

Коробкова Екатерина Олеговна

**Метаболическое профилирование у больных артериальной гипертензией с
дисфункцией эндотелия и метаболическим синдромом.**

14.01.05 – Кардиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук
профессор

Беленков Юрий Никитич

Официальные оппоненты:

Бубнова Марина Геннадьевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел реабилитации и вторичной профилактики сочетанной патологии, руководитель отдела

Иванова Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико - стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра клинической функциональной диагностики, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «14» сентября 2021 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.05 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент



Брагина Анна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы

Артериальная гипертония по-прежнему является одной из самых распространённых патологий во всем мире. Кроме того, данное заболевание является важным предиктором возникновения тяжёлых сердечно-сосудистых осложнений, таких как острый инфаркт миокарда (ОИМ), острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), хроническая сердечная недостаточность (ХСН). По последним статистическим данным Министерства здравоохранения за 2017 год в России насчитывалось более 4,7 миллионов больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), из которых третью часть составляют больные АГ [Росстат, 2018]. Клинические исследования в области механизмов развития АГ, поражения органов-мишеней и лекарственной терапии проводятся уже в течение многих десятилетий [Neaton J.D. 1992; Psaty V.M. 1997; Малютина С. К., 2003]. Общеизвестно, что факторы риска, такие как гиперхолестеринемия, избыточная масса тела и другие, а также развитие дисфункции эндотелия (ДЭ) лежат в основе развития АГ, как и всех ССЗ. Кроме того, АГ является одним из наиболее значимых компонентов метаболического синдрома (МС), являющийся совокупностью нарушений липидного, пуринового и углеводного обмена, которые проявляются увеличением массы висцерального жира и инсулинорезистентностью. По данным метаанализа 87 исследований было показано, что риск развития сердечно-сосудистых событий и смертность от них увеличивается в 2 раза при наличии МС [Moebs S. 2007, Mottillo S. 2012]. Распространённость МС составляет от 20 до 40% в разных странах. Согласно последним статистическим данным, в Российской Федерации отмечается неуклонный рост людей, страдающих ожирением. По результатам исследования в 2019 году установлено, что 17,8% мужчин и 24,5% женщин имеют ожирение первой, второй и третьей степени. Избыточная масса тела зафиксирована у 46,9% мужчин и 34,7% женщин [Росстат, 2019]. Абдоминальное ожирение, являясь основным компонентом МС, взаимосвязано с ДЭ посредством повышенного количества адипокинов вследствие наличия большого количества жировой ткани и увеличения уровня свободных жирных кислот, а также за счет развития инсулинорезистентности [Prieto D., 2014]. За последние годы было проведено множество экспериментальных и клинических исследований по изучению сосудистой стенки и взаимосвязи между АГ, МС и ДЭ [Godo S. 2017]. Определение функции эндотелия предоставляет ценную информацию о состоянии сердечно-сосудистой системы на ранних этапах ССЗ и даёт возможность для поиска новых стратегий терапии сосудистых нарушений [Giannotti G. 2007]. Неинвазивные подходы оценки функции эндотелия рассматриваются как наиболее перспективные для широкого применения. Одним из самых распространённых методов неинвазивной оценки функции эндотелия является анализ формы объёмной пульсовой

волны, при помощи периферической артериальной тонометрии на аппаратах EndoPAT сертифицированный Канадской ассоциации по стандартизации и пользующийся популярностью во всем мире [Moerland M. 2012]. Российским аналогом EndoPAT является аппарат Ангиоскан и его показатели функции эндотелия такие как индекс окклюзии, индекс аугментации и другие. Изучена роль ДЭ в субклиническом повреждение органов мишеней, ремоделировании сердца и сосудов при различной сердечно-сосудистой патологии [Nadaud S.et al. 1998]. Клинические исследования в области взаимосвязи наличия ДЭ с критериями МС проводятся уже в течение нескольких лет [Vander Heijden D.J.et al., 2017]. В какой степени определение эндотелиальной функции и МС на ранних этапах может улучшить прогнозирование сердечно-сосудистого риска в дополнение к точной оценке известных сердечно-сосудистых факторов риска, в настоящее время ещё мало изучено и исследования в данной области только начинаются.

На настоящий момент, как фундаментальные, так и клинические исследования показали всю важность глубокого пониманием механизмов развития и прогрессирования ССЗ на молекулярном уровне [Zhang L.et.al. 2018]. Изучение метаболизма пациентов и циркулирующих метаболитов получило широкое распространение в последние десятилетия. В медицине целью метаболомного профилирования является поиск новых биомаркеров заболеваний для ранней диагностики патологии или поиск мишеней для терапевтического воздействия. При проведении метаболомного анализа появляется возможность выявить метаболические изменения в периферической крови, тканях или биологических жидкостях на ранних стадиях повреждения органов, предшествующих возникновению болезни. Поэтому, данное направление становится все более широко распространенным и популярным, а так же крайне перспективным, так как помогает выявить пациентов с высоким риском развития патологии и в частности, ССЗ. Метаболомное профилирование является методом, дающим возможность поиска новых маркеров, ассоциированных с оценкой риска прогрессирования ССЗ. Однако, в настоящий момент недостаточно освещены вопросы поиска доклинических биомаркеров поражения сердечно-сосудистой системы на ранних этапах. Поэтому изучение метаболических процессов, поиск новых маркеров, объектов терапевтического воздействия и дополнительных индивидуальных факторов риска представляется перспективным направлением.

Степень разработанности

В настоящий момент широко распространены исследование метаболомного профиля у пациентов на различной стадии кардиальной патологии, в том числе и пациентов с артериальной гипертонией. (Guy Eelen et al., 2015; Giannotti G. et al., 2007; Vanhoutte P.M. et al., 2015; Deidda M. et al., 2015). Существуют также исследования по оценке функции эндотелия и пациентов с артериальной гипертонией (Surdacki A. et al.,

1999, Changwei Li et al., 2019, Li J et al., 2019), пациентов с ожирением и метаболическим синдромом (Petri K Wiklund et al., 2014; Chen H. et al. 2015; Minoo Bagheri et al. 2018). Однако, исследований, в которых бы изучался метаболомный профиль пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом, как совокупности факторов, и использовался анализ из взаимоотношений с показателями структурно-функционального состояния сосудов микро- и макроциркуляторного русла в российской популяции ранее не проводился.

Цель исследования

Изучить метаболомный профиль больных артериальной гипертонией и метаболическим синдромом с дисфункцией эндотелия с помощью метаболомного профилирования.

Задачи исследования

1. Оценить состояние функции эндотелия в группе пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом и в контрольной группе.
2. Выявить спектр метаболитов, наиболее характерных для пациентов артериальной гипертонией с метаболическим синдромом и наличием дисфункции эндотелия по сравнению с контрольной группой на основании проведения нецелевого метаболомного анализа образцов крови
3. Определить специфические количественные характеристики метаболомного профиля у пациентов артериальной гипертонией с метаболическим синдромом и наличием дисфункции эндотелия с помощью целевого метаболомного анализа.
4. Изучить взаимосвязь метаболомного профиля пациентов артериальной гипертонией с метаболическим синдромом с показателями функции эндотелия.
5. Изучить взаимосвязь компонентов метаболического синдрома и параметров ремоделирование сердца с результатами целевого метаболомного профилирования.

Научная новизна

Научная новизна данного исследования заключается в том, что впервые получен метаболомный профиль пациентов артериальной гипертонией с метаболическим синдромом и дисфункцией эндотелия в российской популяции. Впервые изучена взаимосвязь МС, как совокупности факторов риска, АГ с показателями функции эндотелия, проведено сопоставление метаболомных профилей, а так же выделен ряд метаболитов как дополнительных факторов риска.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты проведённого исследования позволяют выделить метаболиты, ассоциированные с поражением органов мишеней при артериальной гипертонии в сочетании с метаболическим синдромом, как совокупности факторов риска. Полученные

метаболиты могут рассматриваться в качестве дополнительных индивидуальных факторов риска и возможных целей для персонализированного подхода в лекарственной терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Для метаболомного профиля пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом характерно повышение уровней холина, асимметричного диметиларгенина, серина и ряда коротко - и среднецепочечных карнитинов, что свидетельствует о нарушении в обмене жирных кислот.

2. Показатели дисфункции эндотелия у пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом ассоциированы с повышенными уровнями тирозина, цистеина и ряда среднецепочечных ацилкарнитинов, а так же аминокислот с разветвлёнными боковыми цепями – валина и лейцина, что свидетельствует о нарушении в обмене глутаминовой кислоты.

3. Поражение органов-мишеней, дислипидемия и высокий индекс массы тела (ИМТ) у пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом ассоциированы с повышением изолейцина, тирозина и лейцина, и короткоцепочечных карнитинов, что свидетельствует о нарушении катаболизма аминокислот с разветвленными боковыми цепями.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность данных подтверждается объемом выборки пациентов и статистической обработкой полученных результатов. Апробация диссертационной работы осуществлена 29 марта 2020 г. на заседании кафедры госпитальной терапии № 1 Института клинической медицины имени Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатные научные работы в отечественных и зарубежных изданиях, из которых все статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ и Scopus.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка использованной литературы, включающего 20 отечественных и 77 иностранных источников, списка иллюстративного материала, состоящий из 26 рисунков и 10 таблиц, а так же списка опубликованных работ и докладов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Дизайн исследования и общая характеристика участников исследования

В проспективном нерандомизированном сравнительном исследовании, которое проводилось на базе отделения кардиологии №1 Университетской клинической больницы №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Министерства Здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), приняли участие 60 человек. В основную группу было включено 30 пациентов с установленным диагнозом АГ и достоверным наличием МС - 16 мужчины (53,3%) и 14 женщин (46,7%), средний возраст которых составил $58,62 \pm 12,71$ лет. Согласно российским клиническим рекомендациям за 2018 год, АГ диагностировалась, если офисное значение систолического артериального давления (САД) больше или равно 140 мм рт.ст. и/или диастолическое артериальное давление (ДАД) больше или равно 90 мм рт.ст. МС считался достоверным при наличии основного критерия (центральный тип ожирения - окружность талии (ОТ) у женщин более 80 см, у мужчин - более 94 см) и как минимум двух дополнительных критериев (повышение уровня АД выше 140/90 мм рт.ст. или прием антигипертензивной терапии, дислипидемия, нарушение гликемии натощак или нарушение толерантность к глюкозе), согласно рекомендациям по ведению больных с МС, разработанным по поручению Минздрава России. В контрольную группу было включено 13 мужчин (43,3%) и 17 женщин (56,7%) средний возраст которых составил $48,7 \pm 8,89$ лет, у которых отсутствовали клинические и лабораторные признаки поражения сердечно-сосудистой системы. Общие характеристики участников исследования представлены в таблице 1. Все участники исследования подписывали информированное согласие, одобренное локальным этическим комитетом Сеченовского Университета. При отборе участников исследования были учтены критерии включения и исключения.

Критериями не включения и исключения из исследования являлись впервые выявленные или уже имеющиеся ИБС, ХСН, вторичная АГ, цереброваскулярные расстройства; тяжелые нарушения функции почек и печени, легочная патология, состояния, нарушающие всасывание питательных веществ или изменяющие гормональный фон, злокачественные новообразования, аутоиммунные и психические заболевания и т.д.

Всем участникам исследования проводилось физикальное обследование, выполнение общего, биохимического и гормонального анализов крови, определение состояния органов-мишеней – сердца (проведение электрокардиографии и эхокардиографии с доплеровским анализом) и почек (проведение ультразвукового исследования почек, определение уровня креатинина, расчет скорости клубочковой

фльтрации); при необходимости проведение УЗИ сосудов с доплеровским анализом, выполнение суточного мониторирования АД (СМАД).

Таблица 1 — Характеристика пациентов группы АГ и МС и контрольной группы

	Пациенты АГ и МС Мужчины (n=16) M ± SD	Пациенты АГ и МС Женщины (n=14) M ± SD	Контрольная группа Мужчины (n=13) M ± SD	Контрольная группа Женщины (n=17) M ± SD	Статистическая значимость
Окружность тали, см	108,5 ± 13,39	98,85 ± 9,28	90,09 ± 9,45	83,76 ± 11,33	p ¹⁻² = 0,0005 p ³⁻⁴ = 0,0001 p* < 0,0001
САД, мм рт.ст.	137,25 ± 10,20	133,92 ± 9,73	125,7 ± 8,21	120,11 ± 8,99	p ¹⁻² = 0,0003 p ³⁻⁴ = 0,0019 p* < 0,0001
ДАД, мм рт.ст.	90,68 ± 7,15	75,2 ± 9,33	80,0 ± 7,2	74,41 ± 9,02	p ¹⁻² = 0,7493 p ³⁻⁴ = 0,0002 p* = 0,0126
Триглицериды, ммоль/л	1,78 ± 1,56	1,41 ± 0,64	1,44 ± 0,67	1,3 ± 0,61	p ¹⁻² = 0,5540 p ³⁻⁴ = 0,5680 p* = 0,3861
ЛПВП, ммоль/л	1,28 ± 0,28	1,51 ± 0,30	1,61 ± 0,44	1,76 ± 0,49	p ¹⁻² = 0,1137 p ³⁻⁴ = 0,0289 p* = 0,0076
ЛПНП, ммоль/л	3,08 ± 1,27	3,45 ± 1,04	3,26 ± 1,6	2,9 ± 0,74	p ¹⁻² = 0,2517 p ³⁻⁴ = 0,9093 p* = 0,5960
Креатинин, мг/дл	104,59 ± 18,82	84,52 ± 6,17	99,92 ± 11,08	88,80 ± 14,55	p ¹⁻² = 0,3031 p ³⁻⁴ = 0,3581 p* = 0,6803
Глюкоза, ммоль/л	5,63 ± 0,97	5,4 ± 0,65	5,1 ± 0,50	4,49 ± 0,56	p ¹⁻² = 0,0756 p ³⁻⁴ = 0,1455 p* = 0,0187
Диастолическая функция, Е/А	1,13 ± 0,16	1,27 ± 0,16	0,82 ± 0,18	0,87 ± 0,26	p ¹⁻² = 0,0002 p ³⁻⁴ = 0,0002 p* = 0,0187
ТЗС ЛЖ, мм	11,44 ± 0,96	10,2 ± 1,25	10,00 ± 0,53	8,72 ± 1,00	p ¹⁻² = 0,0078 p ³⁻⁴ = 0,0002 p* < 0,0001
ТМЖП, мм	11,38 ± 1,02	10,07 ± 1,14	9,87 ± 0,67	8,45 ± 1,03	p ¹⁻² = 0,0025 p ³⁻⁴ = 0,0003 p* < 0,0001

Значения возраста и ИМТ рассчитаны как среднее значение ± стандартное отклонение (M ± SD), p – статистическая значимость. P¹⁻² – различия между мужчинами группы АГ и МС и контрольной группы, P³⁻⁴ различия между женщинами группы АГ и МС, P - различия между группами пациентов с АГ и МС и контрольной группой. ТЗС ЛЖ - толщина задней стенки левого желудочка, ТМЖП - Толщина межжелудочковой перегородки.

Большая доля наблюдаемых в группе АГ и МС страдала ожирением 1 степени и избыточной массой тела (11 и 10 больных, соответственно). Нормальная масса тела была только у 1 пациента, ожирением 3 степени страдало 2 человека, ожирение 2 степени выявлено у 6 больных. Среди участников контрольной группы большую долю составляют люди с избыточной массой тела (16 человек). Нормальной массой тела обладают 9 пациентов, и только 5 человек страдают ожирением 1 степени.

В структуре сопутствующей патологии у пациентов основной группы преобладали дислипидемия, на момент обследования скоррегированная гиполипидемической терапией - 63,3% случаев, атеросклеротическое поражение аорты выявлено у 13 пациентов (43,3%) и магистральных артерий головы в 5 (16,6%) случаях; мочекаменная болезнь (МКБ) была у 5 пациентов (16,6%), гиперурикемия так же отмечалась у 16,6% пациентов. Фибрилляцией предсердий страдало 23,3% больных. Так же отмечались сахарный диабет 2 типа и нарушение толерантности к глюкозе по 1 пациенту и у 2 человек диагностировано апноэ сна. В связи с тем, что все больные находились на гипотензивной лекарственной терапии ингибиторами АПФ (53%), антагонистами рецепторов ангиотензина II (30%), бета-адреноблокаторами (37%), блокаторами кальциевых каналов (17%), диуретиками (30%), средние уровни АД при СМАД у большинства пациентов определялись в пределах нормальных значений. Гиполипидемическую терапию принимали 13 человек (43,3%), однако, целевые уровни ЛПНП в 90% случаев достигнуты не были. Антикоагулянты получало 23% участников основной группы в связи с сопутствующей патологией, и 3 человека находилось на терапии аллопуринолом.

Кроме того, участникам исследования проводились **дополнительные обследования:**

- Проведение фотоплетизмографии для неинвазивной оценки функции эндотелия у всех групп участников исследования на аппарате «Ангиоскан-01».
- Проведение нецелевого метаболомного профилирования образцов крови всех участников исследования с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ) системы Waters Acquity UPLC в сочетании с масс-спектрометром высокого разрешения (Q-TOF, Xevo G2-XS, Waters, США)
- Проведение целевого метаболомного профилирования крови всех участников исследования с применением СВЭЖХ системы Waters Acquity UPLC в сочетании с тройным квадрупольным анализатором (TSQ, Xevo TQ-S micro, Waters, США).

Оценка функции эндотелия. Для определения функции эндотелия выполнялась фотоплетизмография на аппарате «Ангиоскан-01» (Россия), проводимая натощак. Перед исследованием пациент воздерживался от употребления чая, кофе, алкоголя, курения. Проводилась регистрация пульсовой волны в покое и при проведении

функциональной пробы с реактивной гиперемией. Оценивались структурные и функциональные показатели: индекс аугментации как отношение разности кровенаполнения периферических капилляров в поздней и средней систоле к амплитуде пульсовой волны (Alp , N для возраста 20-29 лет от -23,27 до 16,87, N для возраста 30-39 лет от -15,57 до 24,57, N для возраста 40-49 лет от -7,87 до 32,27, N для возраста 50-59 лет от -0,17 до 39,97, N для возраста 60-69 лет от 7,53 до 47,67, N для возраста 70-79 лет от 15,23 до 55,37, N для возраста 80-89 лет от 22,93 до 63,07) %, индекс аугментации в пересчете на пульс 75 ударов в минуту ($Alp75$)%. При проведении окклюзионной пробы, с помощью манжеты установленной на плече, анализировалась информация о состоянии эндотелиальной функции в области мелких резистивных артерий (системе микроциркуляции) и крупных артерий мышечного типа: индекс окклюзии по амплитуде определялся как прирост кровенаполнения капилляров руки с поправкой на изменение амплитуды сигнала в референсном канале (ИО, $N > 1.8$), сдвиг фаз между каналами как время отставания пульсовой волны на руке где проводится окклюзия (СФ, $N > 10$) мс.

Кроме того, по необходимости или больным с сопутствующими заболеваниями проводились дополнительные обследования такие как, рентгенография органов грудной клетки; УЗИ магистральных артерий головы, УЗИ щитовидной железы, исследование функции внешнего дыхания.

Исследование метаболомного профиля. Для определения метаболомного профиля группы АГ и МС и контрольной группы проводился дополнительный забор крови из вены локтевого сгиба в пробирку с калиевой солью этилендиаминтетраацетата объемом 9 мл. Исключался прием всех витаминов, минералов, биологически активных добавок, аминокислот и, спортивных и энергетических напитков, карнитина, альфа-кетоглутарата, добавок, содержащих яблочную кислоту, соли лимонной кислоты, малеиновой, или любые соли оротовой кислоты. За 24 часа до дополнительного забора по возможности исключался прием пищи или питья любой продукции, содержащей сахарозаменители (аспартат, NutraSweet и т. д.) глутаматмонотригидрофосфата натрия. После дополнительного забора крови проводилось отделение плазмы при 2000 оборотов в минуту в течение 15 минут. Аликвоты хранились при температуре -80°C до транспортировки с сохранением холодового режима в лабораторию фармакокинетики и метаболомного анализа Института трансляционной медицины и биотехнологии Сеченовского Университета для проведения нецелевого метаболомного профилирование с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометром высокого разрешения и целевого метаболомного анализа образцов с применением ВЭЖХ-МС/МС.

Нецелевое метаболомное профилирование. Панорамное нецелевое профилирование методом ГХ-МС выполнялось в лаборатории для обнаружения наиболее полного спектра метаболитов: органических кислот, аминокислот, углеводов. Для

получения метаболомного профиля образец после соответствующей подготовки анализировали на газовом хромато-масс-спектрометре Маэстро (Россия) с квадрупольным анализатором Agilent 5977 (США). Первичная информация об интенсивностях пиков, их времени удерживания и масс-спектральных характеристиках была получена после обработки хроматограмм при помощи программного обеспечения XCMS (Scripps, США). Проведена статистическая обработка массива данных с помощью программ Statistica 8,0 (Statsoft, Inc.); SIMCA 13,0 (Umetrics, Sweden) и Metaboanalyst 4.0 (Канада). Идентификация метаболитов проводилась при помощи библиотеки масс-спектральной информации GMD.

Целевое метаболомное профилирование. Количественный целевой анализ значимых метаболитов выполнен методом ВЭЖХ-МС/МС. По разработанным методикам в пробах были измерены стероиды, водорастворимые витамины, аминокислоты, ацилкарнитины. Для получения метаболомного профиля образец после специальной подготовки анализировали на газовом хромато-масс-спектрометре Маэстро (Россия) с квадрупольным анализатором Agilent 5977 (США). Метаболиты определялись с помощью Mass Chrome и Non Derivatized 57000 Kit (Chromsystems, Германия). Пять мкл аликвоты каждого образца плазмы смешивали с 50 мкл изотопно маркированного раствора внутренних стандартов (МКВС) в метаноле в микротитровальной пластине для осаждения белка. Раствор был изготовлен в соответствии с инструкциями по подготовке проб комплекта в метаноле. После 10 минут инкубации микротитровальная пластина центрифугировалась в течение 5 минут при 100xg. Впоследствии 40 мкл сверхнагнетателя было перенесено на микротитровальную пластину для анализа впрыска потока в сочетании с тандемным масс-спектрометром. Анализ проводился в положительном режиме ионизации методом электрораспыления с помощью микросистемы Waters TQ-S, оснащенной источником ионизации электрораспылением (ESI) и соединенной с насосом Waters Acquity I UPLC (Waters Corp, Milford, USA). Идентификация и количественная оценка были достигнуты путем мониторинга множественных реакций. Анализ нагнетания потока проводили с использованием смеси из 50% воды ацетонитрила с добавлением муравьиной кислоты 0,1% при изократической скорости потока 200 мкл/мин. Масс-спектрометрия проводилась в следующих условиях: время выдержки 0,019-0,025 сек; капиллярное напряжение 2 кВ; в качестве среды столкновения использовался азот, температура источника при 150 °С. Этапы импорта и предварительной обработки данных для целевых МС-данных были выполнены с помощью программного обеспечения TargetLynx (Waters, MA, USA). Концентрации метаболитов рассчитывались в соответствии с интенсивностью сигнала аналитов и соответствующими внутренними стандартами.

Первичная информация об интенсивностях пиков, их времени удерживания и масс-спектральных характеристиках была получена после обработки хроматограмм при помощи программного обеспечения XCMS (Scripps, США). Идентификация метаболитов проводилась при помощи библиотеки масс-спектральной информации GMD. Все определение метаболомного профиля проводилось в лаборатории фармакокинетики и метаболомного анализа Института фармации и трансляционной медицины ФГАУО ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Методы статистической обработки. Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ Statistica 10,0 и IBM SPSS. В описательной статистике с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса, Шапиро – Уилка определялась нормальность/ненормальность распределения. При нормальном распределении использовался t-критерий Стьюдента для независимых выборок, данные представлялись в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). При ненормальном распределении использовался U-критерий Манна-Уитни, данные представлялись в виде медианы и значений 25 и 75-го перцентилей ($Me [Q1;Q3]$). Наличие статистической значимости различий считались при $p < 0,05$. Обработка массива данных метаболомного профиля проводилась с помощью программ Statistica 8,0 (Statsoft, Inc.); SIMCA 13,0 (Umetrics, Sweden) и Metaboanalyst 4.0 (Канада). Распределение переменных было проверено с помощью теста Шапиро-Вилка. Результаты так же обрабатывались при помощи программного обеспечения Statistica 8,0 (Statsoft, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка функции эндотелия. По результатам фотоплетизмографии по оценке структурных и функциональных изменений эндотелия было выявлено статистически значимое различие между контрольной и основной группой по показателям ИО и Alp . Для контрольной группа ИО в среднем составлял $1,72 \pm 0,33$, для пациентов группы АГ и МС $1,43 \pm 0,36$ ($p > 0,05$), что свидетельствует о нарушении функции эндотелия на уровне мелких резистивных артерий и артериол (Рисунок 1 а). При сравнении показателей СФ контрольной группы ($-2,41 \pm 7,35$) и основной группы ($-5,94 \pm 6,61$) значимых расхождений не выявлено ($p < 0,05$) (Рисунок 1 б), что свидетельствует об отсутствии различий между исследуемыми группами по функции эндотелия в крупных артериях.

При сравнении показателей Alp и $Alp75$ контрольной группы, которые составили в среднем $0,91 \pm 13,65$ и $1,53 \pm 12,67$ соответственно, с показателями в основной группе $Alp = 10,23 \pm 15,13$ и $Alp75 = 7,24 \pm 13,64$ выявлены значимые различия по показателям Alp ($p > 0,05$) и отсутствие различий по показателям $Alp75$ ($p < 0,05$) (Рисунки 2 а и б).

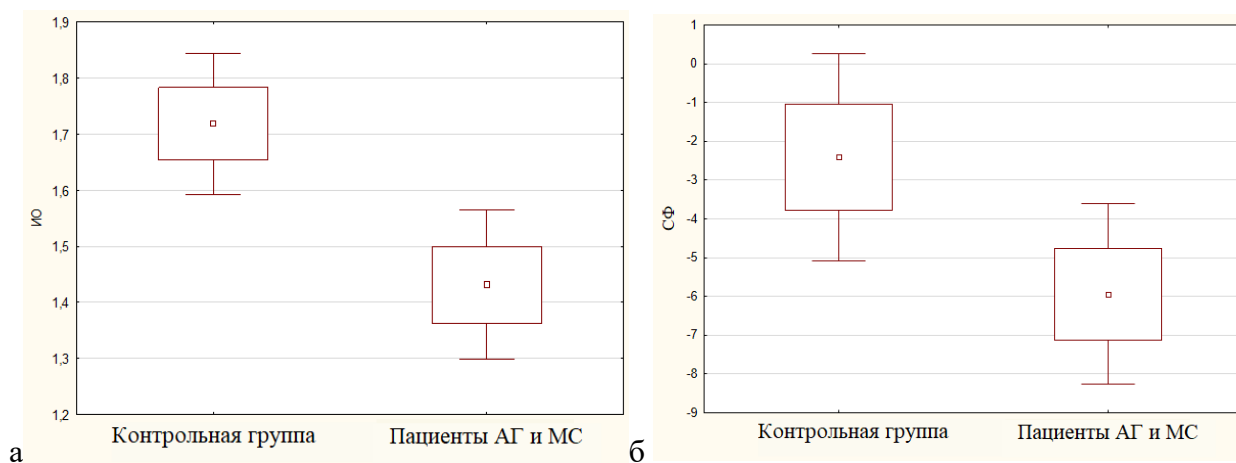


Рисунок 1 — Распределение ИО (а) и СФ (б) в контрольной и основной группах

Такие результаты свидетельствуют о повышенной жесткости артериальной стенки в группе пациентов с АГ и МС. Однако стоит отметить, что нормальные значения показателей Alp и $Alp75$ увеличиваются с возрастом, и данный показатель стоит рассматривать с осторожностью, так как пациенты основной группы с АГ и МС относятся к более старшей возрастной когорте.

Несмотря на то, что имеется статистически значимые различия по показателю ИО между исследуемыми группами, следует отметить, что у нескольких участников контрольной группы отмечается незначительное снижение данного показателя ниже нормальных значений. Это, скорее всего, связано с уже имеющимися у них факторами риска. И напротив, среди некоторых участников группы АГ и МС отмечаются нормальные показатели функции эндотелия, что, вероятно, обусловлено длительной лекарственной адекватной терапией.

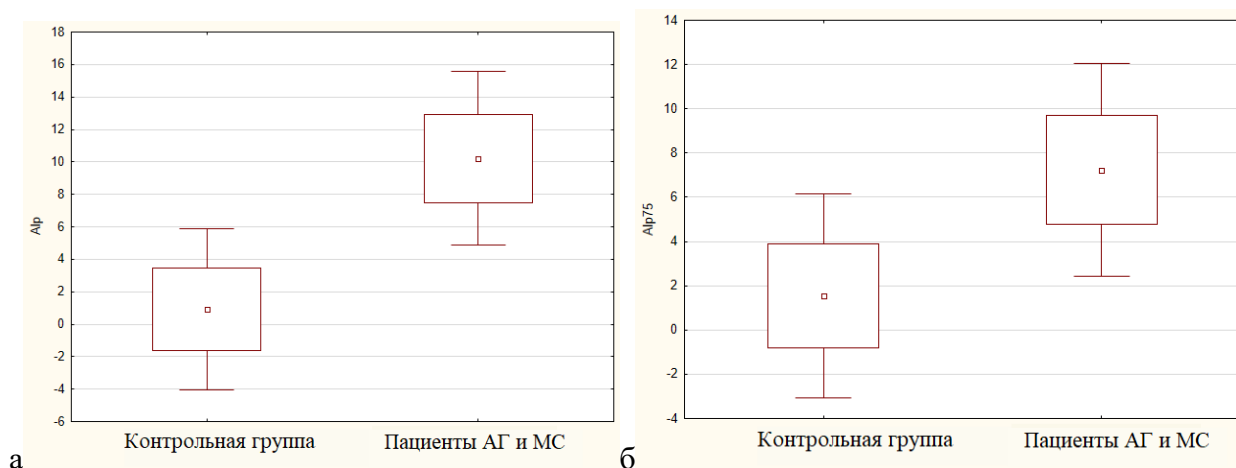
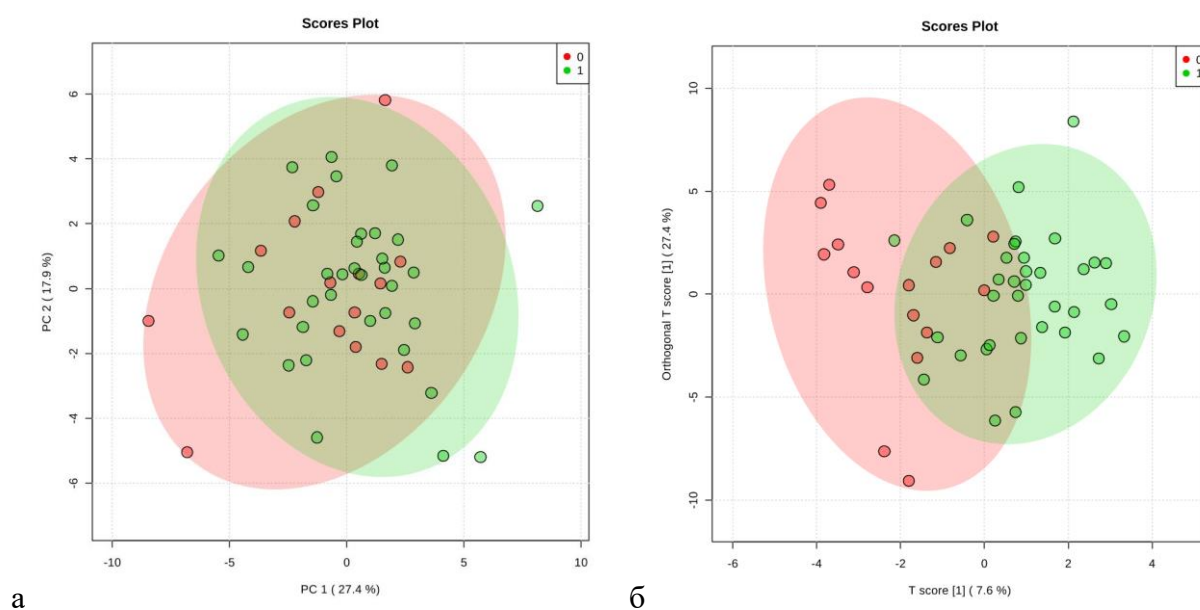


Рисунок 2 — Распределение показателей Alp (а) и $Alp75$ (б) по исследуемым группам

Оценка нецелевого метаболомного профилирования. В исследовании было проведено метаболомное профилирование пациентов с АГ и МС ($n=27$) и контрольной

группы (n=17). При нецелевом метаболомном анализе исследовалось 1356 метаболитов, включая 593 известных химических соединений. Эти метаболиты принадлежали к классам веществ, связанных с аминокислотами (n=150), липидами (n=250), жирными кислотами (n=100), нуклеотидами (n=15), углеводами (n=25), кофакторами и витаминами (n=30). С использованием нецелевого подхода были идентифицированы более 1356 метаболитов. Идентификация метаболитов проводилась при помощи библиотеки масс-спектральной информации Golm Metabolome Database (Германия) и базы данных HMDB. Обработанные данные были преобразованы в log₂ для нормализации распределения, центрированы по медиане и масштабированы. Это позволило продолжить дальнейшую статистическую обработку данных, использовать метод главных компонент и проведение дискриминантного ортогонального анализа.

При использовании метода PCA образцов, сильно отличающихся по своим характеристикам от основных групп, не выявлено. Незначительные отличия, вероятнее всего, связаны с сопутствующей патологией конкретного пациента или принимаемыми им препаратами (Рисунок 3 а).



*«0» – контрольная группа, «1» - группа АГ и МС. Красная область показывает набор метаболитов, выявленных в группе пациентов с АГ и МС (n=27), зеленая область показывает набор метаболитов, выявленных в контрольной группе (n=17). Пересечение областей с помощью PCA показывает возможность сравнения исследуемых групп для дальнейшего анализа. Расхождение областей при анализе с помощью OPLS-DA показывает значимые метаболиты, различающиеся между исследуемыми группами. Пересечение областей показывает метаболиты, концентрации которых сопоставимы в обеих группах.

Рисунок 3 — Распределение пациентов с помощью PCA (а) и OPLS-DA (б) по группам

При дальнейшем проведении дискриминантного ортогонального анализа (OPLS-DA) всех данных метаболитов удалось обнаружить компоненты, позволяющие разделить исследуемых на две группы, и продемонстрировать различия метаболомных профилей группы пациентов АГ и МС и контрольной группы, что так же позволило продолжить анализ исследуемых метаболитов (Рисунок 3 б). Из выявленных классов соединений преобладали аминокислоты, сахара, жирные кислоты.

Оценка целевого метаболомного профилирования. По результатам целевого метаболомного анализа были выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) между метаболомными профилями значимых метаболитов групп пациентов с АГ и МС и контрольной группой по 11 соединениям: ацилкарнитинам, представленным в таблице 2, и аминокислотам, представленным таблицей 3.

Таблица 2 — Концентрации значимых ацилкарнитинов в группе пациентов с АГ и МС и контрольной группе

	Группа АГ и МС	Контрольная группа	Статистическая значимость, р
	М ± SD	М ± SD	
-Ацетилкарнитин, мкм (C2)	12,6± 3,81	9,62±3,71	0,0033
Декеноилкарнитин, мкм (C10:1)	0,25±0,09	0,18±0,06	0,0235
Додекеноилкарнитин, мкм (C12:1)	0,09±0,03	0,061±0,019	0,0038
Гексадекадиеноилкарнитин, мкм (C16:2)	0,06±0,02	0,055±0,02052	0,0360
Гексаноилкарнитин, мкм (C6)	0,06±0,02	0,04±0,01	0,0009
3-Гидроксигексадеканойлкарнитин, мкм (C16-OH)	0,003±0,001	0,002±0,0007	0,0784
2-Гидроксимиристоилкарнитин, мкм (C21)	0,006±0,002	0,004±0,002	0,0234
Пропионилкарнитин, мкм (C3)	0,526±0,193	0,439±0,276	0,0282
3,5-Тетрадекадиенкарнитин, мкм (C14:2)	0,048±0,022	0,035±0,013	0,0359

Статистически значимых различий в других классах соединений из значимых метаболитов выявлено не было. Это, вероятнее всего, связано с тем, что в контрольной группе половина участников имела повышенный ИМТ, с другой стороны все пациенты группы АГ и МС находились на длительной лекарственной терапии. Было проведено сравнение вариабельности значения средних концентраций метаболитов по группам и составлена карта отношений средних значений концентрации метаболитов.

Таблица 3 — Концентрации значимых аминокислот в группе пациентов с АГ и МС и контрольной группе

	Группа АГ и МС	Контрольная группа	Статистическая значимость, р
	М ± SD	М ± SD	
Аланин, мкм	396,8747±198,3453	314,8754±82,3751	0,2014
Ассимметричный диметиларгинин, мкм	0,0031±0,0006	0,0028±0,0004	0,0441

Продолжение таблицы 3

Аспарагин, мкм	69,8317±25,2436	65,9007±13,0234	0,5629
Валин, мкм	215,3972±88,9507	201,2833±85,0673	0,3349
Изолейцин, мкм	69,8089±32,1196	64,3410±32,0925	0,3597
Лейцин, мкм	128,4460±57,6784	116,3188±36,2081	0,6469
Пролин, мкм	197,4248±95,5252	158,6893±48,4605	0,2780
Серин, мкм	268,6424±184,2927	172,3568±68,0033	0,0092
Тирозин, мкм	67,5184±31,0518	56,4436±16,8883	0,6127
Треонин, мкм	81,7610±32,9520	74,7754±35,4688	0,2999
Холин, мкм	12,6450±3,2331	10,3317±1,6503	0,0193
Цистеин, мкм	374,9919±143,5923	306,1453±97,3545	0,0601

Анализ взаимосвязи метаболомного профиля пациентов группы АГ и МС с показателями функции эндотелия. Далее был проведен корреляционный анализ взаимосвязей показателей функции эндотелия, различающихся между исследуемыми группами с метаболомным профилем, полученным при целевом профилировании. Корреляционный анализ показал взаимосвязь ряда аминокислот и ацилкарнитинов с показателями функции эндотелия (таблица 4).

Таблица 4 — Корреляционный анализ показателей функции эндотелия у пациентов группы АГ и МС с метаболомным профилем, полученным при целевом метаболомном анализе. Приведены только статистически значимо различающиеся метаболиты

Метаболиты	Показатели функции эндотелия	
	Ап	ИО
Валин	r = - 0,419478 p<0,05	r = - 0,062159 p>0,05
Лейцин	r = - 0,426500 p < 0,05	r = - 0,026702 p>0,05
Изолейцин	r = - 0,412151 p<0,05	r = 0,075292 p>0,05
Цистеин	r = - 0,041527 p>0,05	r = - 0,474075 p<0,05
Тирозин	r = - 0,381011 p<0,05	r = - 0,010944 p>0,05
Бутеноилкарнитин	r = - 0,393222 p<0,05	r = 0,038521 p>0,05
Глутарилкарнитин	r = - 0,399939 p<0,05	r = - 0,123006 p>0,05
Адилоилкарнитин	r = -0,058006 p>0,05	r = - 0,436429 p<0,05
Додеканоилкарнитин C12	r = - 0,403603 p<0,05	r = - 0,278404 p>0,05
Додеканоилкарнитин C12:1	r = - 0,221340 p>0,05	r = - 0,417169 p<0,05
3-Гидроксигексадекадиеноилкарнитин	r = - 0,116623 p>0,05	r = - 0,512159 p<0,05

* p — Статистическая значимость различий оценена с использованием критерия

Ньюмана-Кейлса, r - степень зависимости двух переменных с использованием коэффициента корреляции Пирсона.

Наиболее сильная взаимосвязь выявлена между уровнями цистеина ($r=-0,4740$, $p<0,05$) и 3-гидроксигексадекадиеноилкарнитина ($r=-0,5121$, $p<0,05$) с показателем ИО (Рисунок 4 а). Так же, наблюдалась обратная корреляционная взаимосвязь показателей АІр с додеканоилкарнитином С12 ($r = -0,4036$, $p < 0,05$) на рисунке 4 б.

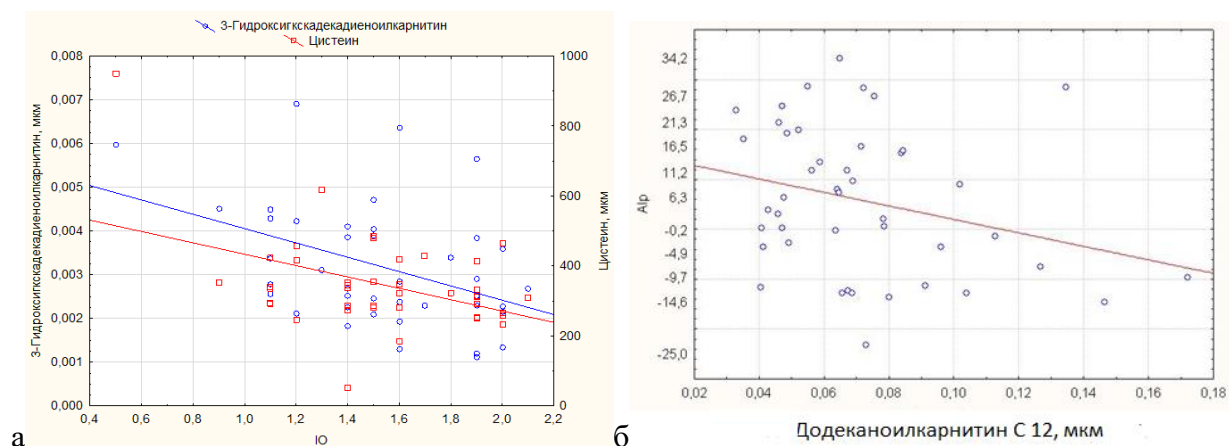


Рисунок 4 — Диаграмма рассеяния уровней цистеина и 3 - гидроксигексадекадиеноилкарнитина и их взаимосвязь с показателем ИО (а) и показателя АІр с уровнем додекадканоилкарнитина С-12 (б)

Анализ взаимосвязи метаболического профиля пациентов группы АГ и МС с клинико-лабораторными показателями. Проводился корреляционный анализ, представленный в таблице 5, клинико-лабораторных показателей пациентов с АГ и МС с наиболее значимыми метаболитами, взаимосвязанными с показателями функции эндотелия. Выявлена наиболее сильная взаимосвязь уровней лейцина и изолейцина с ТЗС ЛЖ ($r = 0,4930$ и $r = 0,4907$, соответственно, $p<0,05$, рисунок 5 а). Так же была установлена положительная прямая корреляция уровней лейцина и валина с уровнями ТГ ($r=0,3050$ и $r= 0,3404$ соответственно, $p<0,05$, рисунок 5 б).

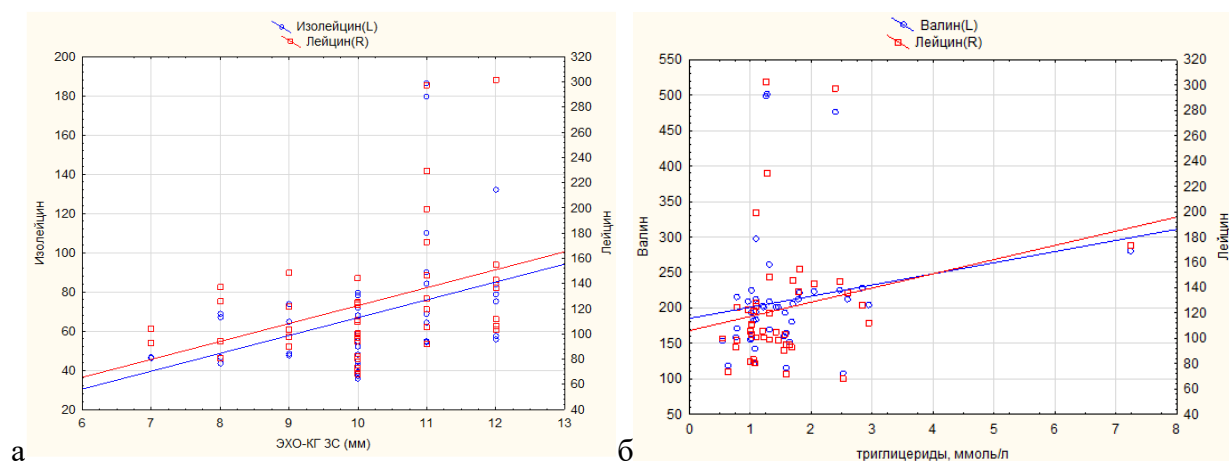


Рисунок 5 — Диаграмма рассеяния уровней лейцина и изолейцина и их взаимосвязь с ТЗС ЛЖ (а) и уровней лейцина и валина и их взаимосвязь с уровнем ТГ (б)

Таблица 5 — Корреляционный анализ показателей МС и поражения органов – мишеней при АГ с уровнем метаболитов, ассоциированных с дисфункцией эндотелия.

Метаболиты	Показатели							
	ОТ, см	т ЗС ЛЖ, мм	тМЖП, мм	ДД, Е/А	Глюкоза, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ЛПВП (ммоль/л)
Валин	r = 0,34 p<0,05	r = 0,39 p<0,05	r = 0,40 p<0,05	r = - 0,27 p>0,05	r = 0,35 p<0,05	r = - 0,03 p>0,05	r = 0,34 p<0,05	r = - 0,17 p>0,05
Лейцин	r = 0,32 p<0,05	r = 0,42 p<0,05	r = 0,41 p<0,05	r = - 0,20 p>0,05	r = 0,30 p<0,05	r = - 0,19 p>0,05	r = 0,31 p<0,05	r = - 0,17 p>0,05
Изолейцин	r = 0,36 p<0,05	r = 0,49 p<0,05	r = 0,49 p<0,05	r = - 0,25 p>0,05	r = 0,33 p<0,05	r = - 0,14 p>0,05	r = 0,27 p>0,05	r = - 0,12 p>0,05
Цистеин	r = 0,26 p>0,05	r = 0,34 p<0,05	r = 0,31 p<0,05	r = - 0,27 p>0,05	r = 0,31 p<0,05	r = - 0,08 p>0,05	r = 0,112 p>0,05	r = - 0,11 p>0,05
Тирозин	r = 0,22 p>0,05	r = 0,27 p>0,05	r = 0,27 p>0,05	r = - 0,36 p<0,05	r = 0,36 p<0,05	r = - 0,26 p>0,05	r = 0,17 p>0,05	r = - 0,11 p>0,05
Глутарилкарнитин	r = 0,32 p<0,05	r = 0,34 p<0,05	r = 0,28 p>0,05	r = - 0,36 p<0,05	r = 0,13 p>0,05	r = - 0,13 p>0,05	r = 0,05 p>0,05	r = - 0,35 p<0,05
Додеканойлкарнитин С12:1	r = 0,32 p<0,05	r = 0,21 p>0,05	r = 0,16 p>0,05	r = - 0,28 p>0,05	r = 0,27 p>0,05	r = 0,01 p>0,05	r = 0,11 p>0,05	r = - 0,21 p>0,05

Зафиксирована отрицательная корреляционная связь уровней тирозина и глутарилкарнитина с показателем диастолической функцией ЛЖ ($r = -0,3645$ и $r = -0,3598$ соответственно, $p < 0,05$, рисунок 6).

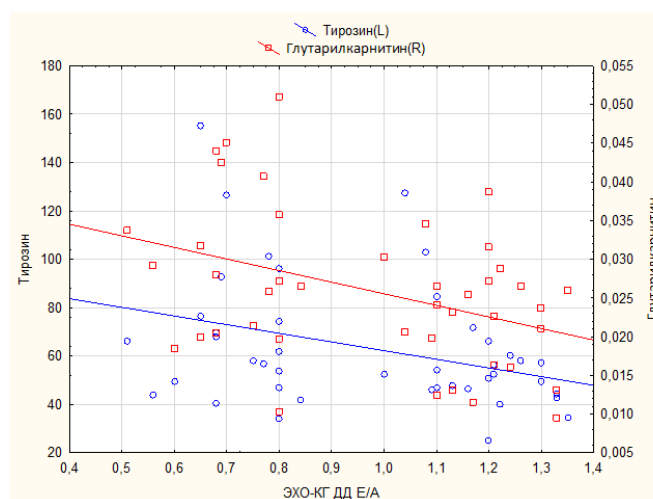


Рисунок 6 — Взаимосвязь уровней тирозина и глутарилкарнитина с показателем диастолической функцией ЛЖ Е/А

Наиболее сильная положительная корреляционная взаимосвязь обнаружена между ОТ и уровнями ВСАА - изолейцином и валином ($r = 0,3050$ и $r = 0,3576$ соответственно, $p < 0,05$, рисунок 7 а). Единственная корреляционная взаимосвязь уровня ЛПВП

установлена с уровнем глутарилкарнитина ($r = -0,3572$, $p < 0,05$, рисунок 7 б). Стоит отметить, что не было обнаружено значимых ассоциаций уровней ЛПНП ни с одним из уровней метаболитов.

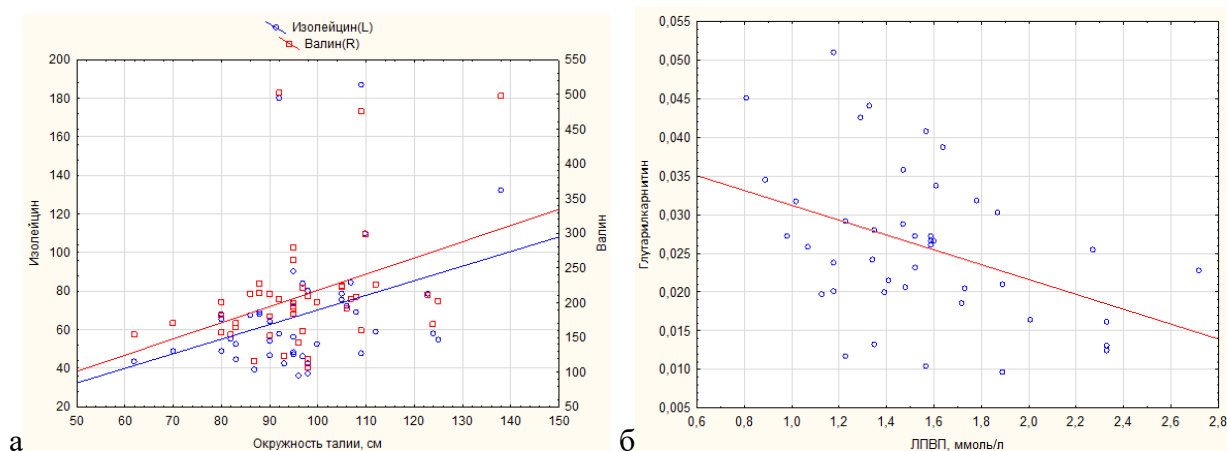


Рисунок 7 — Диаграмма рассеяния уровней изолейцина и валина и их взаимосвязь с ОТ (а) и уровня глутарилкарнитина с уровнем ЛПВП (б)

Таким образом, наиболее значимыми метаболитами в полученном метаболомном профиле пациентов с АГ и МС оказались группа ацилкарнитинов в основном с короткой и средней цепью. Была продемонстрирована их тесная взаимосвязь с ДЭ у пациентов с АГ и МС, а так же со степенью ожирения и поражением сердца при АГ (гипертрофией стенок ЛЖ и нарушением диастолической функцией ЛЖ). Выявлена сильная корреляционная связь 3-гидроксигексадекадиеноилкарнитина, как единственного представителя длинноцепочечных ацилкарнитинов, с нарушением функции эндотелия в артериях малого калибра. Продемонстрирована взаимосвязь уровней аминокислот с разветвленными боковыми цепями (валин, лейцин, изолейцин) с показателями жесткости сосудистого русла у пациентов с ожирением, гипергликемией и ремоделированием сердца при АГ. Установлена взаимосвязь уровней тирозина и цистеина со степенью гипертрофии миокарда, снижением диастолической функции ЛЖ и уровнем гликемии (Рисунок 8).

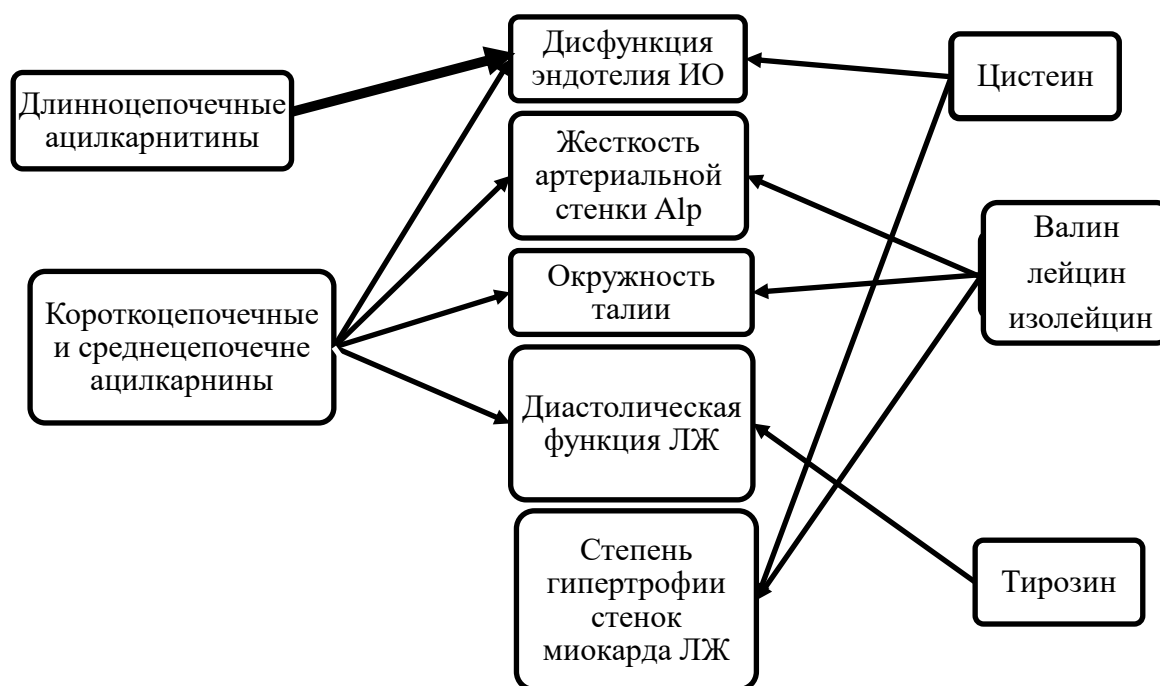


Рисунок 8 — Схема взаимосвязей значимых метаболитов с показателями функции, компонентами МС и параметрами поражения сердца при АГ

ВЫВОДЫ

1. В группе пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом выявлены нарушения функции эндотелия на микроциркуляторном уровне в виде снижения индекса окклюзии ($1,41 \pm 0,34$), а так же увеличения жесткости сосудов ($A1p = 10,56 \pm 15,26$ и $A1p75 = 7,66 \pm 13,66$).

2. К спектру метаболитов, наиболее характерных для пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом и наличием дисфункции эндотелия, выявленных на основании проведения нецелевого метаболомного анализа относятся 26 метаболитов из группы ацилкарнитинов короткой, средней и длинной цепи, а также 15 аминокислот.

3. С помощью целевого метаболомного анализа установлено повышение концентрации в плазме крови серина, холина, ассимметричного диметиларгенина и коротко-, средне- и длинноцепочечных ацилкарнитинов у пациентов с артериальной гипертонией и метаболическим синдромом

4. Выявлены обратные взаимосвязи уровней концентрации валина, лейцина, изолейцина, бутеноилкарнитина, глутарилкарнитина и додеканоилкарнитина с показателем повышенной жёсткости сосудистой стенки - $A1p$, и концентраций цистеина, адипоилкарнитина, додеканоилкарнитина ($C12:1$) и 3-гидроксигексадекадиеноилкарнитина с индекса окклюзии как показателем дисфункции

эндотелия микроциркуляторного русла у пациентов артериальной гипертонией и метаболическим синдромом.

5. У пациентов артериальной гипертонией и метаболическим синдромом с дисфункцией эндотелия выявлен ряд корреляций средней силы между уровнями аминокислот с разветвленными боковыми цепями: валина ($r=0,40$), лейцина ($r=0,49$) и изолейцина ($r=0,49$) с уровнем гипертрофии миокарда ЛЖ, а так же компонентами метаболического синдрома, окружность талии, гипергликемией и дислипидемией.

6. У пациентов основной группы выявлены корреляций слабой и средней силы между концентрациями, циркулирующих цистеина, тирозина, коротко- и среднецепочечных ацилкарнитинов с степенью диастолической дисфункции левого желудочка, а также с компонентами метаболического синдрома гипергликемией и дислипидемией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- Результаты проведенного исследования позволяют выделить метаболиты, ассоциированные с артериальной гипертонией при наличии метаболического синдрома, как совокупности факторов риска. Полученные метаболиты могут рассматриваться в качестве дополнительных индивидуальных факторов риска и возможных целей для персонализированного подхода в лекарственной терапии.

- Сочетанное определение адипоилкарнитина, додеканоилкарнитина, 3-гидроксигексадекадиеноилкарнитина и цистеина может быть предложено в качестве лабораторного маркера дисфункции эндотелия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ДОКЛАДЫ НА КОНФЕРЕНЦИЯХ

1. **Коробкова Е.О.** Метаболомное профилирование больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями / Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Кожевникова М.В., Коробкова Е.О., Ильгисонинс И.С., Каплунова В.Ю., Шакарьянц Г.А., Апполонова С.А., Кухаренко А.В., Ларцова Е.В., Месонжик Н.В. // **Кардиология**. 2018; 58 (9): 59-62 [**Scopus**].
2. **Коробкова Е.О.** Метаболомное профилирование больных с метаболическим синдромом / Коробкова Е.О., Кожевникова М.В., Ильгисонинс И.С., Шакарьянц Г.А., Апполонова С.А., Кухаренко А.В., Ларцова Е.В., Мальцева А.А., Хабарова Н.В., Беленков Ю.Н. // **Кардиология**. 2020;60(3):37–43. [**Scopus**].
3. **Коробкова Е.О.** Взгляд на гипертрофию миокарда с позиции транскриптомики и метаболомики / Шакарьянц Г.А., Кожевникова М.В., Каплунова В.Ю., Привалова Е.В., Лишута А.С., Коробкова Е.О., Беленков Ю.Н. // **Кардиология**. 2020;60(4):120–129. [**Scopus**].

4. **Korobkova E.O.** Relationship between the plasma acylcarnitine profile and cardiometabolic risk factors in adults diagnosed with cardiovascular diseases / Kukhareno A., Brito A., Kozhevnikova M.V., Moskaleva N., Markin P.A., Bochkareva N., Korobkova E.O., Belenkov Y.N., Privalova EV, Larcova EV, Ariani A, La Frano MR, Appolonova SA // **Clin Chim Acta**. 2020 May 4; 507:250-256. [**Scopus**].
5. **Коробкова Е.О.**, Беленков Ю. Н., Привалова Е. В., Кожевникова М. В. Структурные и функциональные изменения сосудистого русла и анализ уровня нейрогуморальных маркеров у больных хронической сердечной недостаточностью и метаболическим синдромом. // Национальный конгресс Сердечная недостаточность. Материалы конгресса. - 2018. – 25.
6. M. Kozhevnikova, **E. Korobkova**, A. Kukhareno, I. Igisonis, E. Lartsova, D. Nagornaya, G. Shakaryants, S. Appolonova, E. Privalova, YU. Belenkov. Acylcarnitine profiling of patients with cardiovascular diseases. // Heart Failure Congress Abstract. European journal of Heart Failure. – 2020. – №22 (S1). - P.586