,* 22q11.21) сильно сцеплен (r^2=0.99) с rs4680, который определяет замену Val18Met в полипептиде COMT. Согласно данных базы SIFT (Sorting Tolerant From Intolerant) аминокислотная замена Val18Met в полипептиде COMT имеет SIFT Score=0.02, что характеризует ее предикторное значение как «DELETERIOUS» (SIFT Score ≤0.05). Следует отметить, что в ранее проведенной работе Chen J. et al. [17] показано, что замена Val/Met в полипептиде COMT обусловливает изменение стабильности и активности COMT: Met вариант приводит к 40% снижению уровня белка и уменьшению его ферментативной активности по сравнению с вариантом Val. Другой пример демонстрирующий важность оценки предикторного потенциала полиморфизма, несмотря на то, что он является несинонимическим – нами было установлено (неопубликованные данные) что с развитием генитального эндометриоза ассоциирован полиморфизм rs713586 (2p23.3) с которым сильно сцеплен (r^2=0.93) rs11676272, обусловливающий замену Ser107Pro в полипептиде ADCY3. Эта аминокислотная замена имеет предикторное значение «TOLERATED» по базе данных SIFT с SIFT Score=0.42, что не превышает порогового значения SIFT Score ≤0.05. Также, по базе данных PolyPhen-2 данная аминокислотная замена имеет предикторный класс «BENIGN» с score=0 (чувствительность 1.00, специфичность – 0). Таким образом, хотя полиморфный локус rs11676272 и обусловливает миссенс замену в полипептиде ADCY3, однако она не влияет на функциональное значение этого полипептида.

Важное значение при характеристике полиморфного локуса имеет его регуляторный потенциал и eQTL значение (связь с экспрессией генов). Регуляторный потенциал полиморфных локусов, а также их связь с экспрессией генов, все чаще исследователями оцениваются не только в *post-hoc* анализе результатов полногеномных исследований (пример такого *post-hoc* анализа функционального значения некодирующих GWAS-значимых полиморфных локусов представлен в виде блок-схемы на рис. 1) или ассоциативных исследований отдельных групп генов-кандидатов, а при планировании генетико-эпидемиологических исследований с целью отбора функционально значимых полиморфных локусов. В современной литературе представлено достаточно много мировых баз данных по функциональной геномике и биоинформатических методов анализа этих данных, позволяющих *in silico* оценить регуляторный потенциал и eQTL значение SNPs, планируемых для исследования. В таблицах 1 и 2 представлена в качестве примера информация о публично доступных информационных ресурсах для оценки регуляторного потенциала (табл. 1) и влияния на экспрессию генов (табл. 2) изучаемых (или планируемых для исследования) полиморфных локусов, взятая из работы Tak Y.G. и Farnham P.J. [26] «Making sense of GWAS: using epigenomics and ge-

nome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome», опубликованной в журнале «Epigenetics&chromatin». Следует отметить, что в современные онлайн ресурсы по функциональной геномике достаточно хорошо интегрированы данные, полученные в ходе реализации крупных международных проектов в области эпигенетики – ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements) (https://www.encodeproject.org/) и консорциума NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium (http://www.roadmapepigenomics.org/). С помощью этих данных оценивается расположение полиморфизма в регионе «открытого хроматина», регионах модифицированных гистонов, сайтах связывания с различными регуляторными белками (CTCF и др.), регионе мотивов ДНК, являющихся сайтами связывания с транскрипционными факторами (TFBs) и т.д. (рис. 2) [20], и результатом этого является приоритизация SNPs с позиций их регуляторных эффектов (рис. 3) [26].

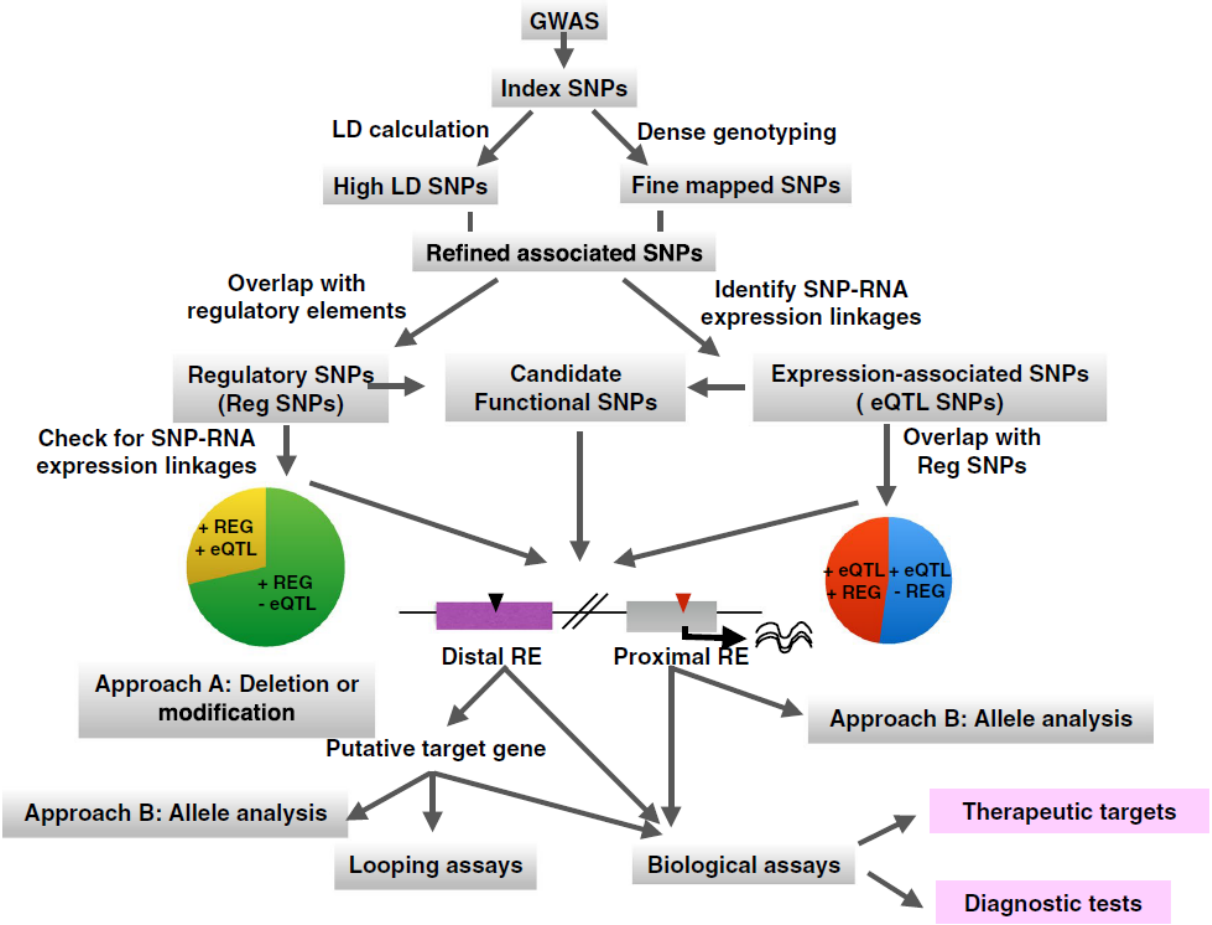

Рис. 1. Блок-схема *post-hoc* анализа функционального значения некодирующих GWAS-значимых полиморфных локусов [26]
Fig. 1. Block diagram of the *post-hoc* analysis of the functional significance of non-coding GWAS-significant polymorphic loci [26]

Таблица 1

Публично доступные базы данных по функциональной геномике [26]

Table 1

Publicly accessible databases on functional genomics [26]

Tool	Type	Minimum input	Output	Epigenetic annotation file used	URL	PMID
HaploReg	Web server	rsID	Overlapping annotated features and TF motif disruption information for SNPs (input) and correlated SNPs with r^2 >0.8	ChromHMM, DNase-seq, a library of position weight matrices (PWMs) from TRANSFAC, JASPAR, and protein binding array (PBM), and eQTL	http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v3.php	22064851
RegulomeDB	Web server	rsID	Overlapping annotated features for SNPs (input) with scores which depend on the combination of overlapping annotated features and UCSC genome browser showing overlapping features	TF binding, Dnase-seq, FAIRE, DNase footprinting, eQTL, dsQTL, ChIP-exo and DNA methylation	http://www.regulomedb.org	22955989
FORGE	Web server	rsID	Overlapping DNase1 hotspots for SNP(input)	DNase1 hotspot	http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/UserData/Forge	
rSNPBase	Web server	rsID or gene name	Proximal or distal transcriptional regulation, miRNA regulation, RNA binding protein mediated regulation, eQTL results for SNPs (input) and correlated SNPs (r^2>0.8)	histone modification, TF bindings, CpG islands, RBP, miRNA data	http://rsnp.psych.ac.cn/	24285297
FunciSNP	R package	GWAS index SNP information (chrom:position, rsID, population) in tab-delimited file, biofeature information in .bed format, user-defined r^2 value	Overlapping annotated features for index SNP(input) and correlated SNPs which r^2 values are user-defined	Any biofeature annotation information in .bed format	https://github.com/labrazil/Coetzee_Seq_Analysis/tree/master/FunciSNP	22684628
GREGOR	A package run using perl code	A file containing single column of index SNPs, biofeature information in .bed format, user-defined r^2 value	Prioritized variants based on overlap with selected regulatory regions, enrichment analysis with P-values showing how index SNPs or correlated SNPs are enriched in annotated feature compared to control SNPs	Any biofeature annotation information in .bed format	http://csg.sph.umich.edu/GREGOR/index.php/site/index	25886982
Enlight	Web server	rsID, *P* value	Plots showing LD and overlapping annotated features for SNP (input)	chromHMM, histone modification, DNA methylation, TF bindings, eQTL, Hi-C or customized BED file for biofeatures	http://enlight.usc.edu/index.html	25262152
GWAS3D	Web server	rsID, *P*- value	TF motif analysis and overlapping annotated features for SNPs (input)	5C, Hi-C, ChIA-PET, ChromeHMM, H3K27Ac, p300, CTCF, DHS (Option for selecting cell lines relevant to disease)	http://jjwanglab.org/gwas3d	23723249
motifbreakR	R package	SNP information in .bed or .vcf format	Comprehensive TF binding sites disruption at SNPs (input)	TF motif information from ScerTF, FlyFactorSurvey, hpDI, UniPROBE, JASPAR, ENCODE, Homer, Factorbook, HOCOMOCO	https://github.com/Simon-Coetzee/motifBreakR--	26272984

Таблица 2

Публично доступные eQTL базы данных [26]

Table 2

Publicly Available eQTL Databases [26]

Tool	Features	URL	PMID
NCBI eQTL browser	cis-eQTL from liver, lymphoblastoid, brain	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/eqtl/index.cgi	
seeQTL	browser for cis-eQTL, and trans-eQTL from lymphoblastoid, brain, monocyte	http://www.bios.unc.edu/research/genomic_software/seeQTL/	22171328
Chicago eQTL	QTL (eQTL, dsQTL, trQTL, exonQTL) from lymphoblastoid, brain, liver, fibroblast, T-cells	http://eqtl.uchicago.edu/cgi-bin/gbrowse/eqtl/	
GTEx Portal	>60 tissues eQTL data and eQTL IGV browser	http://www.gtexportal.org/home/	25954001
GeneVar	>5 tissues eQTL, meQTL data and visualization	https://www.sanger.ac.uk/resources/software/genevar/	20702402
Blood eQTL	Blood cis- and trans-eQTLs	http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/	24013639
Geuvadis	QTL (eQTL,mirQTL, trQTL) from lymphoblastoid cell lines	http://www.ebi.ac.uk/Tools/geuvadis-bin-das/	24037378

mirQTL miRNA QTL, *trQTL* transcript ratio QTL, *dsQTL* Dnase I sensitivity QTL

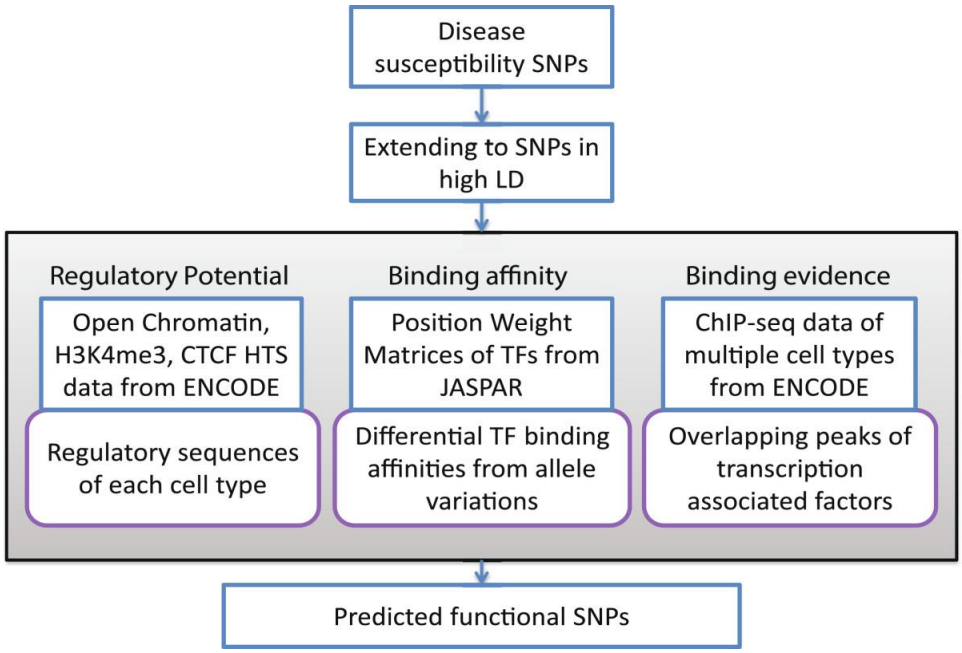

Рис. 2. Оценка регуляторных эффектов полиморфных локусов [20]
Fig. 2. Evaluation of regulatory effects of polymorphic loci [20]

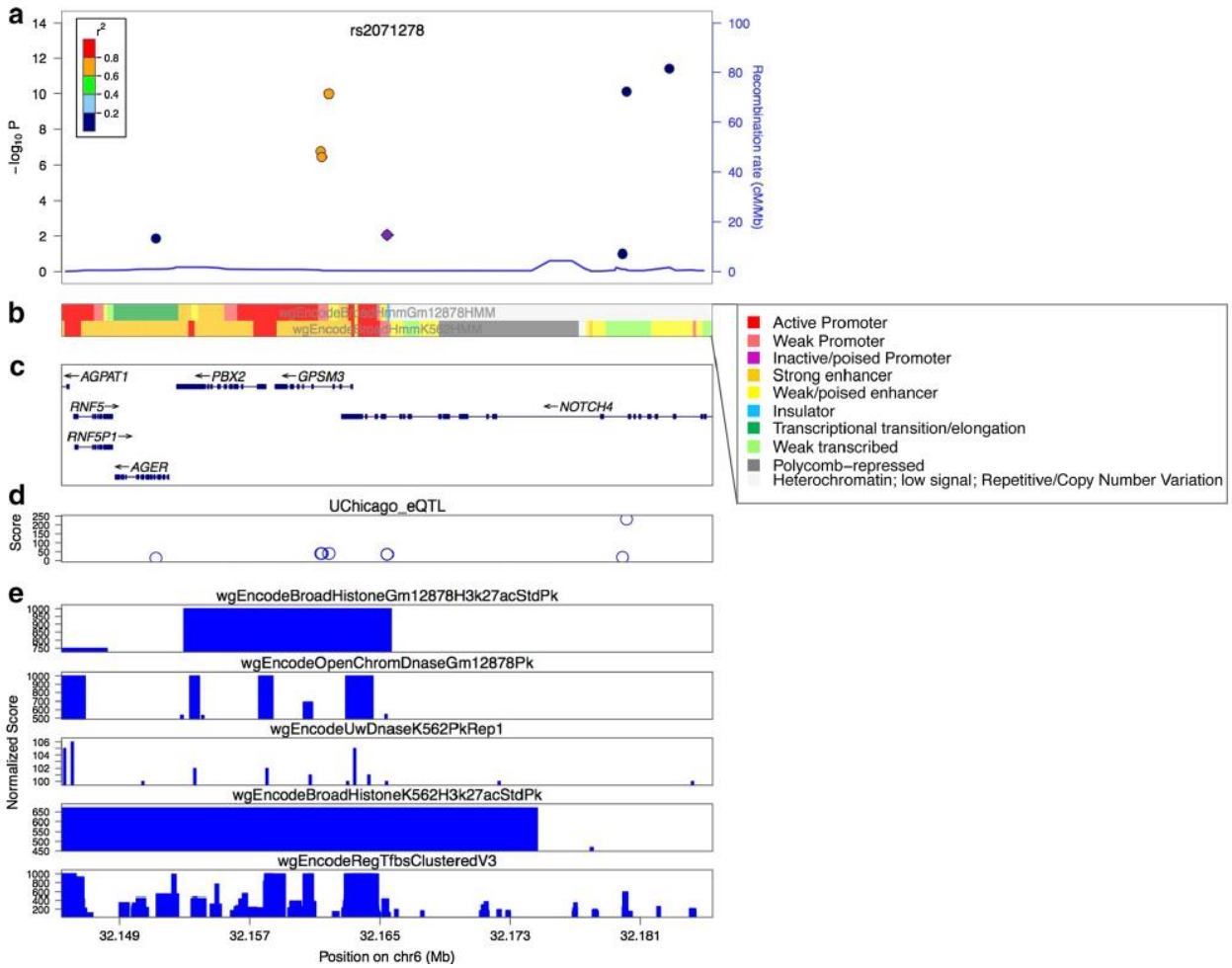

Рис. 3. Приоритезация SNPs на основе данных о функциональной геномике [26]
Fig. 3. Prioritization of SNPs based on data on functional genomics [26]

Онлайн ресурсы (RegulomeDB, SNP Function Prediction, rSNPBase и др.) широко используются при планировании генетико-эпидемиологических исследований в работах различных научных коллективов и в том числе отечественными учеными [1, 7, 9, 16, 19, 29].

Нашим научным коллективом, при планировании генетико-эпидемиологического исследования возраста менархе, для оценки регуляторного потенциала полиморфных локусов, отбираемых для ассоциативного анализа использовалось следующее онлайн программное обеспечение:

- HaploReg (v4.1) [30] (http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php) (Core 25-state model using 12 imputed marks) (рассматривается расположение SNPs в области гистонов, маркирующих промоторы и энхансеры, в регионе гиперчувствительности к ДНКазе, эволюционно консервативных регионах, регионе регуляторных мотивов и регионе связывания с регуляторными белками);
- rSNPs MAPPER (Multi-genome Analysis of Positions and Patterns of Elements of Regulation) [23] (http://genome.ufl.edu/mapper/mapper-main) (оценивается локализация SNPs в регионе сайтов связывания с транскрипционными факторами на основе баз данных TRANSFAC, JASPAR, MAPPER);
- RegulomeDB (Version 1.1) [12] (http://regulome.stanford.edu/) (оценивается regulatory scores SNPs). В онлайн ресурсе RegulomeDB для SNP представлены регуляторные коэффициенты – 1a (eQTL + TF binding + matched TF motif + matched DNase Footprint + DNase peak), 1b (eQTL + TF binding + any motif + DNase Footprint + DNase peak), 1c (eQTL + TF binding + matched TF motif + DNase peak), 1d (eQTL + TF binding + any motif + DNase peak), 1e (eQTL + TF binding + matched TF motif), 1f (eQTL + TF binding / DNase peak), 2a (TF binding + matched TF motif + matched DNase Footprint + DNase peak), 2b (TF binding + any motif + DNase Footprint + DNase peak), 2c (TF binding + matched TF motif + DNase peak), 3a (TF binding + any motif + DNase peak), 3b (TF binding + matched TF motif), 4 (TF binding + DNase peak), 5 (TF binding or DNase peak), 6 (other). Следует отметить, что чем меньше коэффициент, тем выше регуляторный потенциал SNP и влияние на экспрессию генов оказывают только SNPs, имеющие коэффициент от 1a до 1f;
- rSNPBase [24] (http://rsnp.psych.ac.cn/index.do) (оценивается роль SNPs в проксимальной и дистальной транскрипционной регуляции, регуляции, опосредованной РНК-связываемыми белками);
- SNPinfo Web Server – SNP Function Prediction (FuncPred) [32] (https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.html) (оценивается Regulatory Potential Score SNPs, а также связь полиморфизма с сайтами, связывающими факторы транскрипции (TFBs), микроРНК, консервативными последовательностями и др.).

С помощью современных баз данных по функциональной геномике можно оценить конкретную связь полиморфного локуса (референсного и альтернативного аллелей) с изменением регуляторного мотива ДНК (афинность мотива к транскрипционным факторам). Одним из таких подходов является определение разницы между LOD scores альтернативного (alt) и референсного (ref) аллелей [22, 31]: LOD (alt) − LOD (ref). Отрицательное значение этого показателя свидетельствует о повышении афинности данного мотива референсным аллелем, наоборот, положительное значение демонстрирует связь альтернативного аллеля с повышением афинности анализируемого мотива ДНК.

При рассмотрении функционального значения полиморфного локуса, включаемого в исследование, наряду с его регуляторными эффектами следует оценивать и его связь с экспрессией генов (eQTL значение). В таблице 2 представлена информация о публично доступных eQTL базах данных, позволяющих оценить связь полиморфизма

с экспрессией генов [26]. В качестве примера остановимся на характеристиках некоторых из них. С помощью данных онлайн программы Blood eQTL browser [25] (http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/), основанных на eQTL анализе нетрансформированных образцов периферической крови 5311 индивидуумов, могут быть оценены ассоциации исследуемых SNPs с уровнем экспрессии генов в периферической крови (*cis*- и *trans*-eQTL). При локализации SNP от гена на расстоянии до 250 kb его эффекты оценивались как *cis*-eQTL, а при расположении полиморфизма от гена на дистанции более чем 5Mb – как *trans*-eQTL. Для оценки значимости полученных данных используется показатель False Discovery Rate (FDR). Статистически значимыми считаются данные с уровнем значимости $p<5*10^{-5}$, $p_{FDR}\leq 0.05$.

С использованием данных проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx) [27], основанных на результатах анализа экспрессии генов (341316 eGenes – eQTL для 27159 уникальных генов) в 10294 образцах из 48 органов и тканей (не менее 70 образцов из каждого органа или ткани) 620 индивидуумов и представленных в онлайн программе GTExportal на 10.12.2017 (Release V7 updated on 09/05/2017) (dbGaP Accession phs000424.v7.p2) (http://www.gtexportal.org/), может быть изучен экспрессионный потенциал (*cis*-eQTL) исследуемых SNP в различных органах и тканях и в том числе патогенетически значимых для развития данного многофакторного признака (заболевания). Для идентификации значимых eQTL применяется показатель False Discovery Rate (FDR) (статистически значимыми считаются результаты с $p<8*10^{-5}$, $p_{FDR}\leq 0.05$). С помощью данного онлайн сервиса можно оценить влияние аллельных вариантов рассматриваемого полиморфизма на уровень экспрессии определенного гена – на основе оценки коэффициента линейной регрессии (β), характеризующего изменение нормализованного показателя генной экспрессии на один полиморфный (альтернативный) генетический вариант.

Следует отметить, что при выборе полиморфных локусов для исследования особое внимание следует уделять рассмотрению вопроса о функциональной роли полиморфизма данного гена-кандидата в органе или ткани, вовлеченных в формирование исследуемого многофакторного признака (заболевания), т.е. рассматривать регуляторный потенциал SNPs с учетом дифференциальной экспрессии генов-кандидатов в органах (тканях) - мишенях. Данный подход к отбору полиморфных локусов для ассоциативного анализа в РФ активно развивается научным коллективом из Томского НИИ медицинской генетики под руководством член-корр. РАН В.А. Степанова. Используя данный подход, ученые из этого научного коллектива отобрали для генетико-эпидемиологического исследования преэклампсии 46 регуляторных полиморфных вариантов 21 дифференциально экспрессируемых в плаценте генов-кандидатов [1, 7]. Как указывают авторы, примененный ими новый подход поиска генетических маркеров мультифакториальных заболеваний, основанный на комбинации геномных, транскриптомных и биоинформатических подходов (заключается в выборе дифференциально экспрессируемых генов на основании полногеномного анализа транскриптома плацентарной ткани по результатам собственного исследования и ранее опубликованных данных, биоинформатического поиска полиморфных маркеров в регуляторных участках этих дифференциально экспрессируемых генов, анализе ассоциаций с преэклампсией методом случай-контроль) способен обнаружить новые потенциальные генетические маркеры в генах, предположительно вовлеченных в патогенез заболевания, которые, вероятно, входят в состав “упущенной наследуемости” при мультифакториальных заболеваниях и не могут быть выявлены при геномном анализе [1].

Следует отметить, что при оценке функционального значения SNP важно так-

же учитывать не только его самостоятельные эффекты (эпигенетические эффекты данного полиморфизма и его связь с экспрессией генов) но и функциональное значение полиморфных локусов, находящихся с ним в неравновесии по сцеплению (при выделении определенного уровня силы сцепления $r^2 \geq 0.2$-0.8) т.к. именно эти сильно сцепленные с рассматриваемым SNP полиморфные локусы, как правило, будут демонстрировать наиболее значимые регуляторные эффекты в сравнении с функциональными эффектами этого одного SNP. Так, например, с отобранными нами для генетико-эпидемиологического исследования возраста менархе у населения России 52 полиморфными локусами оказались сильно сцеплены ($r^2 \geq 0.8$) около 1000 SNPs (n=980), при этом их регуляторные эффекты, влияние на экспрессию генов, связь с несинонимическими заменами были существенно выше нежели 52 SNPs, изначально включенных в ассоциативное исследование (наши неопубликованные данные).

В настоящее время одной из наиболее продуктивных стратегий создания панели генетических маркеров для анализа ассоциаций с мультифакториальными заболеваниями является выбор tagger SNP (tagSNP) с целью расширения «генетического охвата» [2]. Как указывается в работе Трифоновой Е.А. и др. [2], подход с использованием tagSNPs имеет преимущества в связи с известными на сегодняшний день знаниями о блочной структуре LD организации генома человека и существенно редуцирует силы и средства, необходимые для генотипирования. В работе Хаджиевой М.Б. и др. [4] отмечается, что стратегия применения tagSNPs основана на блочной структуре генома, каждый такой блок включает в себя соседние или близко расположенные аллели, наследуемые совместно чаще, чем это можно ожидать при случайном распределении; данное явление известно как неравновесное сцепление (linkage disequilibrium, LD). SNP с частотой минорного аллеля (MAF) не менее 5% маркирует соответствующий гаплотипический блок при условии, что он находится в пороговой корреляции хотя бы с одним SNP из данного блока ($D' \geq 0.8$). Исследование tagSNPs из каждой группы сцепления обеспечивает покрытие всего гена.

Подбор tagSNPs может быть выполнен в программе HaploView (version 4.2) (https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview), которая определяет гаплотипическую структуру гена для конкретной популяции, основываясь на данных проекта HapMap (haplotype map) (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/). Наряду с этим tagSNPs могут быть оценены с помощью программного обеспечения SNPinfo Web Server National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) – LD TAG SNP Selection (TagSNP) (https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snptag.html) с использованием данных International HapMap (phase III) и базы dbSNP для различных популяций на основе оценки неравновесия по сцеплению (LD) между парами SNPs (при максимальной дистанции между SNP для определения LD 250kb) с заданным порогом r^2 (например, $r^2 \geq 0.8$). В настоящее время данная стратегия выбора полиморфных маркеров для анализа ассоциаций полиморфизма с развитием мультифакториальных заболеваний активно используется различными коллективами ученых и в том числе отечественными генетиками [2, 4].

В исследовании Трифоновой Е.А. и др. [2] в качестве маркеров для изучения паттернов LD были выбраны 12 SNPs ген метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR),* относительно равномерно охватывающие все участки гена (экзоны, интроны, 3'-нетранслируемые участки) при частоте минорного аллеля в большинстве локусов не менее 5% (по данным базы NCBI). Для выделения tagSNPs авторы использовали два метода – «STAMPA» и «Tagger». Согласно полученным авторами результатам, при заданном пороге прогностической ценности в различных популяциях наблюдаются неодинаковые наборы tagSNPs, что, по мне-

нию авторов, вероятно, обусловлено варьированием структуры LD и гаплотипического разнообразия гена MTHFR в выборках. Вопрос о возможности «переноса» tagSNPs с одной популяции на другую довольно важен, так как анализ ассоциаций с использованием tagSNPs, идентифицированных на основании данных проекта HapMap, весьма актуален. Авторы отмечают, что качество выбранных tagSNPs зависит от исходного массива, в котором они охарактеризованы. Если изначально плотность маркеров слишком редкая, то выбранный tagSNP «захватит» меньше информации, чем требуется для анализа. Необходимая плотность маркеров в исходном массиве данных варьирует в различных участках генома в зависимости от ряда показателей, таких, например, как уровень рекомбинации, структура LD, частоты SNP, характер мутации и демографическая история населения [2]. Следует отметить, что на выбор tagSNP наряду с количеством анализируемых SNP (плотность маркеров) значимое влияние оказывают используемый при этом алгоритм выделения гаплоблоков («Confidence intervals», «Solid spine of LD» и др.) и выбранный порог оценки неравновесия по сцеплению ($D' \geq 0.75$, $D' \geq 0.80$ и др.)

В работе Хаджиевой М.Б. и др. [4], посвященной изучению полиморфизма генов, контролирующих процессы эластогенеза, и риска развития пролапса тазовых органов у женщин, в связи с отсутствием для генов *FBLN3* и *LOXL1* известных функциональных полиморных вариантов, был использован подход, заключающийся в подборе таргетных (tagger) SNPs. Авторы с помощью программы HaploView (version 4.2) используя данные для популяций CEU + TSI (CEU – американцы европейского происхождения, TSI – жители Тосканы) из проекта “HapMap” отобрали для исследования 3 tagSNPs гена *LOXL1* (rs2165241, rs2304719, rs893821) и 4 SNPs гена *FBLN3* (rs3791679, rs1367228, rs3791660 и rs2033316), из которых все, кроме rs1367228, являются таргетными.

Таким образом, согласно современным представлениям при отборе полиморфных локусов генов-кандидатов для изучения ассоциаций с мультифакториальным признаком (заболеванием) следует учитывать следующие критерии: 1) наличие ассоциации с исследуемым признаком по результатам ранее проведенных полногеномных (GWAS) и/или ассоциативных (в том числе репликативных) исследований; 2) наличие ассоциации с фенотипами, имеющими с исследуемым признаком, общие биологические пути; 3) регуляторный потенциал (regSNP); 4) влияние на экспрессию генов (eSNP); 5) связь с несинонимическими заменами (nsSNP); 6) tagger SNP (tagSNP) 7) частота полиморфизма не менее 5% 8) функциональные эффекты (regSNP, eSNP, nsSNP) SNPs, находящихся в неравновесии по сцеплению ($r^2 \geq 0.8$) с отобранными для ассоциативного анализа полиморфизмами.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Выявление новых маркеров предрасположенности к преэклампсии путем анализа регуляторных участков генов, дифференциально экспрессирующихся в плацентарной ткани / В.Н. Сереброва [и др.] // Молекулярная биология. 2016. Т. 50, N 5. С. 870-879.

2. Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению гена MTHFR в популяциях Северной Евразии / Е.А. Трифонова [и др.] // Acta naturae. 2012. Т.4, N 1(12). С. 55-71.

3. Исследование молекулярно-генетических маркеров роста человека / А.С. Глотов [и др.] // Экологическая генетика. 2012. Т. X, N 4. С. 77-84.

4. Полиморфизм генов, контролирующих процессы эластогенеза, и риск развития пролапса тазовых органов у женщин / М.Б. Хаджиева [и др.] // Генетика. 2015. Т. 51, N 10. С. 1191.

5. Пузырев В.П. Генетические основы коморбидности у человека // Генетика. 2015. Т. 51, N 4. С. 491.

6. Пузырев В.П., Кучер А.Н. Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека // Генетика. 2011. Т. 47, N 12. С. 1573-1585.

7. Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией / Е.А. Трифонова [и др.] // Acta naturae. 2014. Т.6, N 2(21). С. 77-90.

8. Хусаинова Р.И. Молекулярно-генетические основы метаболических остеопатий: автореф. дис. … д-ра. биол. наук. Уфа, 2015. 48 с.

9. A comprehensive contribution of genes for aryl hydrocarbon receptor signaling pathway to hypertension susceptibility / A.V. Polonikov [et al.] // Pharmacogenet Genomics. 2017. Vol. 27(2). P. 57-69. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000261.

10. A large-scale candidate-gene association study of age at menarche and age at natural menopause / C. He [et al.] // Hum. Genet. 2010. N 128. P. 515-527.

11. A method and server for predicting damaging missense mutations / I.A. Adzhubei [et al.] // Nature methods. 2010. Vol. 7(4). P. 248-249. DOI: 10.1038/nmeth0410-248.

12. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB / A.P. Boyle [et al.] // Genome Research. 2012. Vol. 22(9). P. 1790-1797. PMID: 22955989.

13. Association of adiposity genetic variants with menarche timing in 92,105 women of European descent / L. Fernandez-Rhodes [et al.] // Am. J. Epidemiol. 2013. N 178. P. 451-460.

14. Candidate-gene association study of mothers with pre-eclampsia, and their infants, analyzing 775 SNPs in 190 genes / K.A. Goddard [et al.] // Hum. Hered. 2007. Vol. 63(1). P. 1-16.

15. Evaluation of GWAS-identified genetic variants for age at menarche among Chinese women / R.J. [et al.] // Hum Reprod. 2013. N 4. P. 1135-43.

16. Fibulin-5 (FBLN5) gene polymorphism is associated with pelvic organ prolapse / M.B. Khadzhieva [et al.] // Maturitas. 2014. Vol. 78(4). P. 287-92. DOI: 10.1016/j.maturitas.2014.05.003. Epub 2014 May 13.

17. Functional analysis of genetic variation in catechol–o–methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein enzyme activity in postmortem human brain / J. Chen [et al.] // Am J Hum Genet. 2004. N 75. P. 807-821.

18. Kumar P., Henikoff S., Ng P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm // Nat Protoc. 2009. Vol. 4(7). P. 1073-81.

19. Novel Polymorphism in the Promoter of the CYP4A11 Gene Is Associated with Susceptibility to Coronary Artery Disease / S. Sirotina [et al.] // Dis Markers. 2018. N. 2018. P. 5812802. DOI: 10.1155/2018/5812802. eCollection 2018.

20. On the identification of potential regulatory variants within genome wide association candidate SNP sets / C. Chen [et al.] // BMC Medical Genomics. 2014. N 7. P. 34. DOI: 10.1186/1755-8794-7-34.

21. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche / J.R. Perry [et al.] // Nature. 2014. N 514. P. 92-97.

22. Polymorphism rs3828903 within MICB Is Associated with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus in a Northern Han Chinese Population / Y. Zhang [et al.] // Journal of Immunology Research. 2016. N 2016. P. 1343760.

23. Riva A. Large-scale computational identification of regulatory SNPs with rSNP-MAPPER // BMC Genomics. 2012. Vol. 13(4). P. S7.

24. rSNPBase: a database for curated regulatory SNPs / L. Guo [et al.] // Nucleic Acids Res. 2014. Vol. 42(D1). P. D1033-D1039. DOI: 10.1093/nar/gkt1167.

25. Systematic identification of trans eqtls as putative drivers of known disease associations / H.J. Westra [et al.] // Nat Genet. 2013. N 45. P. 1238-1243.

26. Tak Y.G., Farnham P.J. Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome // Epigenetics & Chromatin. 2015. N 8. P. 57. DOI: 10.1186/s13072-015-0050-4.

27. The GTEx Consortium. Genetic effects on gene expression across human tissues // Nature. 2017. N 550. P. 204-213. DOI: 10.1038/nature24277.

28. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies / C.E. Elks [et al.] // Nat. Genet. 2010. N 42. P. 1077-1085.

29. Verification of the Chromosome Region 9q21 Association with Pelvic Organ Prolapse Using RegulomeDB Annotations / M.B. Khadzhieva [et al.] // BioMed Research International. 2015. N 2015. P. 837904. DOI: 10.1155/2015/837904.

30. Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // Nucleic Acids Res. 2016. N 44. P. D877-D881.

31. Ward L.D., Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation,

and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants // Nucleic Acids Res. 2012. N 40. P. D930-D934.

32. Xu Z., Taylor J.A. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies // Nucleic Acids Res. 2009. N 37. P. W600-5.

33. Yermachenko A., Dvornyk V. UGT2B4 previously implicated in the risk of breast cancer is associated with menarche timing in Ukrainian females // Gene. 2014. Vol. 590(1). P. 85-89.

References

1. Serebrova VN, Trifonova EA, Gabidulina TV, et al. Vyyavleniye novykh markerov predraspolozhennosti k preeklampsii putem analiza regulyatornykh uchastkov genov, differentsial'no ekspressiruyushchikhsya v platsentarnoy tkani [Identification of new markers of predisposition to pre-eclampsia by analyzing regulatory regions of genes differentially expressed in placental tissue]. Molekulyarnaya biologiya. 2016;50(5):870-879. Russian.

2. Trifonova EA, Eremina ER, Urnov FD, Stepanov VA. Geneticheskoye raznoobraziye i struktura neravnovesiya po stsepleniyu gena MTHFR v populyatsiyakh Severnoy Yevrazii [Genetic diversity and structure of disequilibrium in the MTHFR gene linkage in populations of Northern Eurasia]. Acta naturae. 2012;4(1(12)):55-71. Russian.

3. Glotov AS, Vashukova ES, Glotov OS, et al. Issledovaniye molekulyarno-geneticheskikh markerov rosta cheloveka [Investigation of molecular-genetic markers of human height]. Ekologicheskaya genetika. 2012;X(4):77-84. Russian.

4. Khadzhieva MB, Kamoeva SV, Ivanova AV, et al. Polimorfizm genov, kontroliruyushchikh protsessy elastogeneza, i risk razvitiya prolapsa tazovykh organov u zhenshchin [Polymorphism of genes controlling the processes of elastogenesis, and the risk of pelvic prolapse in women]. Genetika. 2015;51(10):1191. Russian.

5. Puzyrev VP. Geneticheskiye osnovy komorbidnosti u cheloveka [Genetic basis of comorbidity in humans]. Genetika. 2015;51(4):491. Russian.

6. Puzyrev VP, Kucher AN. Evolyutsionno-ontogeneticheskiye aspekty patogenetiki khronicheskikh bolezney cheloveka [Evolutionary-ontogenetic aspects of the pathogenetics of chronic human diseases]. Genetika. 2011;47(12):1573-1585. Russian.

7. Trifonova EA, Gabidulina TV, Ershov NI, et al. Kharakteristika transkriptoma platsentarnoy tkani u zhenshchin s fiziologicheskoy beremennost'yu i preeklampsiyey [Characteristics of the transcriptum of placental tissue in women with physiological pregnancy and preeclampsia]. Acta naturae. 2014;6(2(21)):77-90. Russian.

8. Khusainova RI. Molekulyarno-geneticheskiye osnovy metabolicheskikh osteopatiy [Molecular-genetic bases of metabolic osteopathies] [dissertation]. Ufa: Institute of Biochemistry and Genetics Ufa. sci. center of RAS; 2015. Russian.

9. Polonikov AV, Bushueva OY, Bulgakova IV, Freidin MB, Churnosov MI, Solodilova MA, Shvetsov YD, Ivanov VP. A comprehensive contribution of genes for aryl hydrocarbon receptor signaling pathway to hypertension susceptibility. Pharmacogenet Genomics. 2017 Feb;27(2):57-69. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000261.

10. He C, Kraft P, Buring JE, et al. A large-scale candidate-gene association study of age at menarche and age at natural menopause. Hum. Genet. 2010;128:515-527.

11. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nature methods. 2010;7(4):248-249. DOI:10.1038/nmeth0410-248.

12. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, Karczewski KJ, Park J, Hitz BC, Weng S, Cherry JM, Snyder M. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. Genome Research. 2012;22(9):1790-1797. PMID: 22955989.

13. Fernandez-Rhodes L, Demerath EW, Cousminer DL, et al. Association of adiposity genetic variants with menarche timing in 92,105 women of European descent. Am. J. Epidemiol. 2013;178:451-460.

14. Goddard KA, Tromp G, Romero R, et al. Candidate-gene association study of mothers with pre-eclampsia, and their infants, analyzing 775 SNPs in 190 genes. Hum. Hered. 2007;63(1):1-16.

15. Delahanty RJ, Beeghly-Fadiel A, Long JR, et al. Evaluation of GWAS-identified genetic variants for age at menarche among Chinese women. Hum Reprod. 2013;4:1135-43.

16. Khadzhieva MB, Kamoeva SV, Chumachenko AG, Ivanova AV, Volodin IV, Vladimirov IS, Abilev SK, Salnikova LE. Fibulin-5 (FBLN5) gene polymorphism is associated with pelvic organ prolapse. Maturitas. 2014 Aug;78(4):287-92. DOI: 10.1016/j.maturitas.2014.05.003. Epub 2014 May 13.

17.Chen J, Lipska BK, Halim N, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol–o–methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein enzyme activity in postmortem human brain. Am J Hum Genet. 2004;75:807-821.

18.Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc. 2009;4(7):1073-81.

19.Sirotina S, Ponomarenko I, Kharchenko A, Bykanova M, Bocharova A, Vagaytseva K, Stepanov V, Churnosov M, Solodilova M, Polonikov A. A Novel Polymorphism in the Promoter of the CYP4A11 Gene Is Associated with Susceptibility to Coronary Artery Disease. Dis Markers. 2018 Feb 1;2018:5812802. DOI: 10.1155/2018/5812802. eCollection 2018.

20.Chen C, Chang I-S, Hsiung CA, Wasserman WW. On the identification of potential regulatory variants within genome wide association candidate SNP sets. BMC Medical Genomics. 2014;7:34. DOI: 10.1186/1755-8794-7-34.

21.Perry JRB, Day F, Elks CE, et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. Nature. 2014;514:92-97.

22.Zhang Y, Zhou X, Cheng F, et al. Polymorphism rs3828903 within MICB Is Associated with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus in a Northern Han Chinese Population. Journal of Immunology Research. 2016;2016:1343760.

23.Riva A. Large-scale computational identification of regulatory SNPs with rSNP-MAPPER. BMC Genomics. 2012;13(4):S7.

24.Guo L, Du Y, Chang S, Zhang K, Wang J. rSNPBase: a database for curated regulatory SNPs. Nucleic Acids Res. 2014;42(D1):D1033-D1039. DOI: 10.1093/nar/gkt1167.

25.Westra HJ, Peters MJ, Esko T, et al. Systematic identification of trans eqtls as putative drivers of known disease associations. Nat Genet. 2013;45:1238-1243.

26.Tak YG, Farnham PJ. Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome. Epigenetics & Chromatin. 2015;8:57. DOI:10.1186/s13072-015-0050-4.

27.The GTEx Consortium. Genetic effects on gene expression across human tissues. Nature. 2017 Oct;550:204-213. Epub 11 Oct 2017. DOI: 10.1038/nature24277.

28.Elks CE, Perry JRB, Sulem P, et al. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. Nat. Genet. 2010;42:1077-1085.

29.Khadzhieva MB, Kolobkov DS, Kamoeva SV, Ivanova AV, Abilev SK, Salnikova LE. Verification of the Chromosome Region 9q21 Association with Pelvic Organ Prolapse Using RegulomeDB Annotations. BioMed Research International. 2015;2015:837904. DOI: 10.1155/2015/837904.

30.Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. Nucleic Acids Res. 2016;44:D877-D881.

31.Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. Nucleic Acids Res. 2012;40:D930-D934.

32.Xu Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. Nucleic Acids Res. 2009;37:W600-5.

33.Yermachenko A, Dvornyk V. UGT2B4 previously implicated in the risk of breast cancer is associated with menarche timing in Ukrainian females. Gene. 2014;590(1):85-89.

Пономаренко Ирина Васильевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник кафедры биологии, медицинской генетики и экологии.

Ponomarenko Irina Vasilievna, Candidate of Medical Sciences, Research Associate, Department of Biology, Medical Genetics and Ecology.

Статья поступила в редакцию 10 октября 2017 г.

УДК 616.891:613.865:613-867 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-6**

Руженкова В.В.

УЧЕБНЫЙ СТРЕСС КАК ФАКТОР РИСКА ФОРМИРОВАНИЯ АДДИКТИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ, ТРЕВОЖНЫХ И ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ У ИНОСТРАННЫХ СТУДЕНТОВ МЕДИКОВ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»),
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85
E-mail: ruzhenkova@bsu.edu.ru

Аннотация. *Актуальность.* Студенты, обучающиеся за рубежом, испытывают трудности в адаптации к нормам и ценностям принимающей культуры. Кроме того, высокая учебная нагрузка, сопровождающаяся стрессом, нередко формирует депрессию и дезадаптивные состояния. *Цель исследования.* Изучение особенностей адаптации за трехлетний период обучения иностранных студентов, не владеющих русским языком, в медицинском институте в России, для разработки рекомендаций по повышению стрессоустойчивости и первичной психопрофилактике. *Материалы и методы.* Обследована сплошная выборка из 166 студентов 1-3 курсов в возрасте 17-29 (20.8±1.8) лет (137 лиц мужского и 29 женского пола) прибывших из Индии и стран Ближнего Востока, не владеющие русским языком и обучающиеся на английском языке в медицинском институте. Методы исследования: медико-социологический, психометрический и статистический. *Результаты*. Более половины студентов испытывали затруднения к адаптации. Значимыми были: языковый барьер, непривычная еда и климатические условия, большая учебная нагрузка, жизнь вдали от родителей, трудности в организации режима дня. У 44% первокурсников наблюдалась эмоциональная подавленность и суицидальные мысли. В связи с учебой 77% и 89% студентов 1 и 2 курса спали менее 7 часов в сутки. Студенты не уделяли должного внимания питанию: 1-2 раза в день принимали пищу 67.8% студентов 1 курса, 37.8% – второго и 29.7% – третьего. Горячую пищу только один раз в день принимали соответственно 50% – 20% и 16.2% студентов. Симптомы социофобии имели место у 45.2% – первокурсников, 32,3% – на втором курсе и 18,9% – третьем. Депрессия была у 31% первокурсников, у 17.8% и 10.8% у студентов 2 и 3 курсов. Тревога наблюдалась у 50% – 35.6% – 35.1% и стресс у 29.8% – 15.6% и 10.8%. Для преодоления стресса 19% студентов первого и 43,2% – третьего курсов употребляли алкогольные напитки. Более половины – принимали седативные микстуры и нерецептурные успокоительные. *Заключение.* Целесообразно проведение обучающих семинаров-тренингов по «Тайм-менеджменту» и «Стресс-менеджменту». Это позволит повысить уровень адаптивных способностей студентов и предупредить развитие психосоматических расстройств.

Ключевые слова: студенты-медики; учебная миграция; адаптация; стресс; тревога; депрессия; суицидальные мысли.

Информация для цитирования: Руженкова В.В. Учебный стресс как фактор риска формирования аддиктивного поведения, тревожных и депрессивных рас-

стройств у иностранных студентов медиков // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С.55-68. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-6

V.V. Ruzhenkova

EDUCATIONAL STRESS AS A FACTOR OF THE RISK OF FORMATION OF ADDITIVE BEHAVIOR, ALERT AND DEPRESSIVE DISORDERS IN FOREIGN MEDICAL STUDENTS

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, Russia, 308015
E-mail: ruzhenkova@bsu.edu.ru

Abstract. *Background*. Students receiving their education abroad experience problems associated with adaptation to the values of local culture. Moreover, very often a large educational load and stress lead to the formation of depression disorders and maladaptation. *The aim of the study.* To study some features of adaptation of non-Russian-speaking foreign students during their first three years of study at a medical institute in Russia and to develop recommendations for increasing stress resistance and primary prevention. *Materials and methods.* We examined 166 medical students (137 men and 29 women) of 1-3 years of study at the age of 17-29 (20.8±1.8). All students came to Russia from India and the Middle East countries. They do not speak Russian and are taught in English. We used medical-sociological, psychometric and statistical methods. *Results.* More than a half of the students have problems with adaptation. The most significant of them are the language barrier, unusual food and climate conditions, a large educational load, a life away from parents, difficulties in organizing the schedule. About 44% of first-year students have low spirits and suicidal thoughts. Most first-year students (77%) and second-year students (89%) sleep less than 7 hours a day because of their studies. All students do not eat enough. The meals are taken 1-2 times a day by 67.8% of the first-year students, 37.8% by the second-year students and 29.7% by the third-year students. Only a half of the first-year students, 20% of the second-year students and 16.2% of the third-year students take hot meals once a day. Sociophobia symptoms are revealed in 45.2% of the first year-students, 32.3% of the second-year students, and 18.9% of the third-year students. Depression was registered in 31% of the first year-students, 17.8% of the second-year students and 10.8% of the third-year students. A half of the first-year students, 35.6% of the second year-students, and 35.1% of the third-year students have a high level of anxiety. From 10.8% to 29.8% of students constantly experienced stress. From 19% to 43.2% of students use alcohol to deal with stress. The other 20-35% of students smoke tobacco for the same purpose. More than a half of students take sedatives. Such ways of overcoming stress create the risk of forming addictive behavior. *Conclusion.* It is advisable to introduce training seminars on "Time Management" and "Stress Management" to the educational process. This will increase the level of adaptive abilities of students and prevent the development of psychosomatic disorders.

Keywords: medical students; educational migration; adaptation; stress; anxiety; depression; suicidal thoughts; addictive behavior.
Information for citation: Ruzhenkova VV. Uchebnyy stress kak faktor riska formirovaniya addiktivnogo povedeniya, trevozhnykh i depressivnykh rasstroystv u inostrannykh studentov medikov [Educational stress as a factor of the risk of formation

of additive behavior, alert and depressive disorders in foreign medical students]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):55-68. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-6

Студенты, выезжающие на обучение в другие страны и временно в них пребывающие, испытывают ряд эмоциональных трудностей в условиях начальной адаптации к нормам и ценностям принимающей культуры [16]. Степень их интеграции в новой культурной среде зависит от национальных, религиозных и климато-географичских различий, а также индивидуальных особенностей [3]. Наряду с этим меняются бытовые условия и возникают новые требования к учебной адаптации [19]. Существенную роль играет и миграционный стресс, связанный с отсутствием знакомой среды и отсутствии поддержки родных [24].

Наиболее стрессогенными для иностранных студентов оказались большой объем учебного материала [1], климат и языковый барьер [4]. Как правило, только к концу третьего курса иностранные студенты достигают значительных успехов в овладении языком, обретают достаточный словарный запас и начинают активно использовать свои знания. Если внешние факторы родной и чужой страны имеют значительные отличия (климат, география и др.), адаптация проходит тяжелее [7, 8].

Проблемы адаптации в иноязычной среде особенно касаются студентов медиков, так как учебная нагрузка у них в среднем в 2 раза выше, чем у учащихся других ВУЗов [6], а учебный процесс относится к числу напряженных в эмоциональном плане видов труда, что отражается на уровне их психического и соматического здоровья [27].

У студентов медиков регистрируется высокий уровень учебного стресса [20], приводящего у подавляющего большинства – 83% студентов медиков к возникновению суицидальных мыслей; при этом у 66% они возникают часто и у 17% – изредка. Более того [26], у поступающих в медицинские институты изначально наблюдаются высокая частота стресса, тревоги и депрессии. В период учебы большая подверженность развитию тревоги и депрессии выявлена у лиц женского пола [23]. Для преодоления стресса студенты употребляли психоактивные вещества: наркотики, алкоголь, табакокурение [10, 15]. Студенты первокурсники испытывают больший уровень стресса, чем второкурсники [5, 21, 22], что способствует развитию депрессии и внутренних форм суицидального поведения.

Наибольший стресс у студентов вызывали давление со стороны преподавателей, большие объемы изучаемой информации, недостаток времени для повторения материала, неполучение ожидаемых оценок, жесткий распорядок дня, а также недостаточность навыков планирования времени и самодисциплины, неспособность устанавливать приоритеты [9, 17]. Стрессовое состояние студентов негативно сказывается на трудоспособности, в результате ухудшается посещаемость занятий и успеваемость [2, 18].

Целью исследования было изучение динамики за трехлетний период реагирования на сочетанный стресс (миграционный и учебный) иностранных студентов, не владеющих русским языком в период обучения на английском языке в медицинском институте в России для разработки рекомендаций по повышению стрессоустойчивости и первичной психопрофилактике.

Материал и методы исследования

Обследована сплошная выборка, состоящая из 166 студентов 1-3 курсов в возрасте 17-29 (20.8±1.8) лет (137 лиц мужского и 29 женского пола) прибывших из Индии и стран Ближнего Востока, не владеющие русским языком и обучающиеся на языке посреднике (английском) в медицинском институте. Обследование проводилось в апреле (на 1 курсе – на 8 месяце обучения, на втором – спустя 1 год и 8 месяцев и на третьем – спустя 2 года и 8 месяцев).

Основными методами обследования были:

1. Медико-социологический (анонимное анкетирование при помощи авторской анкеты, содержащей социально-демографическую информацию, вопросы, касающиеся адаптации к новым условиям проживания, отношения к выбранной специальности, условий обучения и проживания).

2. Психометрический:

- тест на учебный стресс [9];
- опросник «GAD-7» [25];
- опросник DASS-21 – The Depression Anxiety Stress Scale-21 [14];
- опросник FSI-14 – Fatigue Symptom Inventory [13];
- SPIN-тест на социофобию [12];

3. Статистический (методы непараметрической статистики: описательная статистика, медиана, интерквартильный размах; при сравнении двух групп по бинарному признаку применялся критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность, при сравнении двух независимых групп использовался U-тест Манна-Уитни, факторный анализ с varimax вращением фактора).

Результаты исследования и обсуждение

Большинство студентов всех курсов (73-76%) поступили в медицинский институт по собственному убеждению и только 16-23% по совету родителей. Поступивших случайно или по совету знакомых было от 1.2% до 5.4%.

Объективизация точки зрения студентов на степень сложности адаптации в первые месяцы после приезда на учебу в Россию показала, что более трети – 36.9% первокурсников оценили тяжесть адаптации в 50-70 баллов, а 20.2% – в 80-100 баллов. Другими словами, более половины студентов (57.1%) первого курса испытывают серьезные затруднения в адаптации в первые месяцы обучения в иноязычной стране. Гендерные различия не выявлены.

Среди факторов, обусловливающих наибольшие трудности для адаптации был языковый барьер – для 75.6-75.7% студентов 2 и 3 курса и 64.3% – первого. На втором месте – непривычная пища и иные климатические условия.

Миграционный и учебный стресс в первые месяцы пребывания на территории другой страны обусловливал возникновение эмоциональной подавленности и суицидальных мыслей у 44% первокурсников. Такой высокий уровень суицидальных мыслей у студентов иностранцев первого курса требует тщательного внимания со стороны кураторов групп в аспекте предоставления необходимой помощи в адаптации, в том числе и психологической.

Верификация субъективной оценки сложности обучения в медицинском институте показала, что на первом курсе немногим более 40% студентов испытывали средней степени выраженности затруднения в освоении учебного материала со снижением этой цифры на 2 и 3 курсах соответственно до 28.9% и 21.6% (χ^2=4.13 df=1 p=0.042). Серьезные трудности в учебе испытывали незначительное число студентов (от 8.3% на первом до 5.4% третьем курсах).

Значительная часть студентов первого (77.4%) и второго (88.9%) курсов спали менее 7 часов в сутки. Более половины – 51.2% первокурсников, 64.4% – второго и 45.9% – третьего курса ложились спать в 01 час ночи и позже. Это не позволяло полностью восстановить силы и обусловливало повышенную усталость.

Установлено, что неправильное питание – прием пищи 1-2 раза в день было характерно для 67.8% студентов 1 курса со снижением этой цифры на 2 курсе до 37.8% (χ^2=9.65 p=0.003; OR=3.5 95%CI=1.6-8.0) и на третьем – 29.7%. Горячую пищу 1 раз в день принимала половина (50%) первокурсников, 20% (χ^2=9.81 df=1 p=0.0026; OR=4.0 95%CI=1,6.10,2) студентов второго и 16.2% – третьего курса. Другими словами, по мере адаптации к учебе режим питания улучшался.

Сравнительная характеристика степени субъективной значимости учебных стрессовых факторов (таблица 1) показал,

что для студентов первого курса наиболее стрессогенными были: отсутствие учебников, большая учебная нагрузка, нерегулярное питание, жизнь вдали от родителей, трудности в организации режима дня и проблемы с другими студентами при совместном проживании в общежитии. Степень значимости указанных стрессовых факторов у студентов первого курса была статистически значимо выше, чем у второго.

Таблица 1

Значимость учебных стрессовых факторов в баллах от 1 до 10 (критерий Манна-Уитни)

Table 1

The significance of stressful learning factors in points from 1 to 10 (the Mann-Whitney criterion)

№ п/п	Учебные стрессовые факторы	1 курс		2 курс		1-2к p=	3 курс		1-3 к p=
		Me	Q_{25-75}	Me	Q_{25-75}		Me	Q_{25-75}	
1	Строгие преподаватели	5.0	2.0-7.0	5.0	3.0-7.0	***	5.0	3.0-6.0	***
2	Большая учебная нагрузка	**6.0**	4.0-8.0	**5.0**	4.0-6.0	0.015	**4.0**	3.0-6.0	0,003
3	Отсутствие учебников	**7.0**	4.0-9.0	**4.0**	2.0-6.0	0.0003	5.0	2.0-8.0	***
4	Непонятные, скучные учебники	4.5	2.0-6.0	4.0	1.0-5.0	***	3.0	2.0-5.0	0,015
5	Жизнь вдали от родителей	**5.0**	3.0-8.0	**5.0**	2.0-6.0	0.046	**3.0**	2.0-5.0	***
6	Нехватка денег	3.0	1.0-5.0	3.0	1.0-6.0	***	3.0	1.0-5.0	***
7	Трудности организации режима дня	**5.0**	3.0-7.0	**4.0**	2.0-5.0	0.006	**3.0**	1.0-5.0	0,0003
8	Нерегулярное питание	**6.0**	3.0-9.0	**4.0**	2.0-6.0	0.003	**4.0**	2.0-6.0	0,003
9	Проблемы проживания в общежитии	**4.0**	0.0-6.0	**1.0**	0.0-4.0	0.011	**1.0**	0.0-4.0	0,04
10	Конфликты в группе	2.0	0.0-4.0	1.0	0.0-3.0	***	2.0	0.0-3.0	***
11	Много времени готовиться к занятиям	**5.0**	3.0-7.0	**2.0**	1.0-4.0	0.0001	**1.5**	0.0-3.0	0,0000
12	Нежелание учиться	1.0	0.0-4.0	2.0	0.0-3.0	***	1.0	0.0-3.0	***
13	Разочарование в будущей профессии	1.0	0.0-3.0	1.0	0.0-3.0	***	0.0	0.0-4.0	***
14	Стеснительность, застенчивость	2.0	0.0-5.0	2.0	1.0-4.0	***	2.0	0.0-5.0	***
15	Страх перед будущим	***4.0***	2.0-6.0	4.0	1.0-5.0	***	**2.0**	0.0-5.0	0,013
16	Проблемы в личной жизни	***3.0***	1.0-5.0	1.0	0.0-5.0	***	**1.0**	0.0-3.0	0,009
17	Нерациональное расписание занятий	***5.0***	2.0-6.0	4.0	1.0-5.0	***	**1.0**	0.0-3.0	0,0000

№ п/п	Учебные стрессовые факторы	1 курс		2 курс		1-2к p=	3 курс		1-3 к p=
		Me	Q_{25-75}	Me	Q_{25-75}		Me	Q_{25-75}	
18	Много занятий в день	**5.0**	2.0-7.0	**3.0**	2.0-5.0	0.02	**2.0**	0.0-4.0	0,0000
19	Отработка пропущенных занятий	4.0	1.0-6.0	3.0	1.0-6.0	***	4.0	1.0-7.0	***

***Различия статистически не значимы. 1-2к – сравнение 1 и 2 курсов, 1-3к – сравнение первого и третьего курсов, 2-3к – сравнение второго и третьего курсов.

По мере адаптации, на втором и третьем курсах эти проблемы становились менее значимыми. Кроме того, у первокурсников, по сравнению со студентами 3 курса, существенное стрессогенное влияние имели страх перед будущим (неопределенность) и проблемы в личной жизни (разрыв контактов с друзьями).

Между вторым и третьим курсами статистически значимые различия выявлены по параметрам: нерациональное расписание занятий (p=0.001) и большое количество занятий в день (p=0.045), имеющих более важное значение для студентов 2 курса.

Факторный анализ выявил 6 значимых факторов (таблица 2) учебного стресса для студентов первого курса (68.8% дисперсии). Доминировали напряженный график учебы и определенная растерянность, субъективно воспринимаемая как «разочарование в профессии» в силу непонимания на первых порах взаимосвязи между общеобразовательными дисциплинами и врачебной профессией. Наряду с этим важно значение имели трудности в освоении учебного материала, сложности в планировании режима дня. Отдельно следует сказать о тоске по дому и проблемах в адаптации к совместному проживанию в общежитии в одной комнате с другими студентами.

Сравнительный анализ степени выраженности симптомов учебного стресса (таблица 3) показал, что для студентов первого курса, по сравнению со вторым, наиболее выраженными были спешка, ощущение нехватки времени, страх и тревога, а также низкая работоспособность. Значимыми симптомами для 1 и 2 курсов были плохой сон и расстройства внимания.

Таблица 2

Наиболее значимые факторы учебного стресса для иностранных студентов 1 курса

Table 2

The most significant factors of educational stress for foreign first-year students

№ п/п	Наименование фактора	Составляющие фактора	% дисперсии
1	**Напряженный график учебы**	Строгие преподаватели (0.875)	**27.7**
		Большая нагрузка (0.866)	
		Много готовить (0.723)	
2	**Растерянность**	Разочарование в профессии (0.869)	**12.5**
3	**Трудности в понимании материала**	Непонятные учебники (0.761)	**8.9**
4	**Затруднения планирования времени**	Нерациональное расписание (0.844)	**7.6**
		Трудности режима дня (0.762)	
5	**Тоска по дому**	Жизнь вдали от родителей (0.821)	**6.3**
6	**Бытовой стресс**	Проблемы совместного проживания в общежитии (0.802)	**5.8**

Таблица 3

Структура и выраженность (в баллах от 1 до 10) симптомов учебного стресса (критерий Манна-Уитни)

Table 3

Structure and severity (in points from 1 to 10) of the symptoms of learning stress (the Mann-Whitney test)

№ п/п	Симптомы учебного стресса	1 курс		2 курс		1-2к p=	3 курс		1-3к p=
		Me	**Q_{25-75}**	**Me**	**Q_{25-75}**		**Me**	**Q_{25-75}**	
1	Ощущение беспомощности	***3.0***	1.0-5.0	2.0	0.0-4.0	***	***1.0***	0.0-3.0	0.0016
2	Наплывы посторонних мыслей	***3.0***	1.0-5.0	2.0	1.0-4.0	***	***1.0***	0.0-3.0	0.0062
3	Плохая концентрация внимания	***4.0***	1.0-5.0	3.0	1.0-5.0	***	***1.0***	0.0-2.0	0.0001
4	Раздражительность, обидчивость	***3.0***	0.0-4.5	2.0	0.0-4.0	***	***1.0***	0.0-3.0	0.0338
5	Плохое настроение, депрессия	***3.0***	1.0-5.0	2.0	1.0-4.0	***	***1.0***	0.0-2.0	0.0033
6	Страх, тревога	***3.0***	1.0-5.0	**1.0**	0.0-3.0	0.0008	***1.0***	0.0-2.0	0.0013
7	Потеря уверенности, снижение самооценки	***2.0***	0.0-5.0	1.0	0.0-3.0	***	***1.0***	0.0-2.0	0.0180
8	Спешка, ощущение нехватки времени	***4.0***	2.0-7.0	**3.0**	1.0-5.0	0.022	***1.0***	0.0-4.0	0.0002
9	Плохой сон	***4.0***	1.0-6.0	3.0	0.0-6.0	***	***2.0***	0.0-4.0	0.0025
10	Проблемы в общении с преподавателями	2.0	0.0-5.0	2.0	0.0-4.0	***	3.0	1.0-5.0	***
11	Учащенное сердцебиение, боли в сердце	0.0	0.0-3.0	0.0	0.0-1.0	***	0.0	0.0-1.0	***
12	Затрудненное дыхание	0.0	0.0-3.0	0.0	0.0-1.0	***	0.0	0.0-1.0	***
13	Проблемы с желудочно-кишечным трактом	0.0	0.0-3.0	0.0	0.0-1.0	***	0.0	0.0-1.0	***
14	Напряжение или дрожание мышц	1.0	0.0-3.0	0.0	0.0-2.0	***	0.0	0.0-1.0	***
15	Головные боли	***3.0***	1.0-6.0	2.0	0.0-3.0	***	***1.0***	0.0-2.0	0.002
16	Низкая работоспособность, утомляемость	***3.0***	1.0-6.0	**1.0**	0.0-3.0	0.004	***0.0***	0.0-2.0	0.0000

***Различия статистически не значимы. 1-2к – сравнение 1 и 2 курсов, 1-3к – сравнение первого и третьего курсов.

Из таблицы 3 видно, что большинство психологических (ощущение беспомощности, наплывы посторонних мыслей, плохая концентрация внимания, раздражительность, обидчивость, плохое настроение, потеря уверенности, снижение самооценки, головные боли и низкая работоспособность) симптомов стресса были одинаково значимыми для студентов 1 и 2 курсов. В то же время их значимость для третьекурсников статистически достоверно снизилась.

При сравнении различий в степени выраженности симптомов учебного стресса между студентами 2 и 3 курсов статистиче-

ски значимые (p=0,004) различия выявлены по параметру расстройство внимания (более выраженное у второкурсников).

Факторный анализ выявил 2 значимых фактора: астеническая субдепрессия и психосоматические симптомы (таблица 4), отражающие симптомы учебного стресса у студентов 1 курса (58.1% дисперсии).

Среди способов совладания со стрессом существенное значение имели табакокурение, употребление алкоголя и наркотиков, а также лекарственных препаратов (таблица 5).

Таблица 4

Наиболее значимые факторы симптомов учебного стресса для иностранных студентов 1 курса

Table 4

The most significant factors of the symptoms of educational stress for foreign first-year students

№ п/п	Наименование фактора	Составляющие фактора	% дисперсии
1	**Астеническая субдепрессия**	Ощущение беспомощности (0.799)	**42.3**
		Наплывы посторонних мыслей (0.829)	
		Плохая концентрация внимания (0.736)	
		Плохое настроение. депрессия (0.717)	
		Страх. тревога (0.775)	
		Потеря уверенности. снижение самооценки (0.733)	
		Спешка. ощущение нехватки времени (0.821)	
2	**Психосоматические симптомы**	Учащенное сердцебиение. боли в сердце (0.861)	**15.8**
		Затрудненное дыхание (0.795)	
		Проблемы с желудочно-кишечным трактом (0.832)	
		Головные боли (0.728)	

Таблица 5

Количество студентов, склонных к химическим аддикциям и приему лекарственных препаратов, как способу преодоления стресса

Table 5

The number of students inclined to chemical addictions and taking medications as a way to overcome stress

Вещество	1 курс		2 курс		3 курс	
	n	%	n	%	n	%
Табак	25	29.8	9	20.1	13	35.1
Алкоголь	16	19.0	14	31.1	16	43.2
Наркотики	11	13.1	8	17.8	2	5.4
Лекарственные настойки (ЛН)	10	11.9	3	6.6	5	13.5
Нерецептурные седативные (НС)	18	21.4	2	4.4	5	13.5
Сочетание ЛН и НС	24	28.6	23	51.1	10	27.0
Всего принимали ЛН и НС	**52**	**63.4**	**28**	**62.2**	**20**	**54.1**

Из таблицы 5 видно, что имеется отчетливая тенденция к росту числа употребляющих алкоголь и курящих табак – от 19% и 29.8% соответственно на первом курсе –

до 43.2% и 35.1% – на третьем. Наркотики наиболее часто употребляли студенты 1 и 2 курсов (период наиболее напряженного обучения).

Установлено, что у студентов 1 курса, употребляющих алкоголь и наркотики, в период адаптации были более выражены страх и беспокойство, чем у не принимающих (U=397 p=0.0033). Они чаще намеренно пропускали занятия (U=412.5 p=0.006), поэтому имели задолженности с необходимостью отработки пропусков (U=435 p=0.014); последнее вызывало у них больший стресс, чем у не принимающих алкоголь и наркотики. Они больше спали в выходные дни (U=471 p=0.029), больше гуляли и позже возвращались домой (U=1245.5 p=0.0009). Важно значение для снижения стрессового напряжения имело употребление седативных микстур и нерецептурных седативных препаратов. Установлено, что значительно больше половины студентов 1 и 2 курсов прибегали к применению седативных лекарств с незначительным снижением на 3 курсе.

Анализ количества времени, проводимого за компьютером и смартфоном в сутки в социальных сетях, как способа общения, отдыха и преодоления стресса, показал, что 2/3 студентов 1-3 курсов проводят за этим занятием 3 часа и более, а в выходные дни – более 80%. Такой тип поведения с одной стороны – оказывает благоприятное воздействие на адаптацию, так как позволяет получить поддержку и эмоциональный заряд от друзей и родителей, которые остались на родине. С другой стороны – не позволяет развивать навыки реального эмоционального общения, а также становится фактором риска формирования компьютерной зависимости (от социальных сетей).

Изучение астении тестом FSI-14 (таблица 6) показало, что у студентов 1 курса все параметры были статистически значимо более выраженными, чем у 2 курса, за исключением того, что «астения мешала наслаждаться жизнью» одинаково для 1 и 2 курсов в диапазоне от 1 до 6 баллов (по 10 балльной шкале). В то же время, степень выраженности астении у первокурсников была статистически значимо выше, чем у студентов 3 курса по параметрам: уровень усталости сейчас, астения мешала общему уровню активности, способности купаться и одеться, нормальной работе, способности концентрироваться, отношениям с другими людьми и наслаждаться жизнью.

Таблица 6

Структура и степень выраженности усталости (в баллах от 1 до 10) – тест FSI-14

Table 6

Structure and degree of fatigue (in points from 1 to 10) – test FSI-14

№ п/п	Характеристика усталости	1 курс		2 курс		1-2к p=	3 курс		1-3к p=
		Me	Q_{25-75}	Me	Q_{25-75}		Me	Q_{25-75}	
1	Максимальная выраженность	5.0	3.0-6.0	3.0	1.0-5.0	0.005	3.0	2.0-6.0	***
2	Выраженность минимальной усталости	2.0	1.0-5.0	2.0	1.0-3.0	0.045	2.0	1.0-3.0	***
3	Средний уровень усталости	4.0	2.0-5.0	2.0	1.0-4.0	0.002	3.0	1.0-5.0	***
4	Уровень усталости сейчас	3.0	1.0-5.0	2.0	0.0-4.0	0.027	1.0	0.0-3.0	0.000
5	Мешала общему уровню активности	4.0	2.0-5.0	1.0	1.0-3.0	0.000	2.0	1.0-4.0	0.010
6	Мешала способности купаться и одеться	3.0	1.0-4.0	1.0	0.0-3.0	0.027	1.0	0.0-2.0	0.005
7	Мешала нормальной работе	3.0	2.0-5.0	2.0	1.0-3.0	0.002	1.0	0.0-3.0	0.000
8	Мешала способности концентрироваться	4.0	2.0-5.0	2.0	1.0-4.0	0.009	2.0	1.0-4.0	0.040

№ п/п	Характеристика усталости	1 курс		2 курс		1-2к p=	3 курс		1-3к p=
		Me	Q_{25-75}	Me	Q_{25-75}		Me	Q_{25-75}	
9	Мешала отношениям с другими людьми	3.0	2.0-5.0	1.0	0.0-3.0	0.000	1.0	0.0-3.0	0.014
10	Мешала наслаждаться жизнью	3.0	1.0-6.0	2.0	1.0-5.0	***	2.0	0.0-4.0	0.020
11	Мешала настроению	3.0	1.0-5.0	2.0	1.0-4.0	0.033	2.0	1.0-4.0	***
12	Количество дней, когда испытывали усталость в течение любой части дня	3.0	2.0-4.0	2.0	1.0-3.0	0.006	2.0	2.0-3.0	***
13	Сколько времени, в среднем чувствовали усталость в день на прошлой неделе	3.0	2.0-5.0	2.0	1.0-3.0	0.001	2.0	1.0-3.0	***

***Различия статистически не значимы. 1-2к – сравнение 1 и 2 курсов, 1-3к – сравнение первого и третьего курсов.

SPIN-тест показал, что симптомы социофобии имели место у 45.2% – первокурсников, 32.3% – на втором курсе и 18.9% – третьем (по сравнению с первым: χ^2=6.53 df=1 p=0.011; OR=3.5 95%CI= 1.3-10.0). По мере адаптации к новым условиям проживания и учебному стрессу снижается уровень социальной тревоги.

Обследование при помощи теста GAD-7 показало, что наибольшее число симптомов генерализованной тревоги регистрировалось у студентов 1 курса – более чем половины (56%) со снижением (χ^2=6.29 df=1 p=0.013; OR=2.8 95%CI=1.2-6.5) на втором (31%) и незначительным повышением на третьем (40.5%). Повышение уровня тревоги на третьем курсе обусловлено началом обучения на клинических кафедрах требующего общения и обследования пациентов при недостаточном знании русского языка (и недостатке пациентов, владеющих английским языком).

Анализ степень выраженности депрессии, тревоги и стресса (тест DASS-21) показал, что у студентов 1 курса депрессия была у 31% студентов, у второго – 17.8% (χ^2=6.3 df=1 p=0.013; OR=2.6 95%CI=1.2-5.7) и у третьего – 10.8%. Другими словами, наибольшее число студентов с депрессией наблюдается на 1 курсе.

Тревога различной степени выраженности наблюдалась у 50% студентов 1 курса и у 35.6% – 35.1% второго и третьего (различия статистически не значимы).

Наибольшее число испытывающих стресс (29.8%), было среди студентов 1 курса со снижением на втором до 15.6% и на третьем – до 10.8% (по сравнению с первым курсом: χ^2=4.08 df=1 p=0.044; OR=3.5 95%CI=1.0-13.0).

Заключение

Таким образом, в результате исследования установлено, что более половины (57.1%) студентов иностранцев первого курса испытывают серьезные затруднения (от 50 до 100 баллов) к адаптации в первые месяцы обучения в иноязычной стране. Факторами, обусловливающими наибольшие трудности для адаптации являлись языковый барьер, непривычная еда и отличающиеся от привычных климатические условия. Миграционный и учебный стресс в первые месяцы пребывания на территории другой страны обусловливал возникновение у 44% первокурсников эмоциональной подавленности и суицидальных мыслей.

Высокая учебная нагрузка обусловливала необходимость значительных затрат времени на подготовку к занятиям. Более двух третей студентов 1 и 2 курса (77% и 89%) спали менее 7 часов в сутки. Это способствовало формированию астении, которая у студентов 1 курса была выше, чем у второго. Это приводило к повышенной сон-

ливости в утренние часы с последующими пропусками занятий. Такое поведение создавало риск отчисления из института из-за задолженностей. Кроме того, студенты не уделяли должного внимания правильному питанию: прием пищи 1-2 раза в день был характерен для 67.8% студентов 1 курса со снижением этой цифры на 2 курсе до 37.8% и на третьем – 29.7%. Горячую пищу половина (50%) первокурсников принимали 1 раз в день, со снижением до 20% на втором и 16.2% – на третьем курсах.

Для студентов первого курса наиболее значимыми учебными стрессовыми факторами были большая учебная нагрузка, нерегулярное питание, жизнь вдали от родителей, трудности в организации режима дня и проблемы при совместном проживании в общежитии с другими студентами. У первокурсников, по сравнению со вторым курсом, наиболее выраженными симптомами учебного стресса были спешка, ощущение нехватки времени, страх и тревога, а также низкая работоспособность, плохой сон и расстройства внимания.

Большинство психологических симптомов стресса (ощущение беспомощности, наплывы посторонних мыслей, плохая концентрация внимания, раздражительность, обидчивость, плохое настроение, потеря уверенности, снижение самооценки, головные боли и низкая работоспособность) были одинаково значимыми для студентов 1 и 2 курсов, в то же время их значимость для третьекурсников статистически значимо снизилась.

Для преодоления стресса значительная часть студентов использовали неконструктивные способы (табакокурение, употребление алкоголя и наркотиков), создающие риск формирования аддиктивного поведения. Более половины студентов на всех курса принимали седативные микстуры и нерецептурные успокоительные.

Симптомы социофобии имели место у 45.2% – первокурсников, со снижением до 32.3% – на втором курсе и 18.9% – на третьем. У трети первокурсников (31%) диагностировалась депрессия, со снижением (до 17.8%) на втором и до 10.8% – на третьем курсе. Тревога различной степени выраженности наблюдалась у 50% студентов 1 курса и у 35.6% – 35.1% второго и третьего. Наибольшее число – 29.8% студентов, испытывающих стресс было среди студентов 1 курса со снижением на втором до 15.6% и на третьем – до 10.8%.

В связи с высокой значимостью на начальном периоде адаптации проблемы планирования и нехватки времени, целесообразно в первые дни обучения провести тренинг по «Тайм-менеджменту». В связи с высокой значимостью учебного и миграционного стресса, а также выраженностью его эмоциональных и психосоматических симптомов, имеется необходимость проведения обучающих семинаров-тренингов по «Стресс-менеджменту». Это позволит повысить уровень адаптивных способностей студентов и предупредить развитие психосоматических расстройств.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Булгакова Я.В., Семилетова В.А., Натарова А.А. Мотивационные особенности российских и иностранных студентов при адаптации к учебному процессу // Организационные и методические основы учебно-воспитательной работы в медицинском ВУЗе. 2010. N 2. С. 186-187.

2. Ефимова Л.А. Оценка влияния стрессовых факторов на учебное поведение студентов (на примере студентов ТГУ имени Г.Р. Державина). Общество, общности, человек: в поисках «вечного мира»: материалы 1 Всероссийской интернет-конференции. Тамбов, 2015. С. 49-51.

3. Камара И. Иностранные студенты в российском вузе: социокультурные особенности адаптации и профессиональной социализации: автореф. дис. … канд. социол. наук. Краснодар, 2014.

4. Кошелева Е.Ю., Амартей Дж.А. Влияние факторов стресса на адаптацию к академическому процессу в российском вузе иностранных и российских студентов // Альманах современной науки и образования. 2015. N 4. С. 95-98.

5. Кузнецова В.Б., Князев Г.Г., Дорошева Е.А., Бочаров А.В., Савостьянов А.Н. Роль личности и стресса в развитии депрессивных расстройств у студентов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2016. № 12. С. 114-118.

6. Миронов С.В. Состояние здоровья российских и иностранных студентов медицинского вуза и пути улучшения их медицинского обслуживания: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2014. 25 с.

7. Рахимов Т.Р. Особенности организации обучения иностранных студентов в российском вузе и направление его развития // Язык и культура. 2010. N 4. С. 123-136.

8. Ременцов А.Н., Казанцева А.А. Социокультурные аспекты адаптации иностранных студентов в российских ВТУзах // Alma Mater (Вестник Высшей Школы). 2011. N 7. С. 10-14.

9. Щербатых Ю.В. Психология стресса. М.: Эксмо, 2006.

10. Adams D.F. The embedded counseling model: an application to dental students // J. Dent. Educ. 2017. Vol. 81(1). P. 29-35.

11. Al-Kaabba A.F., Saeed A.A., Abdalla A.M., Hassan H.A., Mustafa A.A. Prevalence and associated factors of cigarette smoking among medical students at King Fahad Medical City in Riyadh of Saudi Arabia // Journal of Family and Community Medicine. 2011. Vol. 18(1). P. 8-12. https://doi.org/10.4103/1319-1683.78631

12. Connor K.M., Davidson J.R., Churchill L.E., Sherwood A., Foa E., Weisler R.H. Psychometric properties of the Social Phobia Inventory // Br. J. Psych. 2000. Vol. 176(4). P. 379-386. https://doi.org/10.1192/bjp.176.4.379

13. Hann D.M., Jacobsen P.B., Azzarello L.M., Martin S.C., Curran S.L., Fields K.K., Greenberg H., Lyman G. Measurement of fatigue in cancer patients: development and validation of the Fatigue Symptom Inventory // Qual. Life Res. 1998. Vol. 7(4). P. 301-310.

14. Lovibond P.F, Lovibond S.H. The structure of negative emotional states: Comparison of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS) with the Beck Depression and Anxiety Inventories // Behav. Res. Ther. 1995. Vol. 33(3). P. 335-342. https://doi.org/10.1016/0005-7967(94)00075-U

15. Melaku L., Mossie A., Negash A. Stress among Medical Students and Its Association with Substance Use and Academic Performance // Journal of Biomedical Education. 2015; 2015: Art. 149509. Accessed March 1, 2018. https://www.hindawi.com/journals/jbe/2015/149509

16. Mori S. Addressing the mental health concerns of international students // Journal of Counseling and Development. 2000. Vol. 78(2). P. 137-144. https://doi.org/10.1002/j.1556-6676.2000.tb02571.x

17. Qamar K., Khan N.S., Bashir Kiani M.R. Factors associated with stress among medical students // J. Pak. Med. Assoc. 2015. Vol. 65(7). P. 753-755.

18. Reisbig A.M., Danielson J.A., Wu T.F., Hafen M.Jr., Krienert A., Girard D., Garlock J. A study of depression and anxiety, general health, and academic performance in three cohorts of veterinary medical students across the first three semesters of veterinary school // J. Vet. Med. Educ. 2012. Vol. 39(4). P. 341-358. https://doi.org/10.3138/jvme.0712-065R

19. Rice K.G., Dellwo J.P. Perfectionism and self-development: Implications for college adjustment // Journal of Counseling & Development. 2002. Vol. 80 (2). P. 188-196. https://doi.org/10.1002/j.1556-6678.2002.tb00182.x

20. Rosiek A., Rosiek-Kryszewska A., Leksowski Ł., Leksowski K. Chronic stress and suicidal thinking among medical students // Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2016. Vol. 13(2). P. 212. https://doi.org/10.3390/ijerph13020212

21. Ruzhenkova V.V., Ruzhenkov V.A., Pahomov S.P., Zhernakov E.V., Lukyantseva I.S. Internal forms of suicidal behavior among medical students and the risk of attempted suicide // Journal of Pharmacy Research. 2017. Vol. 11(12). P. 1579-1583.

22. Ruzhenkova V.V., Ruzhenkov V.A., Zhernakova N.I., Gomelyak J.N. Sleep disorders in the 1st-year medical students as the result of the educational stress: Clinical and prophylactic aspects // Journal of Pharmacy Research. 2017. Vol. 11(12). P. 1584-1588.

23. Saeed A.A., Bahnassy A.A., Al-Hamdan N.A. Almudhaibery F.S., Alyahya A.Z. Perceived stress and associated factors among medical students. Journal of Family and Community Medicine. 2016. Vol. 23(3). P. 166-171. https://doi.org/10.4103/2230-8229.189132

24. Sarason B.R., Sarason I.G., Pierce G.R. Traditional views of social support and their impact on assessment. In: Sarason B.R., Sarason I.G., Pierce, G.R., eds. Social support: an interactional view. New York: John Wiley & Sons, 1990. P. 9-25.

25. Spitzer R.L., Kroenke K., Williams J.B.W., Löwe B. A Brief measure for assessing generalized anxiety disorder. The GAD-7 // Arch. Internal Medicine. 2006. Vol. 166(10). P. 1092-1097. https://doi.org/10.1001/archinte.166.10.1092

26. Yusoff M.S., Abdul Rahim A.F., Baba A.A., Ismail S.B., Mat Pa M.N., Esa A.R. Prevalence and associated factors of stress, anxiety and depression among prospective medical students // Asian Journal of Psychiatry. 2013. Vol. 6(2). P. 128-133. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2012.09.012

27. Vaez M. Health and quality of life during years at university: studies on their development and determinants: PhD. Thesis. Stockholm: Karolinska Institutet, 2004.

References

1. Bulgakova YaV, Semiletova VA, Natarova AA. Motivatsionnyye osobennosti rossiyskikh i inostrannykh studentov pri adaptatsii k uchebnomu protsessu [Motivational characteristics of Russian and foreign students in the process of adaptation to the educational process]. Organizatsionnye i metodicheskie osnovy uchebno-vospitatel'noi raboty v meditsinskom VUZe. 2010;2:186-187. Russian.

2. Efimova LA. Otsenka vliyaniya stressovykh faktorov na uchebnoye povedeniye studentov (na primere studentov TGU imeni G.R. Derzhavina) [Evaluation of the influence of stress factors on the educational behavior of students (by the example of students of TSU named after GR Derzhavin)]. In: Obshchestvo, obshchnosti, chelovek: v poiskakh «vechnogo mira» [Society, community, man: in search of «eternal peace»]. Proceedings of 1 Vserossiiskoi internet-konferentsii. Tambov; 2015. P. 49-51. Russian.

3. Kamara I. Inostrannyye studenty v rossiyskom vuze: sotsiokul'turnyye osobennosti adaptatsii i professionalnoy sotsializatsii [Foreign students in the Russian university: sociocultural features of adaptation and professional socialization] [dissertation]. Krasnodar; 2014. Russian.

4. Kosheleva EYu., Amartei DzhA. Vliyaniye faktorov stressa na adaptatsiyu k akademicheskomu protsessu v rossiyskom vuze inostrannykh i rossiyskikh studentov [The influence of stress factors on the adaptation to the academic process in a Russian university of foreign and Russian students]. Al'manakh sovremennoi nauki i obrazovaniya. 2015;4:95-98. Russian.

5. Kuznetsova V.B., Knyazev G.G., Dorosheva Ye.A., Bocharov A.V., Savost'yanov A.N. Rol' lichnosti i stressa v razvitii depressivnykh rasstroystv u studentov [The role of personality and stress in the development of depressive disorders in students]. Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. C.C. Korsakova. 2016;12;114-118. Russian.

6. Mironov S.V. Sostoyaniye zdorov'ya rossiyskikh i inostrannykh studentov meditsinskogo vuza i puti uluchsheniya ikh meditsinskogo obsluzhivaniya [The state of health of Russian and foreign students of a medical school and ways to improve their medical care]: avtoref. dis. ... kand. med. nauk. M., 2014. 25 p. Russian.

7. Rakhimov T.R. Osobennosti organizatsii obucheniya inostrannykh studentov v rossiyskom vuze i napravleniye yego razvitiya [Features of the organization of training of foreign students in the Russian university and the direction of its development]. Yazyk i kultura. 2010;4:123-136. Russian.

8. Rementsov AN, Kazantseva AA. Sotsiokulturnyye aspekty adaptatsii inostrannykh studentov v rossiyskikh VTUzakh [Sociocultural aspects of adaptation of foreign students in Russian VTUs]. Alma Mater (Vestnik Vysshei Shkoly). 2011;7:10-14. Russian.

9. Shcherbatykh YuV. Psikhologiya stressa [Psychology of stress]. M.: Eksmo; 2006. Russian.

10. Adams DF. The embedded counseling model: an application to dental students. J. Dent. Educ. 2017;81(1):29-35.

11. Al-Kaabba AF, Saeed AA, Abdalla AM, et al. Prevalence and associated factors of cigarette smoking among medical students at King Fahad Medical City in Riyadh of Saudi Arabia. Journal of Family and Community Medicine. 2011;18(1):8-12. https://doi.org/10.4103/1319-1683.78631

12. Connor KM, Davidson JR, Churchill LE, et al. Psychometric properties of the Social Phobia Inventory. Br. J. Psych. 2000;176(4):379-386. https://doi.org/10.1192/bjp.176.4.379

13. Hann DM, Jacobsen PB, Azzarello LM, et al. Measurement of fatigue in cancer patients: development and validation of the Fatigue Symptom Inventory. Qual. Life Res. 1998;7(4):301-310.

14. Lovibond PF, Lovibond SH. The structure of negative emotional states: Comparison of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS) with the Beck Depression and Anxiety Inventories. Behav. Res. Ther. 1995;33(3):335-342. https://doi.org/10.1016/0005-7967(94)00075-U

15. Melaku L, Mossie A, Negash A. Stress among Medical Students and Its Association with Substance Use and Academic Performance. Journal of Biomedical Education [Internet]. 2015 [cited 2018

March 1]. Available from: https://www.hindawi.com/journals/jbe/2015/149509.

16. Mori S. Addressing the mental health concerns of international students. Journal of Counseling and Development. 2000;78(2):137-144. https://doi.org/10.1002/j.1556-6676.2000.tb02571.x

17. Qamar K, Khan NS, Bashir Kiani MR. Factors associated with stress among medical students. J. Pak. Med. Assoc. 2015;65(7):753-755.

18. Reisbig AM, Danielson JA, Wu TF, et al. A study of depression and anxiety, general health, and academic performance in three cohorts of veterinary medical students across the first three semesters of veterinary school. J. Vet. Med. Educ. 2012;39(4):341-358. https://doi.org/10.3138/jvme.0712-065R

19. Rice KG, Dellwo JP. Perfectionism and self-development: Implications for college adjustment. Journal of Counseling & Development. 2002;80(2):188-196. https://doi.org/10.1002/j.1556-6678.2002.tb00182.x

20. Rosiek A, Rosiek-Kryszewska A, Leksowski Ł, Leksowski K. Chronic stress and suicidal thinking among medical students. Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2016;13(2):212. https://doi.org/10.3390/ijerph13020212

21. Ruzhenkova VV, Ruzhenkov VA, Pahomov SP, et al. Internal forms of suicidal behavior among medical students and the risk of attempted suicide. Journal of Pharmacy Research. 2017;11(12):1579-1583.

22. Ruzhenkova VV, Ruzhenkov VA, Zhernakova NI, Gomelyak JN. Sleep disorders in the 1st-year medical students as the result of the educational stress: Clinical and prophylactic aspects. Journal of Pharmacy Research. 2017;11(12):1584-1588.

23. Saeed AA, Bahnassy AA, Al-Hamdan NA, et al. Perceived stress and associated factors among medical students. Journal of Family and Community Medicine. 2016;23(3):166-171. https://doi.org/10.4103/2230-8229.189132

24. Sarason BR, Sarason IG, Pierce GR. Traditional views of social support and their impact on assessment. In: Sarason B.R., Sarason I.G., Pierce, G.R., eds. Social support: an interactional view. New York: John Wiley & Sons; 1990. P. 9-25.

25. Spitzer RL, Kroenke K, Williams JBW, Löwe B. A Brief measure for assessing generalized anxiety disorder. The GAD-7. Arch. Internal Medicine. 2006;166(10):1092-1097. https://doi.org/10.1001/archinte.166.10.1092

26. Yusoff MS, Abdul Rahim AF, Baba AA, et al. Prevalence and associated factors of stress, anxiety and depression among prospective medical students. Asian Journal of Psychiatry. 2013;6(2):128-133. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2012.09.012

27. Vaez M. Health and quality of life during years at university: studies on their development and determinants: PhD. Thesis. Stockholm: Karolinska Institutet; 2004.

Руженкова Виктория Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры психиатрии, наркологии и клинической психологии.

Ruzhenkova Victoria Viktorovna, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Psychiatry, Narcology and Clinical Psychology.

Статья поступила в редакцию 19 декабря 2017 г.

УДК 611.127 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-7**

Текуева Д.И.

КОМПЛЕКС ФИЗИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ СТАРШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ, ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кабардино-Балкарский государственный аграрный университет имени В.М. Кокова», 360030, Россия, г. Нальчик, пр. Ленина, д. 1в
E-mail: balaeva.s@list.ru

Аннотация. *Актуальность.* На сегодняшний день самым опасным осложнением сердечно-сосудистых заболеваний является инфаркт миокарда. Также существует риск развития повторного инфаркта миокарда, с последующим развитием ишемической болезни сердца. Поэтому своевременное проведение реабилитационных мероприятий, позволяет снизить риск развития осложнений, уменьшить последствия гипокинезии, уменьшается промежуток восстановительного периода, сокращается время восстановления сил и здоровья человека перенесшего инфаркт миокарда. *Цель исследования.* Изучение влияния физических нагрузок на этапах реабилитации пациентов, перенесших инфаркт миокарда. *Материалы и методы.* Исследовательская часть работы выполнена на базе ГБУЗ «Республиканский кардиологический центр г. Нальчик» в первом кардиологическом отделении. Участие в исследовании приняли 20 больных, из них 15 мужчин и 5 женщин, средний возраст которых составлял от 45 до 60 лет. Все участники исследования, спустя пару месяцев после перенесшего инфаркта миокарда находились на стационарном лечении в отделении. В ходе исследования, участникам проводилось ежедневное исследование состояния сердечно-сосудистой системы, артериального давления и частоты сердечных сокращений, как в покое, так и после нагрузки. *Результаты.* В ходе исследования выяснилось, что самым эффективным методом реабилитации больных, перенесших инфаркт миокарда, является лечебная физическая культура, на втором месте стоит лечебный массаж, а затем физиотерапевтические процедуры. В последующем, в ходе анкетирования выяснилось, что большая часть пациентов выполняли данные при выписке рекомендации, что способствовало улучшению качества жизни. Остальной контингент опрошенных в силу ряда различных причин данным рекомендациям не следовали, ссылаясь на ряд различных причин. *Заключение*. Средний медицинский персонал может сыграть важную роль в убеждении пациентов о необходимости применения элементов лечебной физической культуры (ЛФК), а также в их обучении. Но для этого им необходимо пройти курс специализации по ЛФК.

Ключевые слова: инфаркт миокарда; сердечно-сосудистая система; артериальное давление; больные; комплекс реабилитации

Информация для цитирования: Текуева Д.И. Комплекс физической реабилитации в лечении пациентов старшей возрастной группы, после перенесенного инфаркта миокарда // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С.69-74. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-7

D.I. Tekueva

A COMPLEX OF PHYSICAL REHABILITATION IN THE TREATMENT OF PATIENTS AFTER MYOCARDIAL INFARCTION

Kabardino-Balkarian State Agrarian University named after V. M. Kokov,
1v Lenin Ave., Nalchik, Russia, 360030
E-mail: balaeva.s@list.ru

Abstract. *Background*. Today, myocardial infarction is the most dangerous complication of cardiovascular disease. There is also a risk of repeated myocardial infarction, with subsequent development of coronary heart disease. Therefore, the timely implementation of rehabilitation measures can reduce the risk of complications, reduce the effects of hypokinesia, decrease the amount of recovery time, and decrease the time of restoration to health and strength in people after myocardial infarction. *The aim of the study*. To study the influence of physical loads in the stages of rehabilitation of patients after myocardial infarction. *Materials and methods*. The research part of the work is executed on the base of GBUZ "Nal'chik Republic Cardiological Center" in the first cardiological department. 20 patients, including 15 men and 5 women, participated in the study. The average age of the patients was from 45 to 60. After myocardial infarction, all participants of the study received a two-months course of in-patient treatment in the department. In the course of the study, daily examinations of the participants included the study of their cardiovascular system, arterial pressure and frequency of heart contractions both at rest and after load. *Results.* In the course of the study it was revealed that therapeutic physical training was the most effective method of rehabilitation of patients with myocardial infarction, followed in the second place by therapeutic massage, and physical therapy procedures. In the course of subsequent questioning it was revealed that most patients followed doctors' recommendations after being dismissed from hospital, which has contributed to improvement in the quality of their lives. The rest of the questioned patients did not follow recommendations due to a number of different reasons. *Conclusion.* Nursing staff can play an important role in convincing patients about the need to apply elements of curative physical exercises (LFK), as well as in their training. But for this they need to take a specialization course in exercise therapy.

Keywords: myocardial infarction; cardiovascular system; arterial pressure; patients; the complex of the rehabilitation.
Information for citation: Tekueva DI. Kompleks fizicheskoy reabilitatsii v lechenii patsiyentov starshey vozrastnoy gruppy, posle perenesennogo infarkta miokarda [A complex of physical rehabilitation in the treatment of patients after myocardial infarction]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):69-74. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-7

Введение. Одним из самых опасных осложнений сердечно-сосудистых заболеваний сегодня остается инфаркт миокарда. По данным всемирной организации здравоохранения, частота развития инфаркта миокарда среди мужского населения в возрасте от 40 лет и выше, по всему миру, колеблется от 5 до 10 на 1000 населения. Особенно опасны первые шесть часов после инфаркта миокарда, когда риск летального исхода составляет 50%. Только в 2017 г. было зафиксировано 160 тыс. случаев острого коронарного синдрома. Ос-

новной причиной развития инфаркта миокарда является закупорка атеросклеротической бляшкой одной из ветвей коронарных сосудов. Именно поэтому вопросы восстановительной реабилитации после перенесенного инфаркта миокарда актуальны и сегодня, особенно на фоне возросшего в десятки раз уровня заболеваемости [2].

Инфаркт миокарда остается основной причиной повышенной смертности не только в России, но в странах всего мира. Также остается высокий риск повторного инфаркта миокарда, осложнений, приводящих к инвалидности человека.

В настоящее время известно, что своевременное проведение реабилитационных мероприятий снижает риск повторного инфаркта миокарда, который в последующем может привести к развитию ишемической болезни сердца, ликвидируют неблагоприятные последствия гипокинезии и осложнений, уменьшается промежуток восстановительного периода, но и в целом, процесс восстановления здоровья и сил человека перенесшего инфаркт миокарда уменьшается в разы [1, 3, 4, 5, 6].

Физическая реабилитация больных, перенесших инфаркт миокарда средством которой является лечебная физическая культура, проходит по программам, составленных индивидуально для каждого больного, в зависимости от зоны инфарцирования, тяжести заболевания, толерантности больного к физическим нагрузкам, а также в зависимости от этапа реабилитации. Адекватное повышение физических нагрузок на последующих этапах реабилитации, улучшают сократительную функцию миокарда, увеличивая систолический объем сердца [7, 8, 11, 12].

Реабилитационные мероприятия больного, перенесшего инфаркт миокарда, включают комплекс мероприятий, направленных не только на физическую активность, но и психологическую помощь больному. Отмечено что лечебная гимнастика оказывает положительное влияние на психоэмоциональное состояние больного, восстанавливает физическую работоспособность, при этом является мощным средством вторичной профилактики. Но при проведении подобных мероприятий возникает ряд проблем, требующие своевременного решения. Главная и самая основная причина – это зачастую безответственное отношение самих больных к состоянию своего здоровья, затем оснащенность центров реабилитации и кардиологических отделений, специализированным оборудованием, наконец, уровень подготовленности медицинского персонала, по части проведения комплекса лечебной физической культуры остается достаточно низким [9, 10, 12, 13].

Цель исследования – изучение влияния физических нагрузок на этапах реабилитации пациентов перенесших инфаркт миокарда.

Материалы и методы исследования.

Исследовательская часть работы выполнена на базе ГБУЗ «Республиканский центр г. Нальчик» в первом кардиологическом отделении. Участие в исследовании приняли 20 больных, из них 15 мужчин (85%) и 5 женщин (15%), средний возраст которых составлял от 45 до 60 лет. Все участники спустя пару месяцев после перенесшего инфаркта миокарда находились на стационарном лечении в отделении.

Ежедневно проводилось измерение показателей артериального давления, частоты сердечных сокращений в покое и после нагрузки, индекса Руфье, оценивалось состояние сердечно-сосудистой системы.

Результаты исследования и их обсуждение. При оценке полученных данных функционального состояния сердечно-сосудистой системы, выяснилось, что у части больных – 40% обследованных, частота сердечных сокращений находятся в пределах физиологической нормы, у 60% больных показатель был незначительно повышен (рис. 1).

Средне-динамическое давление – является показателем согласованности регуляции сердечного выброса и периферического сопротивления. На 5-10 мм рт. ст. у 30% наблюдаемых больных данный показатель был повышен, тогда как, у оставшихся 70% больных этот показатель был повышен на 20-25 мм рт. ст.

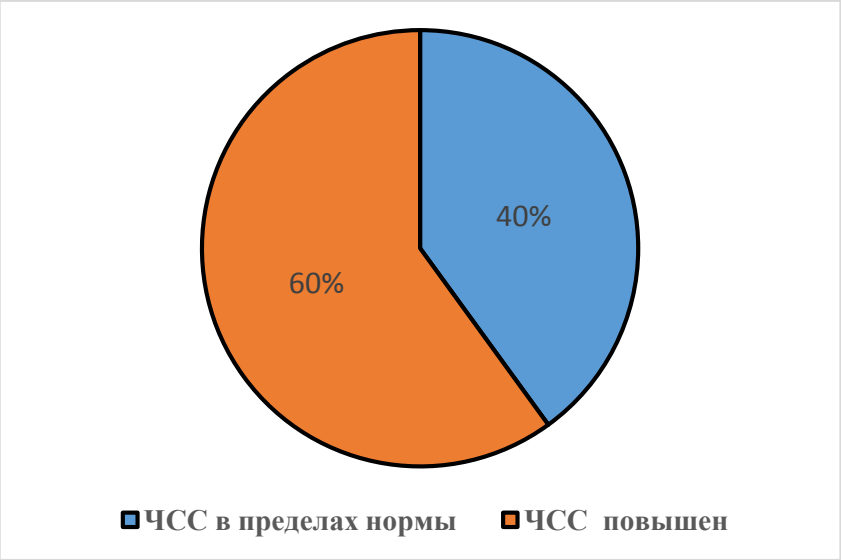

Рис. 1. Показатели частоты сердечных сокращений у обследованных мужчин
Fig. 1. Heart rate in men

Рис. 2. Показатели средне-динамического артериального давления у обследованных больных
Fig. 2. The parameters of mean-dynamic blood pressure in the examined patients

В период стационарного лечения, после перенесенного инфаркта миокарда, с больными проводились методы физической реабилитации: лечебная физическая культура, физиотерапевтическое лечение и массаж.

Большинство опрошенных пациентов, считают, что самым эффективным методом реабилитации является лечебная физическая культура (ЛФК) – 55%, на втором месте по эффективности идет лечебный массаж – 30%, а затем физиотерапевтические процедуры – 15%.

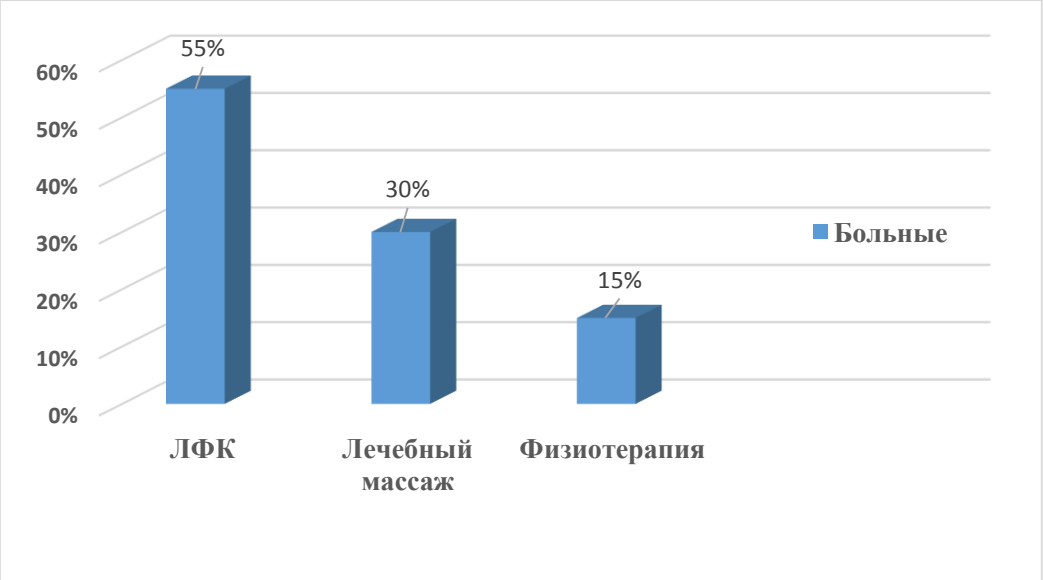

Рис. 3. Эффективность методов физической реабилитации
Fig. 3. Effectiveness of physical rehabilitation methods

Через несколько месяцев, после стационарного лечения, повторное анкетирование показало, что лишь 15-20% больных, выполняют рекомендации по выполнению лечебной гимнастики. Остальной контингент опрошенных, данным рекомендациям не следовали, ссылаясь на ряд различных причин. 50% опрошенных, ссылались на нехватку времени. 30% опрошенных при лечении и реабилитации использовали преимущественно лечение медикаментами.

Выводы

1. Проведенный опрос показал, что на этапе стационарного лечения, со всеми больными проводится комплекс реабилитационных мероприятий, включающий в себя, лечебную гимнастику, физиотерапевтические процедуры, массаж.
2. У большинства больных, после перенесенного инфаркта миокарда, отношение к средствам лечебной физкультуры пассивное. После выписки 20% больных выполняют рекомендации по выполнению лечебной гимнастики в полном объеме.
3. Из всех реабилитационных мероприятий, выполняемых больными в период стационарного лечения, опрошенные указывают на эффективность лечебной физической культуры.
4. Средний медицинский персонал мог бы сыграть важную роль в убеждении пациентов о необходимости применения элементов ЛФК, а также в их обучении. Но для этого им необходимо пройти курс специализации по ЛФК.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Ачкасов Е.Е. Лечебная физическая культура: учеб. пособие для студ. вузов. М.: Триада-Х, 2013. 100 с.
2. Балабуев С.Р. Стандарты диагностики и лечения в кардиологии // Справочник врача общей практики. 2017. N 2. 235 с.
3. Бирюков А.А. Лечебный массаж: учебник для ВУЗов. Изд. 3-е, стер. М.: Академия, 2010. 368 с.
4. Быковская Т.Ю. Виды реабилитации. Физиотерапия, лечебная физкультура. Ростов-на-Дону: Феникс, 2010. 557 с.
5. Вайнер Э.Н. Лечебная физическая культура: учеб. М.: Флинта, 2009. 424 с.
6. Дубровский В.И. Лечебная физическая культура: учеб. для студ. высш. учеб. заведений. Изд. 2-е, стер. М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2012. 608 с.
7. Евсеев С.П. Теория и организация адаптивной физической культуры. М.: Советский спорт, 2015. 296 с.

8. Каземов В.В. Методика ранней физической реабилитации больных, перенесших инфаркт миокарда: автореф. дис. … канд. мед. наук. М., 1999. 22 с.

9. Козлова Л.В. Основы реабилитации для медицинских колледжей / Л.В. Козлова, С.А. Козлова, Л.А. Семененко. Ростов-на-Дону: Феникс, 2012. 475 с.

10. Марченко О.К. Основы физической реабилитации. Киев: Олимпийская литература, 2012. 528 с.

11. Нагибина Ю.В., Ибатов А.Д. Медико-социальные характеристики и качество жизни больных ишемической болезнью сердца // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2017. N 2. 136 с.

12. Налобина А.Н. Роль физических нагрузок в адаптационно-компенсаторных реакциях сердечно-сосудистой системы в период реабилитации после инфаркта миокарда: автореф. дис. … канд. биол. наук. Омск, 2004. 22 с.

13. Попов С.Н. Физическая реабилитация. Ростов-на-Дону: Феникс, 2012. 608 с.

References

1. Achkasov EE. Lechebnaya fizicheskaya kul'tura: ucheb. posobiye dlya stud. vuzov [Therapeutic physical training: a textbook for University students]. Moscow: Triada-X; 2013. 100 p. Russian.

2. Balabuev SR. Standarty diagnostiki i lecheniya v kardiologii [Standards of diagnosis and treatment in cardiology]. Spravochnik vracha obshchey praktiki. 2017;2:235. Russian.

3. Biryukov AA. Lechebnyy massazh: uchebnik dlya VUZov. Izd. 3-ye, ster. [Therapeutic Massage: a textbook for High Schools. 3rd ed.]. Moscow: Akademiya; 2010. 368 p. Russian.

4. Bykovskaya TYu. Vidy reabilitatsii. Fizioterapiya, lechebnaya fizkultura [Types of rehabilitation. Physiotherapy, therapeutic physical training]. Rostov-on-Don: Feniks; 2010. 557 p. Russian.

5. Vayner EN. Lechebnaya fizicheskaya kul'tura: ucheb. [Therapeutic physical training: a textbook]. Moscow: Flinta; 2009. 424 p. Russian.

6. Dubrovskiy VI. Lechebnaya fizicheskaya kul'tura: ucheb. dlya stud. vyssh. ucheb. zavedeniy. Izd. 2-ye, ster. [therapeutic physical training: a textbook for University students. 2nd ed.]. Moscow: Gumanit. izd. tsentr VLADOS; 2012. 608 p. Russian.

7. Evseev SP. Teoriya i organizatsiya adaptivnoy fizicheskoy kultury [Theory and organization of adaptive physical culture]. Moscow: Sovetskiy sport; 2015. 296 p. Russian.

8. Kazemov VV. Metodika ranney fizicheskoy reabilitatsii bol'nykh, perenesshikh infarkt miokarda [Methods of early physical rehabilitation of patients with myocardial infarction] [dissertation]. Moscow; 1999. Russian.

9. Kozlova LV, Kozlova SA, Semenenko LA. Osnovy reabilitatsii dlya meditsinskikh kolledzhey [Basics of rehabilitation for medical colleges]. Rostov-on-Don: Feniks; 2012. 475 p. Russian.

10. Marchenko OK. Osnovy fizicheskoy reabilitatsii [Fundamentals of physical rehabilitation]. Kiev: Olimpiyskaya literature; 2012. 528 p. Russian.

11. Nagibina YuV. Mediko-sotsial'nyye kharakteristiki i kachestvo zhizni bol'nykh ishemicheskoy boleznyu serdtsa [Medico-social characteristics and quality of life of patients with coronary heart disease]. Problemy sotsialnoy gigiyeny, zdravookhraneniya i istorii meditsiny. 2017;2:136. Russian.

12. Nalobina AN. Rol fizicheskikh nagruzok v adaptatsionno-kompensatornykh reaktsiyakh serdechno-sosudistoy sistemy v period reabilitatsii posle infarkta miokarda [The role of physical activity in adaptation-compensatory reactions of the cardiovascular system during the rehabilitation after myocardial infarction] [dissertation]. Omsk; 2004. Russian.

13. Popov SN. Fizicheskaya reabilitatsiya [Physical rehabilitation]. Rostov-on-Don: Feniks; 2012. 608 p. Russian.

Текуева Диана Идрисовна, старший преподаватель.

Tekueva Diana Idrisovna, Senior Lecturer.

Статья поступила в редакцию 19 января 2018 г.

УДК 519.865.3:544.015.5:633.88:582.736 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-8**

N.N. Boyko[1], N.A. Makarevich[2], D.I. Pisarev[1], E.T. Zhilyakova[1]

SIMPLIFIED MATHEMATICAL MODELING OF THE DISTRIBUTION PROCESS OF LICUROSIDE AND GLYCYRAM BETWEEN THE EXTRACTANT AND *GLYCYRRHIZAE* RADICES

[1]Scientific and Educational Centre "Pharmacy",
Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, Russia, 308015
[2]Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov,
17 Severnaya Dvina Emb., Arkhangelsk, Russia, 163002
E-mail: boyko@bsu.edu.ru

Abstract. *Background*. Theoretical development of the extraction process is an important task for further modeling and calculation of optimal conditions for extraction of biologically active compounds from the plant raw material. *The aim of the study* was to propose and test a theoretical model to describe the process of Licuroside and Glycyram distribution between the solid phase of *Glycyrrhiza* radices and the extractant. *Materials and methods*. For studies, we used *Glycyrrhiza* radices (Liquorice roots). For extraction, we used plant raw material with particle size of 0.1-0.5 mm, and ethanol-water solution 70 % v/v was used as an extractant. Qualitative and quantitative analyses of biologically active compounds were carried out with standard substances Licuroside and monoammonium glycyrrhizate and according to UV-spectra and retention times of compounds in the HPLC profile. The extraction process was carried out at temperatures of 4, 20, 40 and 60±1 ºC. To construct the simplest mathematical model of BAS distribution between the extractant and plant raw material matrix, we used the law of conservation of matter and the Henry's adsorption law. *Results*. Results of these studies demonstrate that the suggested simplified model of the phytocompound distribution process between the extractant and the plant raw material matrix based on adsorption concept can be used to describe the equilibrium extraction process. The mathematical model obtained can be also used for optimization of the phytocompounds extraction process from the plant raw material within the conditions of equilibrium attained in the extraction system. *Conclusion.* The process of Licuroside and Glycyram distribution in the system *Glycyrrhizae* radices / ethanol 70 % v/v has been studied. A simplified mathematical model to describe the equilibrium distribution process of these phytocompounds in the extraction system has been suggested. The values of constants in the model suggested have been calculated.

Keywords: *Glycyrrhizae* radix; extractant; Licuroside; Glycyram; equilibrium distribution; mathematical model.
Information for citation: Boyko NN, Makarevich NA, Pisarev DI, Zhilyakova ET. Simplified mathematical modeling of the distribution process of licuroside and glycy-

ram between the extractant and *Glycyrrhizae* radices. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):75-80. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-8

Introduction. In practical medicine, medicines based on plants or their biologically active compounds play an important role for the treatment of chronic diseases of the nervous system, upper respiratory tract, gastrointestinal tract, skin and mucous, cardiovascular system and even for the treatment of cancer diseases [1]. This fact can be explained by a polycomponent composition, multitargeted action, and low toxicity of medicines belonging to this group.

In recent years, scientists from different countries have been expressing their interest in compounds obtained from plants as some valuable medicines based on biologically active compounds from plants had been found and introduced into clinical practice for the treatment of malaria, cancer diseases, Alzheimer's disease and some other severe diseases [2-4].

At the same time, new extraction technologies for different groups of compounds from plant raw material using different physical factors or phenomena are still discovered, often empirically without any theoretical base [5].

It should be noted that at the moment, there are no theoretical principles to describe the process of phytocompounds' extraction based on adsorption-desorption concept. At the same time, a kinetic aspect of the extraction process has been more developed owing to the use of the molecular diffusion theory of matter [6], whereas a thermodynamic approach associated with equilibrium state of this process practically has not been developed yet.

Therefore, theoretical development of this aspect of the extraction process is an important task for further modeling and calculation of optimal conditions for extraction of biologically active compounds from the plant raw material.

Glycyrrhiza glabra L. and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. radices are the raw material used for production of some valuable biologically active compounds and medicines like *Glycyrrhizae extract siccum* (*Glycyrrhizae radices* syrup), glycyrrhizinic acid salts (Glycyram), flavonoids and chalcones (Licuroside, Flacarbinum), and some other products [7, 8].

Thus, the study of the distribution process of some biologically active compounds between *Glycyrrhiza* radices and the extractant is an important and justified task.

The **aim** of this work was to propose and test a theoretical model to describe the process of Licuroside and Glycyram distribution between the solid phase of *Glycyrrhiza* radices and the extractant.

Materials and methods

Plant raw material and chemicals

For studies, we used *Glycyrrhiza* radices (Liquorice roots) by "Krasnogorskleksredstva" company, Krasnogorsk, the Russian Federation, serial No 30417, best before 05/2018.

For extraction, we used plant raw material with particle size of 0.1-0.5 mm, and ethanol-water solution 70 % v/v was used as an extractant.

Qualitative and quantitative analyses of biologically active compounds were carried out with standard substances Licuroside and monoammonium glycyrrhizate (Glycyram) (the State Pharmacopoeia of Ukraine) and according to UV-spectra and retention times of compounds in the HPLC profile.

Method of extraction

The extraction process was carried out at temperatures of 4, 20, 40 and 60±1 ºC. Simple maceration during 24 hours was used. Distribution of BAS between the phases was studied at such ratios of mass plant raw material / extractant volume as 1:5, 1:10, 1:20, and 1:40. For this purpose, the plant raw material (exact weight) and extractant were placed into a hermetic bottle and stored in the thermostat or refrigerator for 24 hours with periodic shaking of its content, and after the extraction, it was weighed again, taking into account the evaporated extractant.

Determination of Licuroside and Glycyram in the extracts and plant raw material was carried out by HPLC analysis.

HPLC analysis

HPLC analysis was carried out with chromatograph Agilent *Technologies 1200 Infinity*, USA. Chromatographic conditions of the extracts obtained were described in another publication [9]. Determination on diode array detector was carried out at 360 nm for Licuroside and 258 nm for Glycyram.

Theoretical part

To construct the simplest mathematical model of BAS distribution between the extractant and plant raw material matrix, we used the law of conservation of matter and Henry's adsorption law. Therein, the following assumptions were used: the system attains equilibrium, the volume of extractant in the system is practically not changed, the value of BAS adsorption on the plant raw material matrix conforms to the Henry's law. Under such assumptions, distribution of BAS in the extraction system can be described by equation (1) that exhibits material balance of the compound in the closed system [10]:

$$C \cdot V + A \cdot m - X_0 = 0 \qquad (1)$$

where C is equilibrium concentration BAS in the extract, g/ml;

V is volume of the extractant in the extraction system, mL;

A is BAS concentration on the plant raw material matrix, g/g matrix;

m is mass of plant raw material matrix, g;

X_0 is BAS content in the extraction system, g.

The adsorption value for compound (A) on the plant's matrix can be described by equations (2) and (3):

$$A = K_H \cdot C \qquad (2)$$

$$K_H = \exp\left(-\frac{\Delta G}{R \cdot T}\right) \qquad (3)$$

where K_H is distribution constant of the compound (Henry's constant), mL/g plant's matrix;

ΔG is the change of free Gibbs energy, J/mole;

R is gas constant, 8.314 J/mole·K;

T is absolute temperature of the extraction system, K.

From equations (1) and (2), we can come to equation (4) [11, 12]:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{X_0} \cdot V + \frac{K_H \cdot m}{X_0} \qquad (4)$$

As it can be seen from equation (4), experimental data should be well described by linear dependency in coordinates *1/C=f(V)*. Therein, the value of ΔG can be found with equation (5):

$$\ln K_H = -\frac{\Delta G}{R \cdot T} \qquad (5)$$

Regression analysis was carried out in MS Excel 2010 add-in "Data Analysis".

Results and discussion. Main parameters of plant raw material are presented in Table 1.

Fig. 1 and 2 present the results of data processing with equation (4) after a series of experiments at different temperatures and ratios of plant raw material / extractant.

Table 1

Main pharmacognostic parameters of *Glycyrrhiza* radices

No	Parameter*	Value**
1	Loss on drying, g/g raw material	0.076±0.002
2	Extractive substances, g/g raw material	0.342±0.010
3	Licuroside content, g/g raw material	0.0053±0.0003
4	Glycyram content, g/g raw material	0.091±0.005

Note. * Parameters were found for wet plant raw material. ** Mean value and its confidence interval (Mean±SEM) are calculated with repeat counts n=3 and significance level P=0.95.

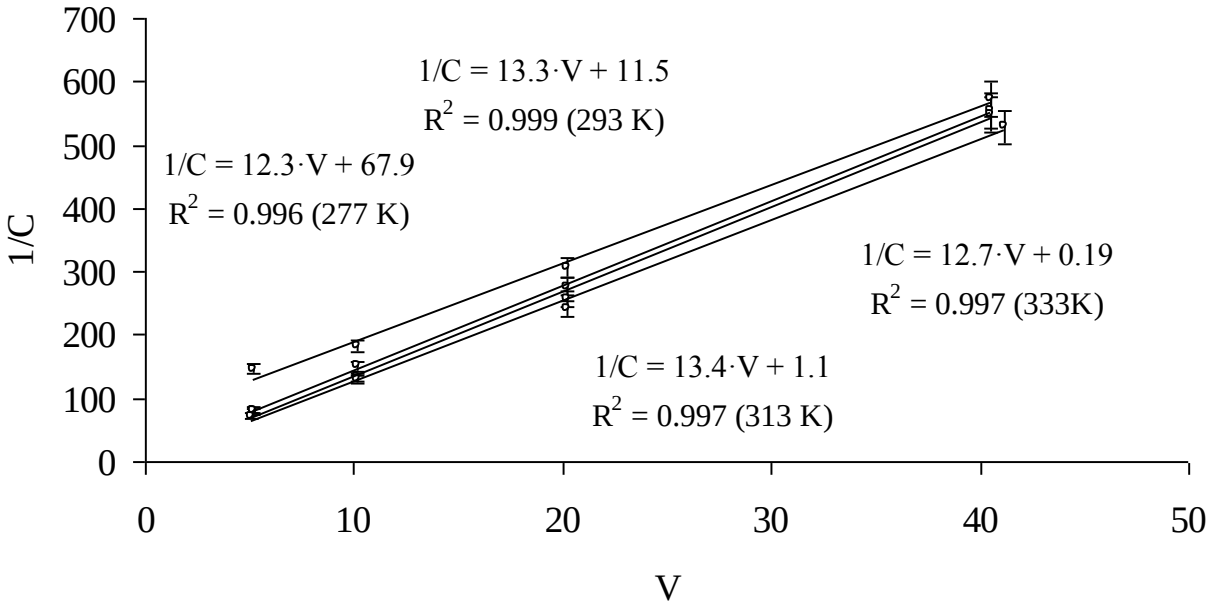

Fig. 1. Experimental data and regression lines for Glycyram

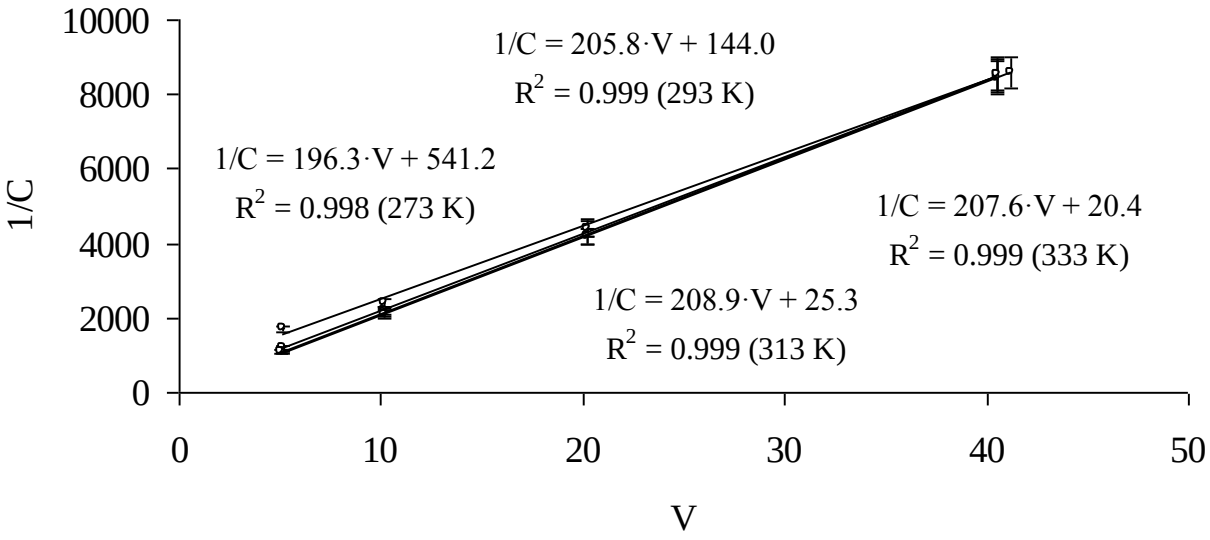

Fig. 2. Experimental data and regression lines for Licuroside

As it can be seen from the graphs presented in Fig. 1 and 2, experimental data are described well by the suggested theoretical model and have linear dependency as predicted by equation (4) (determination coefficient is equal to $R^2>0.99$). After that, using the constants obtained in regression equations, we calculated the distribution constant for compound (K_H) and built its dependency on the temperature in coordinates ($\ln K_H=f(1/T)$). The graphs of the regression equations obtained for Licuroside and Glycyram are presented in Fig. 3.

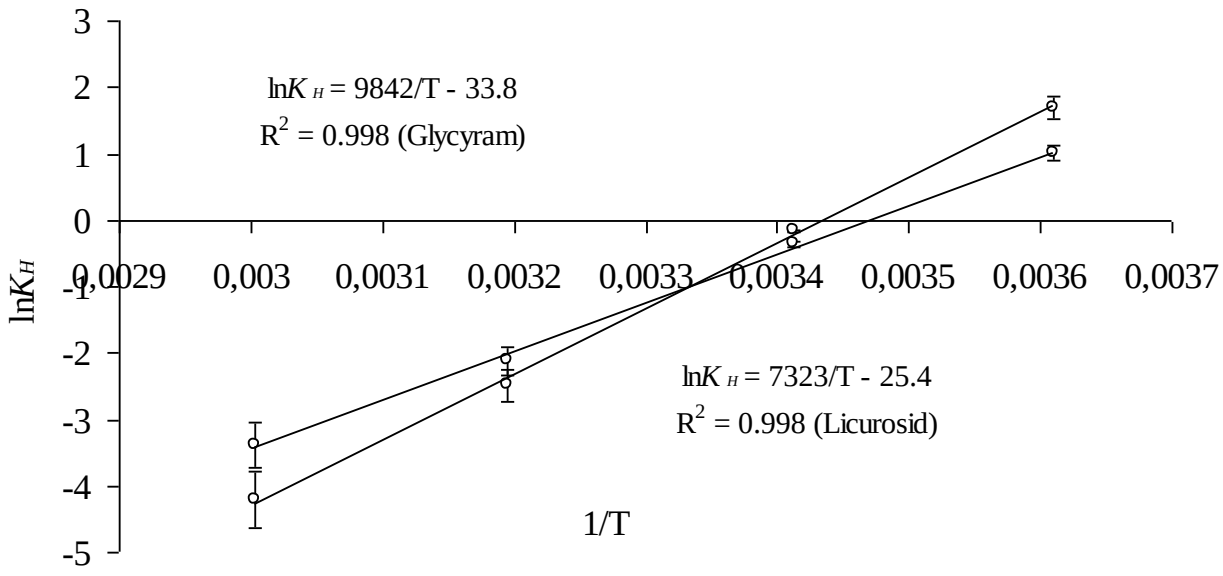

Fig. 3. Dependency of distribution constant K_H on temperature for Licuroside and Glycyram

As it can be seen from the graphs presented in Fig. 3, the dependency for compound's distribution constant (K_H) on temperature (T) is also described well by the suggested equation (5), with determination coefficient that equals $R^2>0.99$. Then, by means of mathematical transformation, we can calculate constants (ΔG, k_1) from the regression coefficients. Table 2 presents the value of constants for plant raw material used in the experiment.

Table 2

Values of theoretical constants

No	Phytocompound	Constant	
		ΔG, J/mole	k_1
1	Licuroside	60900±6800	-25.4±2.7
2	Glycyram	81800±8100	-33.8±3.2

As it can be seen from the data presented in Table 2, the mean value of energetic constant ΔG for Licuroside is equal to ΔG=60.9±6.8 kJ/mole (0.111±0.012 kJ/g), and for Glycyram, it is equal to ΔG=81.8±8.1 kJ/mole (0.097±0.010 kJ/g), which according to literature data [12] is indicative to physical mechanism of adsorption for these phytocompounds on the plant raw material matrix. The ΔG may be interpreted as phytocompound's adsorption/desorption energy on the plant raw material matrix if we ignore the entropy's element.

Mean value of constant k_1 for Licuroside is equal to k_1=25.4±2.7 and for Glycyram, it is equal to k_1=33.8±3.2. This constant may be interpreted as the parameter associated with the nature of plant raw material.

The results of these studies demonstrate that the suggested simplified model of phytocompound distribution process between the extractant and the plant raw material matrix based on adsorption concept can be used to describe the equilibrium extraction process. The obtained mathematical model can also be used for optimization of the phytocompounds extraction process from the plant raw material within the conditions of equilibrium attained in the extraction system.

Conclusion. The process of Licuroside and Glycyram distribution in the system

Glycyrrhizae radices / ethanol 70 % v/v has been studied. A simplified mathematical model to describe the equilibrium distribution process of these phytocompounds in the extraction system has been suggested. The values of constants in the model suggested have been calculated.

No conflict of interest was recorded with respect to this article.

References

1. Boyko NN, Bondarev AV, Zhilyakova ET, et al. Phytodrugs, analysis of Russian Federation pharmaceutical market. Research Result. Medicine. Pharmacy. 2017;3(4):30-8. DOI:10.18413/2313-8955-2017-3-4-30-38.

2. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. J. Nat. Prod. 2012;75(3):311-35. DOI: 10.1021/np200906s.

3. Shen B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. Cell. 2015;163(6):1297-1300. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.031.

4. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta. 2013;1830(6):3670-95. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.

5. Molchanov GI, Molchanov AA, Morozov YuA. Farmatsevticheskiye tekhnologii: sovremennyye elektrofizicheskiye biotekhnologii v farmatsii: Uchebnoye posobiye [Pharmaceutical technologies: modern electrophysical biotechnology in pharmacy: manual]. Moscow: Alfa-M: Infra-M; 2009. 336 p. Russian.

6. Litvinenko VI, Georgievskiy VP, Ammosov AS, et al. Solodka (sistematika, khimiya, tekhnologiya, standartizatsiya, farmakologiya, klinika) [Licorice: systematic, chemistry, technology, standardization, pharmacology clinic]. Yaroslavl': Avers Plus; 2014. 466 p. Russian.

7. Tolstikov GA, Baltina LA, Grankina VP, et al. Solodka: primeneniye, khimiya, ispol'zovaniye chelovekom [Licorice: biodiversity, chemistry, human use]. Novosibirsk: Academic publishing "GEO"; 2007. 311 p. Russian.

8. Zhilyakova ET, Novikov OO, Pisarev DI, et al. Studying the polyphenolic structure of *Laurus Nobilis* L. leaves. Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017;4(9):3066-74. DOI.org/10.5281/zenodo.910685.

9. Frolov YuG. Kurs kolloidnoy khimii. Poverkhnostnyye yavleniya i sistemy rasseivaniya [Colloid chemistry course. Surface phenomena and dispersal systems]. Moscow: Khimiya; 1988. 464 p. Russian.

10. Boyko NN, Zaytsev AI. Study of biologically active substances concentration in extracts dependency from the plant raw material – extractant ratio. In: Actual studies in human, natural, exact and social sciences. Proceedings of the III International scientific and practice conference; 2013 Nov 25; Novosibirsk. Novosibirsk: OOO "CSRNI"; 2013. 168 p. Russian.

11. Makarevich NA, Bogdanovich NI. Teoreticheskiye osnovy adsorbtsii: rukovodstvo [Theoretical basis of adsorption: manual]. Arkhangelsk: NAFU; 2015. 362 p. Russian.

Boyko Nikolay Nikolaevuch, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Junior Research Scientist.
Makarevich Nikolay Anatolievich, Doctor of Chemical Sciences, Professor.
Pisarev Dmitriy Ivanovich, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Professor of Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy.
Zhilyakova Elena Teodorovna, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of Department of Pharmaceutical Technology

Статья поступила в редакцию 23 ноября 2017 г.

УДК 615.32:543.544 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-9**

Зинченко А.А.

СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ β-ЦИКЛОДЕКСТРАНА И ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ

ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»,
3361085, Украина, г. Харьков, ул. Астрономическая, д. 33
E-mail: Zinchenko@phukr.kharkov.ua

Аннотация. *Актуальность.* Перспективные препараты для лечения целого ряда инфекционных заболеваний наиболее часто представлены многокомпонентными инъекционными лекарственными формами, в состав которых входит набор неорганических солей, антибактериальные и противовирусные вещества, а также вспомогательные вещества, выполняющие роль пролонгаторов и консервантов. От количества этих веществ и их соотношения в составе зависит срок годности препарата и его фармакокинетические характеристики. *Цель исследования.* Разработка и валидация методики совместного определение β-циклодекстрана и поливинилпирролидона в многокомпонентных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). *Материалы и методы.* В данном исследовании осуществлен подбор оптимальных колонки и сорбента для проведения количественного определения ПВП отдельно от β-циклодекстрана методом эксклюзионной хроматографии и выполнена валидация методики по показателям правильность, сходимость (прецизионность), линейность, диапазон применения. В работе использован блочный жидкостный хроматограф модели LC-20 (Shimadzu Co. Япония) и метод хроматографирования с одновременным применением двух колонок. *Результаты.* Подобраны оптимальные колонки для проведения количественного определения ПВП отдельно от β-циклодекстрана методом эксклюзионной хроматографии. Были выбраны колонки: основная – размером 250 мм х 0.46 мм, заполненная сорбентом Equisil ODS, размер частиц 5 мкм, (производство Dr. Maisch, Германия); защитная – размером 20 мм х 4.0 мм Discovery HS C18, размер частиц 5 мкм (Supelco, США). *Заключение.* Методика количественного определения и установления подлинности β-циклодекстрана соответствует всем метрологическим требованиям к методике характеризуется достаточной сходимостью и правильностью. Систематическая ошибка методики для каждого определяемого компонента удовлетворяет требованиям практической незначимости.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; β-циклодекстран; поливинилпирролидон; пролонгаторы; консерванты; фармакокинетика; количественное определение

Информация для цитирования: Зинчено А.А. Совместное определение β-циклодекстрана и поливинилпирролидона в многокомпонентных препаратах методом ВЭЖХ // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С.81-89. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-9

A.A. Zinchenko

JOINT DETERMINATION OF β-CYCLODEXTRAN AND POLYVINYL PYRROLIDONE IN MULTI-COMPONENT PREPARATIONS WITH A HPLC METHOD

State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Drug Quality Center",
33 Astronomicheskaya St., Kharkov, Ukraine, 3361085
E-mail: Zinchenko@phukr.kharkov.ua

Abstract. *Background.* Promising drugs for the treatment of a number of infectious diseases are most often represented by multicomponent injectable dosage forms, which include a set of inorganic salts, antibacterial and antiviral substances, as well as auxiliary substances that act as prolongators and preservatives. The shelf life of the drug and its pharmacokinetic characteristics depend on the amount of these substances and their ratio in the composition. *The aim of the study.* To develop and validate the procedure for joint determination of β-cyclodextran and polyvinylpyrrolidone in multicomponent preparations by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Materials and methods.* In this study, the optimal column and sorbent was selected for quantitative determination of PVP separately from β-cyclodextran with the method of exclusion chromatography and the validation of the technique was performed using correctness, convergence (precision), linearity, and range of application. In this work, we used a LC-20 block liquid chromatograph (Shimadzu Co. Japan) and a chromatography method with simultaneous application of two columns. *Results.* Optimal columns were chosen for quantitative determination of PVP separately from β-cyclodextran by the method of exclusion chromatography. The following columns were chosen: the main one – 250 mm x 0.46 mm, filled with the Equisil ODS sorbent, particle size 5 μm, (manufactured by Dr. Maisch, Germany); Protective – size 20 mm x 4.0 mm Discovery HS C18, particle size 5 μm (Supelco, USA). *Conclusion.* The method of quantitative determination and establishment of the authenticity of β-cyclodextran corresponds to all metrological requirements to the technique characterized by sufficient convergence and accuracy. The systematic error of the technique for each determined component satisfies the requirements of practical insignificance.

Keywords: high-performance liquid chromatography; β-cyclodextrin; polyvinylpyrrolidone; prolongators; preservatives; pharmacokinetics; quantitation.
Information for citation: Zinchenko AA. Sovmestnoye opredeleniye b-tsiklodekstrana i polivinilpirrolidona v mnogokomponentnykh preparatakh metodom VEZHKH [Joint determination of β-cyclodextran and polyvinyl pyrrolidone in multicomponent preparations with a HPLC method]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):81-89. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-9

Введение. Условия количественного определения β-циклодекстрана методом ВЭЖХ описаны в монографии “Betadex” Европейской фармакопеи, а также в фармакопеи США и в многочисленных информационно-рекламных материалах фирм, производящих хроматографические колонки. Наиболее полная информация о режимах хроматографирования представлена фирмой “Showa Denko K.K.”., Япония. При количественном определении по методике Европейской фармакопеи применяют колонку, заполненную сорбентом с октадецильными группами, по методике фармакопеи США анализ проводят на колонке с аминными группами. Условия хроматографирования,

приведенные в рекламных материалах фирмы “Showa Denko K.K.”, предполагают использование эксклюзионных колонок с рабочим диапазоном, начиная с 3000 дальтон [1, 2].

Поскольку в составе препарата присутствуют различные неорганические ионы и высокомолекулярное соединение – ПВП, применять колонку с аминными группами нельзя ввиду происходящих между сорбентом и компонентами пробы необратимых реакций. Применить эксклюзионный режим хроматогафирования возможно, но при этом на сорбенте, который обеспечивает необходимое разделение ближайших к β-циклодекстрану веществ (ά- и γ-циклодекстранов) получается размытый пик ПВП, который при регистрации на рефрактометрическом детекторе частично, перекрывается с пиком β-циклодекстрана, что существенно ухудшает метрологические характеристики методики. Хроматографирование в условиях монографии “Betadex” Европейской фармакопеи позволяет получить полное разделение хроматографических зон β-циклодекстрана от других компонентов препарата, но при этом время ПВП выхода превышает 120 мин, при том, что время выхода β-циклодекстрана находится в пределах от 5 до 7 мин. Значительное время удерживания ПВП приводит к сильному расширению его хроматографической зоны, при этом чувствительность используемого для регистрации β-циклодекстрана рефрактометрического детектора уже не позволяет получать достоверные результаты количественного содержания ПВП в препарате. А в случае не полного элюирования хроматографической зоны ПВП уже наблюдается невоспроизводимость времен удерживания и площадей пиков β-циклодекстрана из-за модификации сорбента ПВП [3].

Установить время полного элюирования пика ПВП можно проводя одновременно детектирование рефрактометрическим и УФ-ВИД спектрофотометрическим детектором. Использование УФ-ВИД спектрофотометрического детектора позволяет существенно увеличить чувствительность регистрации ПВП, поскольку в УФ спектре этого соединения имеется коротковолновый участок, в котором наблюдается достаточно интенсивное поглощение.

Цель исследования: разработка и валидация методики совместного определение β-циклодекстрана и поливинилпирролидона в многокомпонентных препаратах методом ВЭЖХ.

Задачи исследования:

1. Подбор оптимальных колонки и сорбента для проведения количественного определения ПВП отдельно от β-циклодекстрана методом эксклюзионной хроматографии

2. Валидация методики по показателям правильность, сходимость (прецизионность), линейность, диапазон применения.

Материалы и методы исследования. При разработке данной методики и проведение валидационных исследований использовали блочный жидкостный хроматограф модели LC-20 (Shimadzu Co. Япония) в следующей комплектации:

- два насоса высокого давления модели LC 20 ADvp;
- автоинжектор SIL-20A
- термостат колонок CTO-20A в термостат, в которого вмонтирован 6 ти портовой кран высокого давления FCV-12AH$_2$
- рефрактометрический детектор RID-10A;
- спектрофотометрический детектор SPD-20A.

Испытуемый раствор препарата готовят путем его разбавления в воде или подвижной фазе, чтобы получить концентрацию β-циклодекстрана и ПВС на уровне около 10 мг/мл и 3 мг/мл соответственно.

Отдельно готовят раствор сравнения β-циклодекстрана и раствор сравнения ПВП с теми же концентрациями.

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения β-циклодекстрана и раствора сравнения ПВП хроматографируют.

Условия хроматографирования:

- основная колонка – размером 250 мм х 0,46 мм, заполненная сорбентом Equisil ODS, размер частиц 5 мкм, (производство Dr. Maisch, Германия);
- защитная колонка – размером 20 мм х 4,0 мм Discovery HS C18, размер частиц 5 мкм (Supelco, США);
- подвижная фаза: вода – метанол (90 : 10);
- скорость подачи подвижной фазы через основную колонку – 1 мл/мин;
- скорость подачи подвижной фазы через защитную колонку – 2 мл/мин;
- длина волны детектирования УФ-ВИД детектором – 226 нм;
- температура термостата колонок – 30 °С;

Концентрацию β-циклодекстрана или ПВС в испытуемом растворе (C_i) определяют по формуле:

$$C_i = \frac{S_i}{S_{oi}} \times C_{oi}$$

где: S_i – среднее значение площадей пиков β-циклодекстрана или ПВП, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_{oi} – среднее значение площадей пиков β-циклодекстрана или ПВП, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения β-циклодекстрана или раствора сравнения ПВП;

C_{oi} – концентрация β-циклодекстрана или ПВП в соответствующем растворе сравнения, в миллиграммах в 1 мл.

Для устранения негативного влияния ПВП на результаты анализа автором была предложено проводить хроматографирование проб содержащих β-циклодекстран и ПВП с использованием двух колонок подключенных к 6-ти портовому крану, расположенному в термостате колонок [4]. Одна из колонок выполняет защитную функцию и предотвращает попадание ПВП во вторую, а вторая колонка служит для отделения β-циклодекстрана от других компонентов препарата. Схема подключения колонок показана на рис. 1:

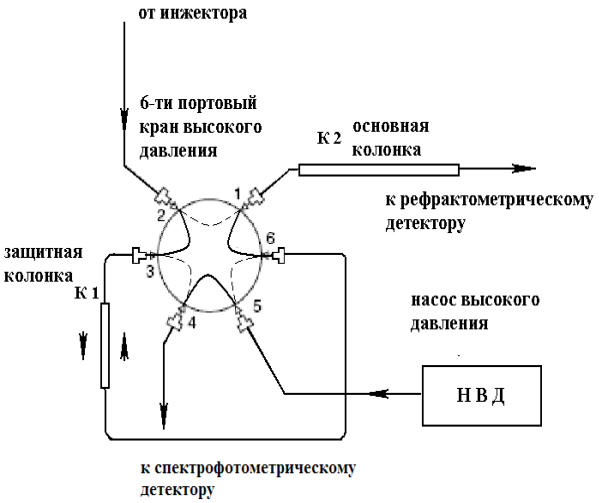

Рис. 1. Схема подключения колонок к 6-портовому крану
Fig. 1. The scheme of connecting the columns to the 6-port tap

Как видно из рис.1, принцип работы этой схемы заключается в том, что в момент введения 6-ти портовый кран находится в положении показанном сплошными линиями на рис. 1 и все компоненты пробы попадают в защитную колонку К1, в которой происходит разделение ПВП от остальных веществ, включая и β-циклодекстран. Скорость продвижения хроматографической зоны ПВП по колонке 1 составляет около 1 мм/мин и за время нахождения 6-ти портового крана в этом положении (1.5 мин) успевает пройти около 1.5 мм. После переключения 6-ти портового крана поток подвижной фазы направляется в основную колонку К2 уже минуя защитную колонку, а в защитную колонку отдельным насосом подается подвижная фаза в противоположном направлении. Хроматографическая зона ПВП из защитной колонки элюируется и попадает в УФ-ВИД спектрофотометрический детектор, где и происходит ее регистрация. При прохождении подвижной фазы по колонке в обратном направлении происходит фокусировка хроматографической зоны ПВП, за счет чего пик ПВП получается достаточно симметричным.

В основной колонке происходит разделение пиков β-циклодекстрана от остальных

ных компонентов препарата и хроматографическая зона β-циклодекстрана регистрируется рефрактометрическим детектором. Таким образом при одном введении пробы испытуемого раствора происходит определение и β-циклодекстрана, и ПВП. Время хроматографирования составляет около 10 мин.

Результаты и их обсуждение. Методики с переключением потоков подвижной фазы и предварительным отделением от других компонентов препарата и концентрированием определяемых веществ в непосредственно ходе проведения анализа мало распространенны в практике фармацевтического анализа [6, 7].

Разработанная методика идентификации и количественного определения β-циклодекстрана и ПВП была исследована по показателям: «специфичность», правильность; прецизионность (сходимость), линейность, диапазон применения. Исследования проводили на модельных образцах, полученных в лабораторных условиях с использованием двух вариантов раствора «плацебо» препарата. В первом случае – без β-циклодекстрана, а во втором – без ПВП. Соответствие методики требованиям по показателю специфичность подтверждается следующими данными:

1. На хроматограмме раствора плацебо и хроматограмме растворителя отсутствуют пики со временем удерживания, совпадающим со временем удерживания пиков бетадекса на хроматограмме испытуемого раствора. То есть, все остальные компоненты препарата и растворитель не мешают проведению испытаниям на подлинность и количественному определению β-циклодекстрана.

2. На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы наблюдается полное разделение пиков бетадекса и пиков его ближайших аналогов – α-циклодекстрана и γ-циклодекстрана.

3. Доверительные интервалы времен удерживания пиков β-циклодекстрана на хроматограммах испытуемого раствора и доверительные интервалы времён удерживания пиков β-циклодекстрана на хроматограммах суммарного раствора сравнения перекрываются, т.е. не имеют статистически значимой ошибки. Значения времен удерживания пиков β-циклодекстрана представлены в таблице 1.

Таблица 1

Значения времен удерживания пиков β-циклодекстрана на хроматограммах испытуемого раствора препарата и раствора сравнения β-циклодекстрана

Table 1

The retention times of β-cyclodextran peaks on the chromatograms of the test solution and the β-cyclodextran comparison solution

№ хроматограмм	Значения времен удерживания	
	Испытуемый раствор	Раствор сравнения β-циклодекстрана
1	8.664	8.645
2	8.638	8.657
3	8.639	8.648
4	8.651	8.647
5	8.637	8.654
Среднее значение	8.646	8.650
ОСО	**0.136**	**0.059**
Макс. значение	8.664	8.657
Минимальное значение	8.637	8.645
Доверительный интервал	0.012 (от 8.634 до 8.658)	0.005 (от 8.645 до 8.655)

Требование к перекрыванию доверительных интервалов значений времен удерживания пиков определяемых веществ на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения представляется более правильным, чем обычно указываемое в НД требование о 2 % совпадении времен удерживания. Поскольку возможен случай, когда доверительные интервалы могут не перекрываться, при этом попадать в 2 % диапазон.

Проведение идентификации по совпадению времен удерживания по разработанной методике для ПВП не корректно, поскольку роль защитной хроматографической колонки сводится только к отделению хроматографической зоны ПВП от других компонентов препарата, и время удерживания зависит от времени переключения 6-ти портового крана.

Данные о других метрологических характеристик методики были получены путем хроматографирования модельных растворов с концентрацией ПВП и β-циклодекстрана от 80 % до 120 % от номинального значения. Результаты хроматографирования модельных растворов и расчет метрологических характеристик методики при определении β-циклодекстрана и ПВП представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Результаты анализа модельных смесей препарата, содержащих от 80% до 120 % по отношению к номинальной концентрации β-циклодекстрана, и их статистическая обработка

Table 2

The results of the analysis of model mixtures of the preparation containing from 80% to 120% with respect to the nominal concentration of β-cyclodextran and their statistical treatment

№ раствора	Введено в % от номинальной концентрации (Xi, факт., %)	Найдено в % от номинальной концентрации (Yi, %)	Найдено в % к введенному Zi = 100 • (Yi/Xi)
1	79.740	79.709	99.962
2	85.000	84.789	99.752
3	89.942	89.783	99.823
4	94.855	94.495	99.620
5	100.231	100.291	100.060
6	104.913	104.508	99.614
7	110.087	109.913	99.842
8	114.827	114.364	99.597
9	120.202	118.748	98.790
		Среднее, Zcp, % =	99.673
		Относительное стандартное отклонение, RSD_z, % =	0.369
		Относительный доверительный интервал Δ_z % = t (95 %, 9 – 2) x RSD_z = 2.36 x 0.369 =	0.87
		Критическое значение для сходимости результатов Δ_{As}, % =	1.6
		Систематическая ошибка δ % = | Zcp – 100 | =	0.327
		Критерий незначимости систематической ошибки:	
		1) статистическая незначимость: δ < Δ_z : √9 = 0.87 : 3 = 0.29 % < 0.327 %	Не выполняется
		Если не выполняется 1), то δ ≤ max δ: 2) практическая незначимость: δ % ≤ 0.32 × 1,6 = 0.501 % > 0.327 %	Выполняется
			Корректна

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что методика количественного определения β-циклодекстрана и ПВП характеризуется достаточной правильностью и сходимостью (прецизионностью) во всем диапазоне концентраций, является корректной и не имеет практически значимой систематической ошибки.

Характеристику «Линейность» исследовали в диапазоне концентраций бетадекса от 80 % до 120 % по отношению к номинальному значению.

Графики линейной зависимости найденного количества бетадекса от введенного для представлен на рис.2, а результаты расчета параметров линейной зависимости – в таблице 3.

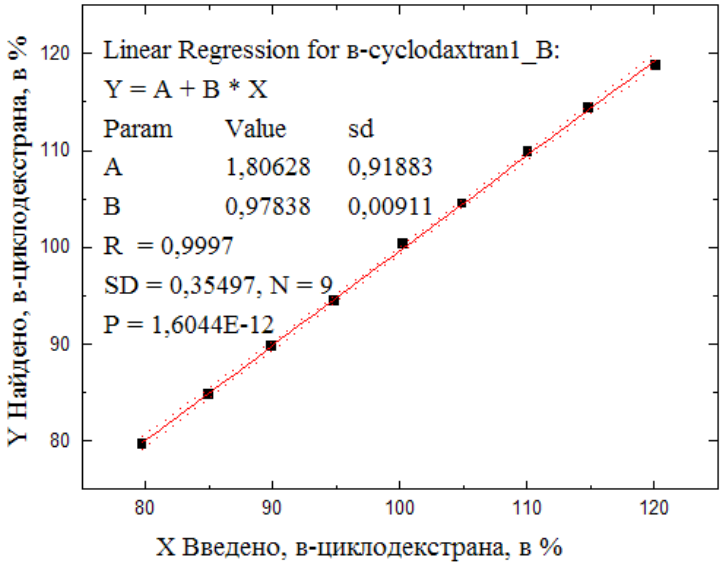

Рис. 2. График линейной зависимости найденного количества β-циклодекстрана от введенного
Fig. 2. The graph of the linear dependence of the found amount of β-cyclodextran on the introduced amount

Таблица 3

Метрологические характеристики линейной зависимости найденной концентрации β-циклодекстрана от его введенной концентрации

Table 3

Metrological characteristics of the linear dependence of the found concentration of β-cyclodextran on its administered concentration

Параметры	Значения	Требования 1	Требования 2	Заключение
b	0.97838			
S_b	0.00911			
a	1.80628	>|0.900|	|2.6|	Выдерживается по 2 критерию
S_a	0.91883			
RSD_0	0.35497			
RSD_0/b	0.363	<|0.84|		Выполняются
r	0.9997	>|0.9980|		Выполняются

Как видно из представленных в таблице 3 данных методика количественного определения и установления подлинности β-циклодекстрана соответствует всем метрологическим требованиям к методике характеризуется достаточной сходимостью и правильностью. Систематическая ошибка методики для каждого определяемого компо-

нента удовлетворяет требованиям практической незначимости.

Выводы

1. Подобраны оптимальные колонки для проведения количественного определения ПВП отдельно от β-циклодекстрана методом эксклюзионной хроматографии. Были выбраны колонки: основная – размером 250 мм х 0.46 мм, заполненная сорбентом Equisil ODS, размер частиц 5 мкм, (производство Dr. Maisch, Германия); защитная – размером 20 мм х 4.0 мм Discovery HS C18, размер частиц 5 мкм (Supelco, США);

2. Проведена валидация методики по показателям правильность, сходимость (прецизионность), линейность, диапазон применения.

Методика количественного определения β-циклодекстрана и ПВП характеризуется достаточной правильностью и сходимостью (прецизионностью) во всем диапазоне концентраций, является корректной и не имеет практически значимой систематической ошибки.

Характеристику «Линейность» исследовали в диапазоне концентраций бетадекса от 80% до 120% по отношению к номинальному значению.

Методика количественного определения и установления подлинности β-циклодекстрана соответствует всем метрологическим требованиям к методике характеризуется достаточной сходимостью и правильностью. Систематическая ошибка методики для каждого определяемого компонента удовлетворяет требованиям практической незначимости.

Высокое значение коэффициента корреляции r = 0.9997 удовлетворяет требованиям критерия приемлемости (r = 0.9980) и подтверждает линейность зависимости между взятым и найденным количеством каждого из действующих веществ препарата в области от 80 % до 120 % относительно их номинальных концентраций в препарате.

Выполняются требования к параметрам линейной зависимости (a, RSD_0/b, r) методики определения β-циклодекстрана во всем диапазоне концентраций от 80% до 120% от номинального значения.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Георгиевский В.П. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств. Харьков: НТМТ, 2011. 946 с.

2. Максимкина Е.А., Миназова Г.И., Чукреева Н.В. Стандартизация и обеспечение качества лекарственных средств. М.: Медицина, 2008. 256 с.

3. Сычев К. Оформление методик высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с международными рекомендациями: Журнал «Аналитика»/ ИП Фирма «СКАН», 2012. С. 60-66.

4. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа: Методическое пособие для специального курса. Москва: Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, 2007. 203 с.

5. Note for guidance on variation of analytical procedures: methodology (CPMP/ICH/281/095). ICH Q2A – Washington, 1995. P. 89-97.

6. Cleaning Validation Guidelines. Health Canada. HPFB Inspectorate – Ottawa: Medicine, 2008. Pp. 45-52.

7. European Pharmacopoeia 8th edition: URL: http://online.edqm.eu/entry.htm (Дата обращения: 01.03.2018).

8. The United States Pharmacopeia 38th edition. United States Pharmacopeial Convention. URL: http:// www.uspnf.com/uspnf/login. (Дата обращения: 01.03.2018).

References

1. Georgievsky VP. Analiticheskaya khimiya v sozdanii, standartizatsii i kontrole kachestva lekarstvennykh sredstv [Analytical chemistry in the drug manufacturing, standardization and control]. Kharkiv: HTMT; 2011. 946 p. Russian.

2. Maksimkina EA, Minazova GI, Chukreeva NV. Standartizatsiya i obespechenie kachestva lekarstvennykh sredstv [Provision of drug standardization and quality control]. Moscow: Meditsina; 2008. 256 p. Russian.

3. Sychev K. Oformlenie metodik vysokoeffectivnoy zhidkostnoy khromatografii (VEZhH) v

sootvetstvii s mezhdunarodnymi rekomendatsiyami [Design of high performance liquid chromatography (HPLC) techniques in accordance with international recommendations]. Zhurnal «Analitica». 2012:60-66. Russian.

4. Shapovalova EN, Pirogov AV. Khromatograficheskie metody analiza: posobie dlya specialnogo kursa [Chromatographic methods of analysis: a methodological manual for a special course]. Moscow: Moskovskiy Gosudarstvennyy Universitet imeni M.V. Lomonosova; 2007. 203 p. Russian

5. Note for guidance on variation of analytical procedures: methodology (CPMP/ICH/281/095). ICH Q2A – Washington; 1995. P. 89-97.

6. Cleaning Validation Guidelines. Health Canada. HPFB Inspectorate – Ottawa: Medicine; 2008. P. 45-52.

7. European Pharmacopoeia 8th edition [Internet]. [cited 2018 March 1]. Available from: http://online.edqm.eu/entry.htm.

8. The United States Pharmacopeia 38th edition. United States Pharmacopeial Convention [Internet]. [cited 2018 March 1]. Available from: http:// www.uspnf.com/uspnf/login.

Зинченко Александр Анатольевич, кандидат фармацевтических наук, заведующий лабораторией фармакопейного анализа

Zinchenko Alexander Anatolyevich, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Head of Pharmaceutical Analysis Laboratory

Статья поступила в редакцию 16 декабря 2017 г.

УДК 615.451.16 **DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-10**

Огай М.А., Ковтун Е.В., Чахирова А.А., Саморядова А.Б., Богатырева З.Н.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ФИТОЭКСТРАКТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФЛАВОНОИДЫ

Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет», 357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11
E-mail: elena.f.73@mail.ru

Аннотация. *Актуальность*. Существующие методы получения фитокомплексов и оценки качества лекарственных форм с ними не всегда позволяют оценить действительный состав и возможности. Представлены новые подходы к технологии получения и стандартизации жидких экстрактов гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) и астрагала серпоплодного (*Astragalus falcatus*). *Цель исследования.* Разработка и оценка методов стандартизации полученных экстрактов. *Материалы и методы***.** Обьектами исследования являются: трава астрагала серпоплодного и листья гинкго билоба, жидкие экстракты на их основе. Методы исследования: для экстракта из листьев гинкго билоба – спектрофотометрия (СФ-56), регистрировался батохромных сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330-350 до 390-410 нм. Идентификацию флавоноидов в экстракте жидком гинкго билоба листьев проводили с помощью хроматографии в тонком слое сорбента на пластинах «Сорбфил» с флуоресцентным индикатором в смеси хлороформ-метанол-вода. Количественное содержание суммы флавоноидов в спирто-водном извлечении из астрагала серпоплодного определяли спектрофотометрически с использованием стандартного образца (Robinin, Kaempferol 3-O-robinoside-7-O-rhamnoside, Sigma). Показания снимали на спектрофотометре ЮНИКО 2802S при длине волны 352-356 нм. В качестве раствора сравнения использовали 70% этанол. *Результаты.* Было установлено, что оптимальными методами экстракции из гинкго билоба является динамический метод. Для гинкго двулопастного оптимальным является метод реперколяции. Оптимальным методом экстракции из астрагала серпоплодного является метод бисмацерации. Количественное содержание определяли в обоих случаях методом спектрофотометрии. В жидком экстракте листьев гинкго двулопастного содержится около 5.0 % суммы флавоноидов в пересчете на рутин (дифференциальная спектрофотометрия). В спирто-водном извлечения из травы астрагала серпоплодного экстрактивные вещества – до 30.0%, содержание флавоноидов – не менее 4.5% в пересчете на робинин. *Заключение.* Изучены технологические параметры сырья, разработаны оптимальные условия экстракции, методики количественного определения суммы флавоноидов в экстрактах из листьев гинкго билоба, травы астрагала серпоплодного валидированы.

Ключевые слова: астрагал серпоплодный; робинин; гинкго билоба; жидкие экстракты; гинкгофлавонгликозиды; терпенолактоны; гинкголевые кислоты; спектрофотометрия.

Информация для цитирования: Разработка и исследование фитоэкстрактов, содержащих флавоноиды / М.А. Огай [и др.] // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С.90-103. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-10

M.A. Ogay, E.V. Kovtun, A.A. Chakhirova, A.B Samoryadova, Z.N. Bogatyreva

DEVELOPMENT AND INVESTIGATION OF PHYTOEXTRACTS CONTAINING FLAVONOIDS

Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University of the Ministry of Health Care of Russia,
11 Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532
E-mail: elena.f.73@mail.ru

Abstract. *Background*. Existing methods for obtaining phytocomplexes and evaluating the quality of their dosage forms do not always enable to evaluate the actual composition and its potential. The article presents some new approaches to the technology of obtaining and standardizing liquid extracts of ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) and sicklepod (*Astragalus falcatus*). *The aim of the study*. To develop and evaluate methods for standardizing the received extracts. *Materials and methods*. The objects of the study are: grass astragalus falcatus, leaves of ginkgo biloba, and their liquid extracts. Methods of investigation: for the extract from the leaves of ginkgo biloba – spectrophotometry (SF-56), a bathochromic shift of the absorption band of flavonoids from 330-350 to 390-410 nm was recorded. Identification of flavonoids in the extract of liquid ginkgo biloba leaves was carried out by chromatography in a thin layer of sorbent on "Sorbfil" plates with a fluorescent indicator in a chloroform-methanol-water mixture. The quantitative content of the sum of flavonoids in the alcohol-water extract from astragalus serotypes was determined spectrophotometrically using a standard sample (Robinin, Kaempferol 3-O-robinoside-7-O-rhamnoside, Sigma). The readings were taken on a UNICO 2802S spectrophotometer at a wavelength of 352-356 nm. 70% ethanol was used as the reference solution. *Results.* It was found that the optimal extraction method from ginkgo biloba is the dynamic method. For ginkgo biloba, the repercolation method is optimal. The optimal method of extraction from astragalus serotoplodny is the method of bismatching. The quantitative content was determined in both cases by spectrophotometry. The liquid extract of ginkgo biloba leaves contains about 5.0% of the sum of flavonoids in terms of routine (differential spectrophotometry). In alcohol-water extracts from the herb of astragalus, the extracts are up to 30.0%, the content of flavonoids is no less than 4.5% in terms of robinin. *Conclusion*. The technological parameters of raw materials were studied, the optimal extraction conditions, the methods for quantifying the amount of flavonoids in extracts from the leaves of ginkgo biloba, and the astragalus serpoplodal herbs were validated.

Keywords: Astragalus falcatus; robinin; ginkgo biloba; liquid extracts; ginkgoflonoglycosides; terpenolactones; ginkgolic acids; spectrophotometry.
Information for citation: Ogay MA, Kovtun EV, Chakhirova AA, et al. Razrabotka i issledovaniye fitoekstraktov, soderzhashchikh flavonoidy [Development and investigation of phytoextracts containing flavonoids]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):90-103. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-10

Введение. Препараты из лекарственного растительного сырья входят в состав более 85 фармакотерапевтических групп. Многие природные соединения, такие как флавоноиды, сапонины, алкалоиды и др., несмотря на высокий уровень развития синтетической химии и возможности их воспроизводства, фитопрепараты обладают преимуществами, за счет активной работы основных веществ с сопутствующими веществами [8, 10, 15, 16].

Ginkgo biloba L. (гинкго двулопастной), сем. *Ginkgoaceae* – жизненная форма – дерево. Современная Китайская фармакопея предлагает использовать листья гинкго *двулопасного* для лечения сердечно-сосудистой системы и заболеваний верхних дыхательных путей [6, 22].

Несмотря на то, что препараты гинкго двулопастного известны в восточной медицине с древнейших времен, в качестве официально утвержденных лекарственных средств они стали применяться только с 1960-х гг. XX века [6].

Установлено, что основными компонентами химического состава листьев гинкго двулопастного, обеспечивающими их фармакологическую активность, являются флавоновые гликозиды и терпеновые лактоны [5, 11, 25].

Лекарственное растительное сырье гинкго двулопастного описаны в ГФ XIII издания (гинкго двулопастного листья). Согласно классификации ЛРС, препараты гинкго двулопастного относятся к:

— ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции,

— корректоры нарушения мозгового кровообращения.

Фармакологическое действие экстрактов гинкго двулопастного листьев весьма разнообразно. Из основных фармакологических эффектов отмечено: антиагрегантное, венотонизирующее, ноотропное, антигипоксическое, антиоксидантное, улучшающее микроциркуляцию, противовоспалительное, мембраностабилизирующее, капилляропротекторное действие [15, 21].

Экстракт гинкго двулопастного листьев сухой, по данным литературы, благотворно влияет на обменные процессы в организме, реологические свойства крови, вазомоторные реакции кровеносных сосудов, мозговое кровообращение, в результате улучшения оксигенации и питания мозга. Экстракт гинкго билоба уменьшает проницаемость сосудов, оказывая выраженное противоотечное действие [9, 12], а также обладает антигипоксическими, антиоксидантными свойствами. Стандартизированный экстракт *Ginkgo biloba* может быть эффективен в качестве нефропротектора при клинической почечной недостаточности у человека. Это особенно важно, так как при острой почечной недостаточности (ОПН) возникает полиорганность нарушений с частым поражением центральной нервной системы, в отношении которого препараты гинкго двулопасного обладают выраженным благоприятным эффектом. Так, препарат Билобил, назначаемый в течение 2 месяцев детям с хроническим пиелонефритом, повышает скорость клубочковой фильтрации, более чем на 70% уменьшает протеинурию, устраняет никтурию, благоприятно влияет на тонус вегетативной иннервации и на церебральный кровоток [12, 14].

По ГФ XIII определение флавоноидов проводят в пересчете на рутин (не менее 0.5%) методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием стандартного образца рутина или удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом [3, 26].

В связи с этим, а также на основании сведений китайской медицины о широчайшем использовании сухого экстракта гинкго билоба представляло интерес получить жидкий экстракт гинкго, с высоким выходом биологически активных веществ, провести его оценку качества по показателям, предложенным ГФXIII для оценки сырья. Это поможет значительно повысить эффективность используемых способов экстрагирования [6, 26].

В настоящее время для получения экстракта гинкго двулопастного листьев используют смеси ацетон-вода различной концентрации (50-90% ацетон). Наиболее часто соотношение ацетон–вода составляет 60/40%. [1, 23, 24]

Astragalus falcatus (астрагал серповидный) – это многолетнее травянистое растение из семейства бобовых до 1 метра в высоту. Листья непарно перисто-сложные. Бледно-белые цветки собраны в многоцветковые кисти, плоды серповидно изогнутые, представляют из себя сидячие кожистые бобы. Ареал – Кавказ (Предкавказье, Восточное и Южное Закавказье, Дагестан) и юг европейской части. Содержит из активных веществ флавоноиды, главный из них – робинин (более 2%) [15].

Получаемые из листьев и цветов растения флавоноиды производят – фларонин, применяемый при лечении всевозможных заболеваний почек [4, 16].

Лекарственный препарат фларонин – это, прежде всего гипоазотемическое средство. Препарат усиливает азотовыделительную роль почек, улучшает почечное кровообращение, способствует снижению в крови содержания остаточного азота, креатинина и мочевины. К другим, его важным характеристикам можно отнести: противовоспалительное и диуретическое действие, а так же способность к снижению проницаемости капилляров. Фларонин довольно часто назначают для комплексного медикаментозного лечения некоторых форм простатита. Препарат, выпускается только в форме таблеток. Однако, данная лекарственная форма имеет такие побочные эффекты как, усугубление азотемии, аллергические реакции. Кратность приема 3 раза в день, ежедневно, в течение 20-30 дней. Такое длительное лечение при хроническом течении заболевания может растянуться на многие месяцы. Таким образом, актуальным вопросом является разработка новой лекарственной формы пролонгированного действия [19, 20].

Материалы и методы.

Объекты: объектами исследования послужило лекарственное растительное сырье астрагала серпоплодного и гинкго билоба, а также жидких экстрактов на их основе. В качестве методов исследования использованы спектрофотометрия. Используемое оборудование: спектрофотометр СФ-56 и хроматограф жидкостный с программным управлением и компьютерной обработкой результатов анализа.

Методы получения: для получения жидкого экстракта гинкго двулопастного листьев был использован метод перколяции с завершенным циклом (батарея из 5 диффузоров), соотношение сырье:экстрагент на ступени экстракции 1:4.5. Экстрагент спирт этиловый 70% [13]. Сырье с известной влажностью и коэффициентом поглощения загружали поочередно в диффузоры и заливали экстрагентом. Масса сырья и порции экстрагента во всех диффузорах были одинаковые.

Извлечения из травы астрагала серпоплодного получали методом бисмацерации. Измельченное и просеянное сквозь сито с величиной отверстий 1.0 мм сырье, помещают в мацерационный бак с механической мешалкой и заливают экстрагентом (70 % спирт этиловый) в соотношении 1:5, учитывая что $К_п$ = 1.3. Экстракция проводится в течение 2-х суток при периодическом перемешивании и при температуре 20-23 ^{0}С.

Сырье отжимают, фильтруют через двойной слой марли (Извлечение 1). Сырье снова заливают экстрагентом в соотношении 1:3, так же с учётом $К_п$ = 1.3. Время экстракции составляет 24 часа, при периодическом перемешивании (температура 20-23 ^{0}С). Сырье повторно отжимают и фильтруют через двойной слой марли (Извлечение 2). Смена экстрагента позволяет полнее истощить сырье и уменьшить потери при диффузии, так как поддерживается разность концентраций и как следствие этого – скорость диффузии. Оба извлечения объединяются.

Так как полученные настаиванием вытяжки представляли собой не прозрачные жидкости с определенным количеством

взвешенных частиц, требовалась обязательная очистка.

Очищали полученные спирто-водные извлечения с помощью фильтрации через двойной слой марли и их отстаивания в прохладном и темном месте. Выпавшие балластные вещества, повторно отфильтровывали [2]. Для фильтрования могут быть использованы фильтры разных конструкций, за исключением работающих под вакуумом, в которых происходит интенсивное испарение спирта. Повторная фильтрация позволяла максимально очистить полученные извлечения от балластных веществ, тем самым увеличивая концентрацию необходимых БАВ, в том числе флавоноидов. Для выбора оптимальных условий фильтрации рассмотрели основополагающие характеристики. По режиму работы все фильтры можно разделить на: периодического действия и непрерывного действия. В первом случае подача спирто-водного извлечения осуществляется дозировано с перерывами на проведение вспомогательных операций, таких как удаление слоя осадка, в то время как во втором случае процесс идет непрерывно. Так как фильтрация проходила с накоплением балластных веществ, то выбор был сделан в пользу периодической фильтрации. Учитывая, что продукт является спирто-водным извлечением, выбор был сделан в пользу фильтрации под давлением, так как интенсивное испарение спирта, являлось не целесообразным.

Микробиологические исследования

Определение активности изучаемых экстрактов проводили в 3-х чашках Петри одинакового диаметра с плоским дном. В чашки, устанавливаемые горизонтально, наливали по 15 мл расплавленного питательного агара. Слой агара в чашке Петри заливали 1-2 мл взвеси испытуемого микроба в физиологическом растворе. Затем излишек взвеси полностью удаляли, подсушивали поверхность агара в течение 30 минут. Затем сверлом (6 мм диаметром) пробуравливали 6 отверстий («колодцев») на расстоянии 2.5 см от центра и на одинаковом расстоянии друг от друга, «колодцы» заполняли образцами экстрактов и растворителем в соответствующей концентрации (контроль). Чашки оставляли при комнатной температуре на 30 минут, после чего их ставили в термостат при температуре 37 °С, не переворачивая, строго горизонтально, чтобы получить круглые зоны. Под крышки чашки Петри помещали стерильный фильтр во избежание попадания конденсата на лунки. Зоны угнетения измеряли через 16 часов. Оценка результатов проводилась по диаметру зон задержки роста вокруг «колодца», включая диаметр самого «колодца»:

— отсутствие зоны задержки роста – испытуемая культура не чувствительна к данной концентрации препарата;

— диаметр зоны задержки роста 10 мм – умеренная чувствительность культуры к данной концентрации препарата;

— диаметр зоны задержки роста более 10 мм – высокая чувствительность испытуемой культуры к данной концентрации препарата.

Были использованы штаммы микроорганизмов E. Coli (246, инкубированы на среде 1, при температуре 37 ºС), Salmonella (1711, инкубирована на средах 1, 16, 17, при температуре 37 ºС), S. aureus (HA – MRSA), Pseudomonas aeruginosa (282, инкубирована на среде 1, 2, при температуре 28 ºС). [18]

Стандартизация: стандартизацию проводили по методике ГФ XIII, извлечения для анализа получали используя разработанные ранее методики, в качестве извлекателя так же спирто-водная смесь определенной концентрации [3].

Нормировать качество экстракта жидкого листьев гинкго билоба предложено по содержанию суммы флавоноидов, содержанию сухого остатка и плотности. Обнаружение флавоноидов в исследуемом экстракте осуществляли посредством цианидиновой пробы.

Просмотр хроматограммы в УФ-свете осуществляли при длине волны 254±2 нм [17].

Количественное определение флавоноидов в экстракте гинкго двулопастного листьях жидком проводили методом дифференциальной спектрофотометрии.

Оценку качества экстрактов проводили на основании анализа 5 лабораторных серий согласно ГФ XIII [3].

В методах исследования, количественное содержание суммы флавоноидов в спирто-водном извлечении из травы астрагала серпоплодного определяли спектрофотометрически с использованием стандартного образца (Robinin, Kaempferol 3-*O*-robinoside-7-*O*-rhamnoside, Sigma). Показания снимали на спектрофотометре ЮНИКО 2802S (длина волны 354±2 нм). Определяли оптическую плотность стандартного образца робинина.

Результаты и обсуждения. Согласно данным литературы, достаточно обширную группу препаратов составляют те, которые в своем составе имеют в виде основного компонента флавоноиды [16]. Флавоноиды широко применяются как в народной, так и традиционной медицине. Это гетероциклические соединения различной окраски, преимущественно желто-оранжевого спектра. Флавоноиды можно назвать натуральными растительными красителями. Это строго соединения растительных объектов [8, 10]. Известно, что флавоноиды, по степени окисления внешней оболочки 3-углеродного фрагмента, можно классифицировать на: лейкоцианы; катехины; флавононы; халконы; флавононолы; антоцианы; ауроны; флавонолы; изофлавоны.

Рутин (витамин C_2, или Р) обладает сосудоукрепляющей активностью. Именно эта активность и обеспечивает фармакологические эффекты многих лекарственных форм, в частности препарата аскорутина (Ascorutinum), предназначенного для повышения эластичности капилляров и кровеносных сосудов. Следующий флавоноид – робинин [8].

Основной целью наших исследований было получение извлечений из лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды, основным компонентом которых были рутин и робинин. Выбор был остановлен на двух растительных объектах – гинкго двулопастном и астрагале серпоплодном, флавоноиды которых представлены в том числе, рутином и робинином.

Был получен жидкий экстракт гинкго двулопастного листьев с использованием в качестве экстрагента спирто-водной смеси 70% концентрации. Для получения серии экстрактов была проведена стандартизация сырья по содержанию флавоноидов%.

Извлечения для анализа получали, используя разработанные ранее методики, в качестве экстрагента использоалась спирто-водная смесь 70% концентрации. Таким образом, было определено содержание флавоноидов, в пересчете на рутин – 5.1% [3].

Получение жидкого экстракта гинкго двулопастного листьев (1:1). Для этого был использован метод реперколяции с завершенным циклом (батарея из 5 диффузоров), соотношение сырье : экстрагент на ступени экстракции 1:4.5. Экстрагент – спирт этиловый 70% [7].

Сырье загружали поочередно в диффузоры и заливали экстрагентом. Масса сырья и порции экстрагента во всех диффузорах были одинаковые.

Нормировали качество экстракта жидкого по содержанию суммы флавоноидов, содержанию сухого остатка и плотности. Обнаружение флавоноидов в исследуемом экстракте осуществляли, как указано в разделе материалы и методы, посредством цианидиновой пробы.

Просмотр хроматограммы в УФ-свете при длине волны 254±2 нм позволяет обнаружить 2 зоны адсорбции фиолетового цвета, расположение которых находится выше зоны на хроматограмме раствора СО рутина, а при обработке раствором диазобензолсульфокислоты в видимом свете также обнаруживались 2 зоны адсорбции желто-оранжевого цвета со значениями Rf 0.9 и 0.5 соответственно, что соответствует литературным данным [17].

Комплекс с раствором алюминия хлорида формирует максимум поглощения при

406 нм, который совпал с максимум поглощения спектра рутина с алюминия хлоридом и это позволяет проводить анализ при длине волны 254 нм (рис. 1, 2, 3).

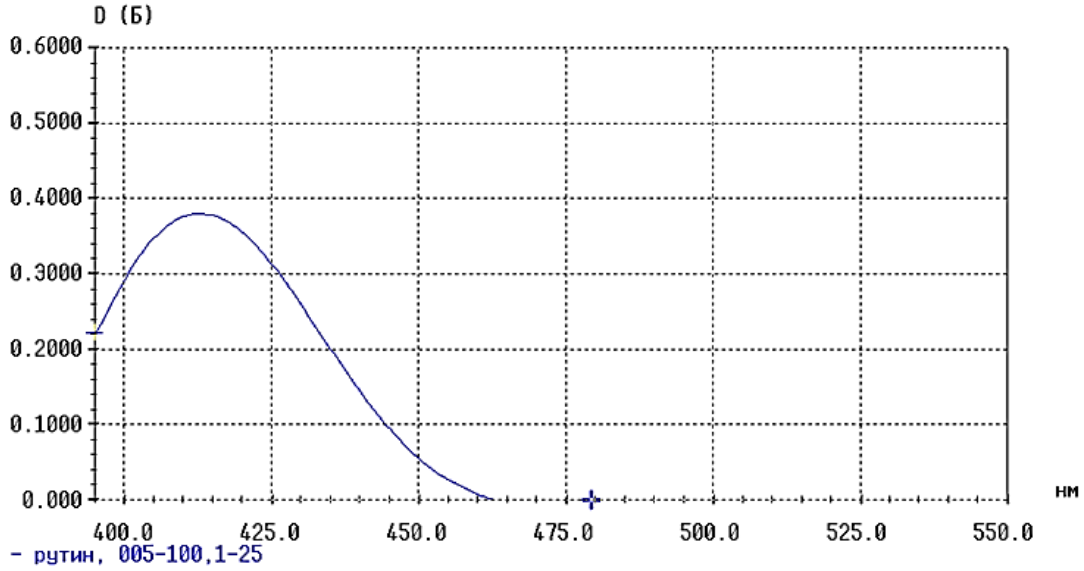

Рис. 1. Спектр поглощения 0.002% раствора СО рутина с алюминия хлоридом
Fig. 1. Absorption spectrum of 0.002% CO solution of rutin with aluminum chloride

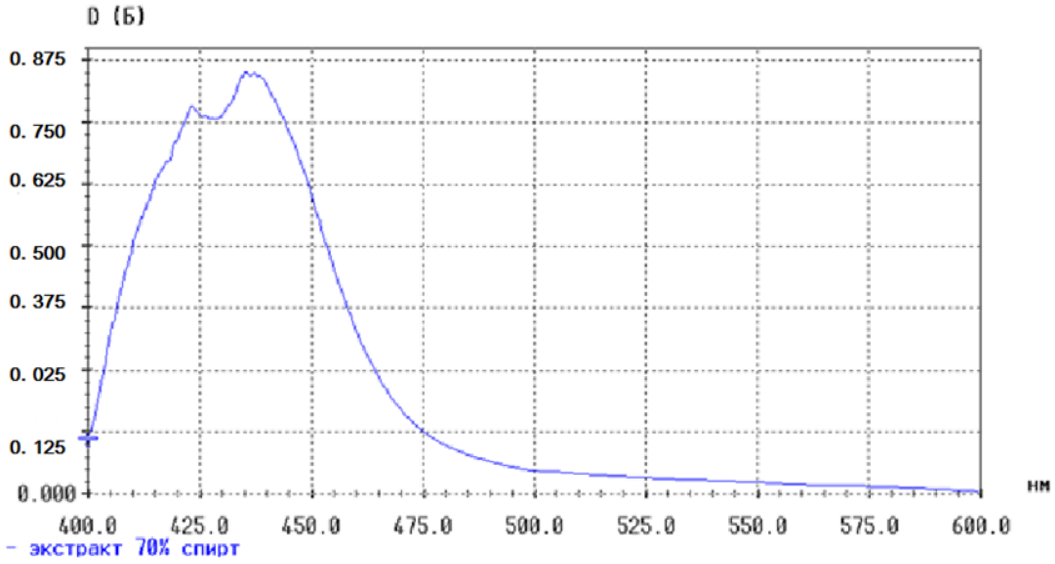

Рис. 2. Спектр поглощения экстракта Гингко двулопастного жидкого с алюминия хлоридом
Fig. 2. Absorption spectrum of Gingko extract of bilobate liquid with aluminum chloride

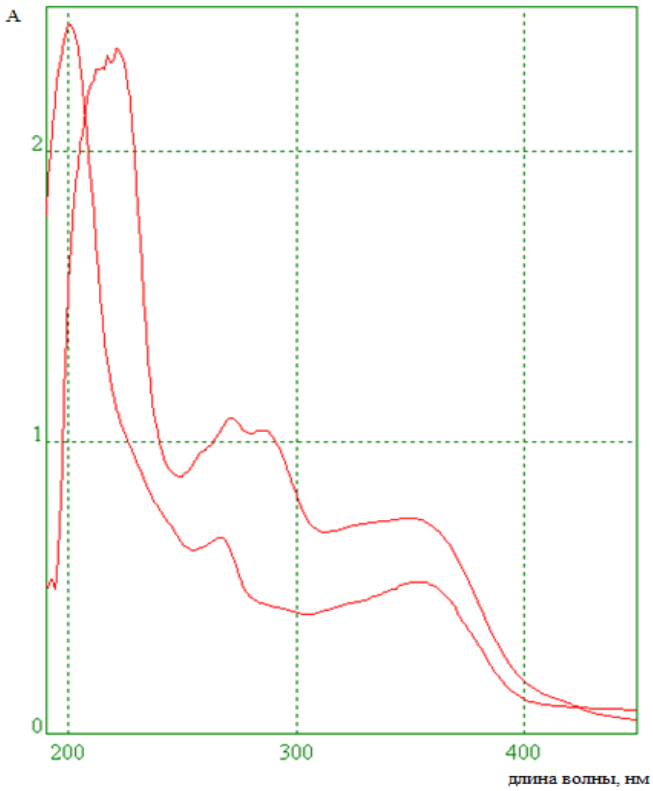

Рис. 3. Спектры поглощения этанольного извлечения астрагала серпоплодного (1) и стандартного образца робинина (2)
Fig. 3. Absorption spectra of ethanol extract of astragalus seroplodnogo (1) and standard sample of robinin (2)

Результаты количественного определения флавоноидов в экстракте гинкго двулопастного листьях жидком методом дифференциальной спектрофотометрии представлены в таблице 1.

В жидком экстракте листьев гинкго двулопастного содержится около 5.0% суммы флавоноидов в пересчете на рутин (дифференциальная спектрофотометрия).

Оценку качества экстрактов проводили на основании анализа 5 лабораторных серий (таблица 2) согласно ГФ XIII [6]. Эффективность экстракции составила 87-90%.

Таблица 1

Содержание суммы флавоноидов в жидком экстракте методом дифференциальной спектрофотометрии

Table 1

The content of the sum of flavonoids in a liquid extract by differential spectrophotometry

№ п/п	Оптическая плотность, А	Содержание, %	Метрологические характеристики
1	0.802	5.09	$\bar{X}$= 5.08
2	0.875	5.12	S=0.198
3	0.824	5.34	$S_{\bar{X}}$=0.07
4	0.799	4.85	$\Delta\bar{X}$=0.18
5	0.923	5.24	ε=±3.53 %
6	0.831	4.86	

Таблица 2

Оценка качества экстракта Гингко двулопастного листьев жидкого

Table 2

Evaluation of the quality of the liquid Gingko extract of bilobate leaf

Номер серии	Экстрактивные вещества, %	Плотность, г/см^3	Содержание суммы флавоноидов в % (в пересчете на рутин)
01	25.7	0.968	4.76
02	29.4	0.961	4.89
03	32.7	0.960	5.40
04	26.0	0.961	5.04
05	31.8	0.965	5.34

Нормы качества были установлены следующие: экстрактивные вещества – до 30.0%, содержание флавоноидов – не менее 4.5%.

Таким образом, получен экстракт гинкго двулопастного листьев жидкий, содержание флавоноидов в котором (в пересчете на рутин) составило не менее 5%, содержание экстрактивных веществ до 30%. Экстрагирование листьев гинкго двулопастного спиртом этиловым 70% представляет интерес из-за того, что позволяет извлечь значительное количество экстрактивных веществ (до 30%), в том числе около 5% флавоноидов (в пересчете на рутин). Это даёт возможность получить из листьев гинкго двулопастного высокоэффективный препарат с ярко выраженным противовоспалительным, мембраностабилизирующим, капилляропротекторным действием. Использование в технологии экстракта листьев гинкго двулопастного жидкого основ ресурсосберегающей технологии позволяет довести эффективность процесса экстрагирования до 90%

Извлечения получали методом бисмацерации, по методике указанной в разделе материалы и методы. Оба извлечения объединяются [13].

Так как полученные настаиванием вытяжки представляли собой не прозрачные жидкости с определенным количеством взвешенных частиц, требовалась обязательная очистка.

Очищали полученные спирто-водные извлечения с помощью фильтрации через двойной слой марли и их отстаивания в прохладном и темном месте. Выпавшие балластные вещества, повторно отфильтровывали [2].

Выбор был сделан в пользу периодической фильтрации и фильтрации под давлением.

Качественный анализ флавоноидов

На хроматограмме обнаружена зона, значение R_f которой совпадает со значением показателя R_f стандартного образца робинина (R_f = 0.25).

Как описано выше, в методах исследования, количественное содержание суммы флавоноидов определяли спектрофотометрически с использованием стандартного образца (Robinin, Kaempferol 3-*O*-robinoside-7-*O*-rhamnoside, Sigma). Показания снимали на спектрофотометре ЮНИКО 2802S (длина волны 354±2 нм). Определяли оптическую плотность стандартного образца робинина. В качестве раствора сравнения использовали 70% этанол [23].

Эксперимент показал, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на робинин в исследуемом сырье составляет 4.21÷4.30 %.

На основании полученных данных, можно сделать заключение о соответствии изучаемого объекта второй категории микробиологической чистоты [19]. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Установление срока годности проводили на 5 опытных сериях по следующим критериям: внешний вид, цвет и запах, микробиологическая чистота, качественный и количественный анализ. Результаты определения срока годности приведены в таблице 4.

Таблица 3

Микробиологическая чистота спирто-водного извлечения астрагала серпоплодного

Table 3

Microbiological purity of alcohol-water extraction of astragalus falcatus

Вид продукции	Общее количество бактерий	Общее количество грибов	Энтеробактерии и другие грамотрицательные бактерии	E. coli	Salmonella	S. aureus	Pseudomonas aeruginosa
	КОЕ* в 1 мл продукции		в 1 мл продукции				
Норма	не более 10^2 в 1 мл (суммарно)		не более 10^1	отсутствие	отсутствие	отсутствие	отсутствие
Спирто-водное извлечение астрагала серпоплодного	$5 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^1$	не обнаружено	нет	нет	нет	нет

* КОЕ – колониеобразующих единиц в 1 г или 1 $см^3$ продукции

Таблица 4

Результаты определения срока годности спирто-водного извлечения астрагала серпоплодного

Table 4

Results of determination of shelf life of alcohol-water extraction of astragalus falcatus

Наименование показателя	Характеристика и норма (СанПиН 1.2.681-97)	Сроки хранения				
		Извлечение				
		6 мес	12 мес	18 мес	24 мес	30 мес
Внешний вид	однородная масса	соответствует				
Цвет	соответствовать изделию	желто-коричневого цвета				
Запах	соответствовать изделию	с характерным запахом айвы				
Микробиологическая чистота (на 1 г.)	не более 10^2 аэробных бактерий и грибов (суммарно), не более 10^1 бактерий семейства Enterobacteriaceae и других грамотрицательных бактерий, отсутствие Pseudomonas aeruginosa и Staphylococcus aureus (Категория 2 по ГФ-XII)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	не соответствует
Качественный анализ (флавоноиды)		реакции положительные				Реакций нет
Количественный анализ (флавоноиды)		3.990	2.750	0.599	0.267	-

Срок хранения извлечения, составляет 24 месяца.

Наиболее важными сторонами экстракции является изучение технологических параметров сырья и выбор экстрагента. Тщательное изучение этих показателей послужило экспериментальной основой настоящего фрагмента.

В жидком экстракте листьев гинкго двулопастного содержится около 5.0% суммы флавоноидов в пересчете на рутин (дифференциальная спектрофотометрия).

Оценку качества экстрактов проводили на основании анализа 5 лабораторных серий (таблица 2) согласно ГФ XIII [6]. Эффективность экстракции составила 87-90%.

Заключение. Таким образом, установлено, что оптимальными методами экстракции из изучаемых объектов являются динамические методы. Для гинкго двулопастного оптимальным является метод реперколяции (батарея из 5 перколяторов), при соотношении сырья и экстрагента на ступени экстракции 1:4.5. Оптимальным методом экстракции из астрагала серпоплодного является метод бисмацерации. Соотношение сырье: экстрагент – 1:8 (дробная мацерация с использованием 2/3 и 1/3 экстрагента). Оптимальная концентрация экстрагента спирта этилового в обоих случаях является 70%. Проведена экспериментально, оценка качества сырья и фитоэкстрактов по одному показателю, что позволяет подтвердить теоретические расчеты.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Буланкин Д.Г. Исследование по стандартизации и разработке лекарственных средств на основе листьев гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.): автореф. дис. … канд. фарм. наук. Самара, 2011. 23 с.

2. Валевко С.А., Краснюк И.И., Михайлова Г.В. Фармацевтическая технология лекарственных форм. М.: Academia, 2007.

3. Государственная фармакопея XIII [Электронный ресурс]. URL: https://www.rosminzdrav.ru/poleznye-resursy/gosudarstvennaya-farmakopeya-rossiyskoy-federatsii-xiii-izdaniya (дата обращения: 19.03.2018).

4. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. URL: http://www.grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx (дата обращения 19.03.2018).

5. Кадыков А.С., Шахпаронова Н.В., Гришина Д.А. Роль препарата билобил в лечении больных с сосудистыми заболеваниями головного мозга // Русский медицинский журнал. 2008. Т. 16, N 26. С. 1736-1738.

6. Катунина Е.А. Гинкго билоба: итоги полувекового опыта применения. Полимодальность эффектов гинкго билоба: экспериментальные и клинические исследования // Неврология и ревматология. 2013. N 2. С. 53-57.

7. Ковтун Е.В. Разработка технологии и норм качества экстракта душицы обыкновенной жидкого: автореф. дис. … канд. фарм. наук. Пятигорск, 1999. 23 с.

8. Корулькин Д.Ю. Природные флавоноиды. Новосибирск: «Тео», 2007. 232 с.

9. Корчагина Д.В., Куркина А.В., Дубищев А.В., Кочнева О.Н., Гусев Д.О. Изучение нейротропной активности лекарственных препаратов на основе листьев гинкго двулопастного // Фундаментальные исследования. 2013. N 10-4. С. 812-815.

10. Куркин В.А., Буланкин Д.Г. Определение флавоноидов в сырье и препаратах гинкго двулопастного // Фармация. 2011. N 2. С.12-14.

11. Куркин В.А., Буланкин Д.Г. Даева Е.Д., Каденцев В.И. Флавоноиды листьев гинкго двухлопастного (*Ginkgo biloba* L.) // Химия растительного сырья. 2012. N 2. С. 85-88.

12. Лиманова О.А., Назаренко Е.М., Штрыголь С.Ю. Новые аспекты фармакологии стандартизованного экстракта Гинкго билоба (билобил): ренальные эффекты // Новости здравоохранения. 2002. N 3. С. 36-40.

13. Огай М.А., Степанова Э.Ф., Ларионов Л.П., Петров А.Ю. Идентификация и количественная оценка флавоноидов в комплексных фитопрепаратах // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2010. N 10(81). С. 85-88.

14. Онбыш Т.Е., Макарова Л.М., Погорелый В.Е. Механизмы реализации фармакологической активности экстракта гинкго билоба // Современные наукоемкие технологии. 2005. N 5. С. 22-25.

15. Пронченко Г.Е. Лекарственные растительные средства / Под ред. А.П. Арзамасцева, И.А. Самылиной. М.: Гэотар-Мед, 2002. 288 с.

16. Регистр лекарственный средств РЛС [Электронный ресурс]. URL: https://www.rlsnet.ru/ (дата обращения: 19.03.2018).

17. Саморядова А.Б., Ковтун Е.В. Разработка технологии и нормирования качества жидкого экстракта софоры желтеющей корней (*Sophorae flavescens*) с рациональным использованием сырья // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т.16. N 1-3. С. 821-824.

18. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. М.: Медицина, 1982. С.172-177.

19. Таблетки фларонин 0,03 (ВФС 42-1542-90).

20. «Фларонин» субстанция (ВФС 42-1520-85) 04-10.

21. American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium. Ginkgo leaf. Ginkgo leaf dry extract. Standards of analysis, quality control and therapeutics. 2003.

22. Assessment report on *Ginkgo biloba* L., folium [Electronic] // Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2014/02/WC500161208.pdf (Accessed 19 March 2018).

23. Lin L.Z., Chen P., Ozcan M., Harnly J.M. Chromatographic profiles and identification of new phenolic // J Agric Food Chem. 2008. Vol. 13(56(15)). P. 6671-9.

24. Quality control of flavonoids in Ginkgo biloba leaves by high-performance liquid chromatography with diodearray detection and on-line radical scavenging.

25. Rossi R., Basilico F., de Palma A., et al. Analytical methods for characterizing bioactive terpene lactones in ginkgo biloba extracts and performing pharmacokinetic studies in animal and human [Electronic] // Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies. 2011. URL: http://www.intechopen.com (Accessed 19 March 2018).

26. United States Pharmacopeia [Electronic]. URL: http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/m34982-powdered_ginkgo_extract.pdf (Accessed 19 March 2018)

References

1. Bulankin DG. Issledovaniye po standartizatsii i razrabotke lekarstvennykh sredstv na osnove list'yev ginkgo dvulopastnogo (*Ginkgo biloba* L.) [The study on standardization and development of medicines based on the leaves of ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)] [dissertation]. Samara; 2011. Russian.

2. Valevko SA, Krasnyuk II, Mikhailova GV. Farmatsevticheskaya tekhnologiya lekarstvennykh form [Pharmaceutical technology of medicinal forms]. Moscow: Academia, 2007.

3. Gosudarstvennaya farmakopeya XIII [State Pharmacopeia XIII] [Internet] [cited 2018 March 19]. Available from: https://www.rosminzdrav.ru/poleznye-resursy/gosudarstvennaya-farmakopeya-rossiyskoy-federatsii-xiii-izdaniya. Russian.

4. Gosudarstvennyy reyestr lekarstvennykh sredstv [State register of medicines] [Internet]. [date of access: 19 March, 2018]. Available from: http://www.grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx. Russian.

5. Kadykov AS, Shakhparonova NV, Grishina DA. Rol' preparata bilobil v lechenii bol'nykh s sosudistymi zabolevaniyami golovnogo mozga [The role of bilobyl in the treatment of patients with cerebrovascular diseases]. Russkiy meditsinskiy zhurnal. 2008;16(26):1736-1738. Russian.

6. Katunina EA. Ginkgo biloba: itogi poluvekovogo opyta primeneniya. Polimodal'nost' effektov ginkgo biloba: eksperimental'nyye i klinicheskiye issledovaniya [Ginkgo biloba: the results of half a century of experience. Polimodality of the effects of ginkgo biloba: experimental and clinical studies]. Nevrologiya i revmatologiya. 2013;2:53-57. Russian.

7. Kovtun EV. Razrabotka tekhnologii i norm kachestva ekstrakta dushitsy obyknovennoy zhidkogo [Development of technology and quality standards for extract of common origanum liquid] [dissertation]. Pyatigorsk; 1999. Russian.

8. Korulkin DYu. Prirodnyye flavonoidy [Natural flavonoids]. Novosibirsk: Teo; 2007. 232 p. Russian.

9. Korchagina DV, Kurkina AV, Dubishchev AV, Kochneva ON, Gusev DO. Izucheniye neyrotropnoy aktivnosti lekarstvennykh preparatov na osnove list'yev ginkgo dvulopastnogo [The study of neurotropic activity of drugs based on

ginkgo biloba leaves]. Fundamental research. 2013;10-4:812-815. Russian.

10.Kupkin VA, Bulankin DG. Opredeleniye flavonoidov v syr'ye i preparatakh ginkgo dvulopastnogo [Determination of flavonoids in raw materials and preparations of ginkgo biloba]. Farmatsiya. 2011;2:12-14. Russian.

11.Kurkin VA, Bulankin DG, Dayeva ED, Kadentsev VI. Flavonoidy list'yev ginkgo dvukhlopastnogo (*Ginkgo biloba* L.) [Flavonoid leaves of ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)]. Khimiya rastitelnogo syrya. 2012;2:85-88. Russian.

12.Limanova OA, Nazarenko ME., Shtrygol SYu. Novyye aspekty farmakologii standartizovannogo ekstrakta Ginkgo biloba (bilobil): renal'nyye effekty [New aspects of the pharmacology of the standardized extract of Ginkgo biloba (bilobyl): renal effects]. Health News. 2002;3:36-40. Russian.

13.Ogay MA, Stepanova EF, Larionov LP, Petrov AYu. Identifikatsiya i kolichestvennaya otsenka flavonoidov v kompleksnykh fitopreparatakh [Identification and quantitative assessment of flavonoids in complex phytopreparations]. Belgorod State University Scientific Bulletin: Medicine. Pharmacy. 2010;10(81):85-88. Russian.

14.Onbysh TE, Makarova LM, Pogorely VE. Mekhanizmy realizatsii farmakologicheskoy aktivnosti ekstrakta ginkgo biloba [Mechanisms for the realization of the pharmacological activity of the extract of ginkgo biloba]. Modern high technologies. 2005;5:22-25. Russian.

15.Pronchenko GE. Lekarstvennyye rastitel'nyye sredstva [Medicinal herbal remedies] / Arzamastsev AP, Samylina IA, editors. Moscow: Geotar-Med; 2002. 288 p. Russian.

16.Registr lekarstvennyy sredstv RLS [Drug Register] [Internet] [cited 2018 March 19]. Available from: https://www.rlsnet.ru/. Russian.

17.Samoryadova AB, Kovtun EV. Razrabotka tekhnologii i normirovaniya kachestva zhidkogo ekstrakta sofory zhelteyushchey korney (Sophorae flavescens) s ratsional'nym ispol'zovaniyem syr'ya [Development of technology and normalization of the quality of liquid extract of Sophora flavescens roots with rational use of raw materials]. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. 2014;16(1-3):821-824. Russian.

18. Birger MO, editor. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya [A handbook of microbiological and virological methods of research]. Moscow: Meditsina; 1982. P. 172-177. Russian.

19.Tabletki flaronin [Tablets of flaronin 0.03]. Russia. Standard No. 42-1542-90. Russian.

20."Flaronin" substantsiya ["Flaronin" substance]. Russia. Standard No. 42-1520-85. Russian.

21.American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium. Ginkgo leaf. Ginkgo leaf dry extract. Standards of analysis, quality control and therapeutics. 2003.

22.Assessment report on *Ginkgo biloba* L., folium. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) [Internet] [cited 2018 March 19]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2014/02/WC500161208.pdf.

23.Lin LZ, Chen P, Ozcan M, Harnly JM. Chromatographic profiles and identification of new phenolic. J Agric Food Chem. 2008;13(56(15)):6671-9.

24.Quality control of flavonoids in Ginkgo biloba leaves by high-performance liquid chromatography with diodearray detection and on-line radical scavenging.

25.Rossi R, Basilico F, de Palma A, et al. Analytical methods for characterizing bioactive terpene lactones in ginkgo biloba extracts and performing pharmacokinetic studies in animal and human. Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies [Internet]. 2011 [cited 2018 March 19]. Available from: http://www.intechopen.com.

26.United States Pharmacopeia [Internet] [cited 2018 March 19]. Available from: http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/m34982-powdered_ginkgo_extract.pdf

Огай Марина Алексеевна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии.

Ковтун Елена Владимировна, кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии.

Чахирова Анна Анатольевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии.

Саморядова Анна Борисовна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии.

Богатырева Зинаида Николаевна, аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии.

Ogay Marina Alekseyevna, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor of the Department of Pharmaceutical Technology with the course of medical biotechnology.
Kovtun Elena Vladimirovna, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Senior Lecturer of the Department of Pharmaceutical Technology with the course of medical biotechnology.
Chahirova Anna Anatolievna, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Technology with the course of medical biotechnology.
Samoryadova Anna Borisovna, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Toxicological Chemistry.
Bogatyreva Zinaida Nikolaevna, Post-graduate Student of the Department of Pharmaceutical Technology with the course of medical biotechnology.

Статья поступила в редакцию 22 марта 2018 г.