

УДК 616.381-002.1:612.014.46

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОМПЛЕКСНОЙ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ОСТРОМ РАЗЛИТОМ ПЕРИТОНИТЕ МЕТОДАМИ ЛИМФОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Анатолий Анатольевич АНИКЕЕВ¹, Михаил Семенович ЛЮБАРСКИЙ²,
Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА¹, Сергей Алексеевич АРХИПОВ¹,
Ирина Александровна ГОЛУБЕВА¹, Игорь Рауфович ВАЛЕЕВ²,
Игорь Павлович ЖУРАКОВСКИЙ¹, Мария Вячеславовна БИТХАЕВА¹,
Татьяна Анатольевна КУНЦ¹**

¹ ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

² ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

На модели острого разлитого перитонита у крыс исследованы особенности системных нарушений иммунного статуса при экспериментальном перитоните и проведена оценка различных методов их коррекции, основанных на использовании обычной медикаментозной терапии и комплексной терапии, включающей элементы сорбционной технологии, иммунотерапии и два метода непрямой лимфотропной терапии. В качестве показателя, характеризующего иммунный статус исследуемых животных, использовано соотношение содержания Т-лимфоцитов-хелперов (CD4+) и Т-лимфоцитов-супрессоров (CD8+) в крови, тимусе, селезенке и лимфатических узлах. Показано, что комплексная терапия острого разлитого перитонита, включающая подкожные лимфотропные инъекции лекарственных средств в сочетании с сорбентом, более эффективна, чем традиционный способ лечения.

Ключевые слова: острый экспериментальный перитонит, лимфотропные инъекции, Т-хелперы, Т-супрессоры, иммунорегуляторный индекс, иммунорегуляторный коэффициент, кровь, тимус, селезенка, лимфатические узлы.

К одному из главных этапов лечения острого разлитого перитонита относят лечебные мероприятия по борьбе с возбудителем заболевания и интоксикацией организма. Поэтому применяется как общее, так и местное введение больших доз нескольких групп антибиотиков, инфузионная терапия, сорбционная терапия, дренирование брюшной полости и пищеварительного тракта [1–3]. Эффективность медикаментозной терапии распространенного гнойного перитонита в значительной степени определяется адекватностью терапевтических мероприятий уже в самом начале курса лечения [4]. При этом

важным дополнением в комплексном лечении распространенного гнойного перитонита является иммунотерапия, направленная на повышение общего иммунитета организма [4–6]. В связи с этим диагностика и коррекция иммунных расстройств при распространенных формах перитонита имеют большое значение в клинической практике, поскольку отражают степень нарушений в начале заболевания, а также динамику, наблюдаемую в процессе лечения пациента [3, 7].

В настоящее время неоспоримыми являются факты повышения эффективности действия антибиотиков, иммуномодуляторов, ингибито-

Аникеев А.А. – к.м.н., научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ)

Любарский М.С. – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, руководитель клиники

Пустоветова М.Г. – д.м.н., проф., руководитель ЦНИЛ, e-mail: patophysiology@mail.ru.

Архипов С.А. – д.б.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ, e-mail: arhipowsergei@yandex.ru.

Голубева И.А. – д.м.н., проф.

Валеев И.Р. – аспирант

Жураковский И.П. – к.м.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ

Битхаева М.В. – научный сотрудник

Кунц Т.А. – младший научный сотрудник ЦНИЛ

ров, протеаз, цитостатиков и других лекарственных препаратов при направленном их введении в лимфатическую систему [8, 9]. По мнению ряда авторов, лимфотропная терапия воспалительных, онкологических, иммунных и других заболеваний имеет преимущество перед традиционными способами введения лекарственных препаратов [5, 9, 10]. Показано, что при проведении лимфотропной терапии очень важно проводить инъекции в зоны с максимальным представителем лимфатических сосудов и узлов, связанных с тем органом, в котором протекает патологический процесс [5, 10]. В связи с этим представляется очень важным выяснение многих вопросов, касающихся использования технологии лимфотропных инъекций при лечении острого разлитого перитонита, в том числе их эффективности в коррекции системных нарушений иммунного статуса больных перитонитом.

В настоящее время одним из объективных показателей состояния иммунной системы в целом и высокоинформативным критерием иммунокорректирующей терапии служит иммунорегуляторный индекс: соотношение содержания Т-хелперов/индукторов (CD4+) и Т-супрессоров/цитотоксических, или Т-супрессоров/киллеров (CD8+) [11, 12]. Когда говорят об иммунорегуляторном индексе, то, как правило, имеют в виду величину, равную отношению количества Т-хелперов/индукторов и Т-супрессоров/киллеров в крови. Вместе с тем имеется ряд экспериментальных исследований, в которых проводят оценку такого соотношения в различных органах, относящихся одновременно к иммунной и лимфатической системам организма [13, 14]. Показано, что оценка указанного соотношения не только в крови, но и в различных лимфоидных органах позволяет не только более точно оценить состояние иммунного статуса организма, но и составить представление о характере дифференцировочных процессов, происходящих в тимусе, об особенностях миграции клеток из тимуса в периферические органы иммунной системы, уровне интеграции иммунной системы в реализации иммунного ответа при развитии патологического процесса и различных методах его лечения [12–14]. В этой связи величины или коэффициенты, характеризующие соотношение лимфоцитов с фенотипами CD4+ (Т-хелперов/индукторов) и CD8+ (Т-супрессоров/киллеров), в любом органе лимфатической и иммунной системы можно рассматривать в качестве дополнительного «иммунорегуляторного индекса», показателя или «иммунорегуляторного коэффициента», характеризующего состояние иммунной системы или иммунного статуса в целом.

К одной из моделей, разработанной для изучения закономерностей и механизмов развития острого разлитого перитонита, а также методов его лечения, относится модель экспериментального перитонита по С.С. Ременнику, уже достаточно хорошо охарактеризованная в литературе [15]. Имеются экспериментальные данные о выраженности перитонита и эндотоксикоза у экспериментальных животных при использовании этой модели, патогистологические характеристики состояния брюшины и органов брюшной полости, клеточного состава и микробного «пейзажа» перитонеальной жидкости, а также показатели летальности животных. Указанная модель уже зарекомендовала себя в качестве тестовой «экспериментальной системы» для поиска новых методов лечения острого перитонита [15]. Вместе с тем еще не достаточно охарактеризованы системные нарушения в иммунной системе при таком виде моделирования. Не исчерпаны возможности рассматриваемой модели для поиска новых комплексных методов лечения острого перитонита и его осложнений.

Целью нашего исследования явилось изучение особенностей изменения различных иммунорегуляторных показателей, характеризующих системные нарушения иммунного статуса при экспериментальном остром разлитом перитоните, и оценка различных методов их коррекции, основанных на использовании комплексной терапии, включающей элементы сорбционной технологии, иммунотерапии и непрямой лимфотропной терапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Все эксперименты по моделированию острого экспериментального перитонита и его лечению выполнены на 220 крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г, которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Исследования проводили в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.), Федеральному закону о защите животных от жестокого обращения от 01.01.1997 г., а также Директиве 86/609 ЕЭС, основанной на тексте соглашения «Dr. Robert Hubrecht, Current EU Legislation Controlling Animal Experiments». Моделью острого разлитого перитонита служил экспериментальный перитонит, вызываемый введением в брюшную полость крыс 1,5 мл 5%-й

каловой взвеси в изотоническом растворе хлорида натрия по С.С. Ременнику [15]. Исследованы следующие группы животных. «Контроль» – животные, которым внутривентриально вводили 1,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. «ОП» – животные с экспериментальным перитонитом, которым не проводили никакого лечения. «ОП+ОЛ» – животные с экспериментальным перитонитом, которым проводили обычное лечение: ежедневные внутримышечные инъекции (в большую берцовую мышцу) антибиотика «Цефтриаксон» в составе болюса. При обычном лечении в состав болюса входили: 2 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, 10 % раствора лидокаина, 32 ЕД лидазы, 50 мг/кг антибиотика «Цефтриаксон». «ОП+ОЛ+СО» – животные с перитонитом, которым проводили сорбционную терапию в день введения каловой смеси и далее – обычное лечение. «ОП+ОЛ+МЛИ» – животные с перитонитом, которым проводили обычное лечение в дозах антибиотика, в 2 раза меньших, чем в группе «ОП+ОЛ» (в составе первого болюса, 1 мл), плюс дополнительная лимфотропная терапия – межкостистые подкожные инъекции (в грудном отделе позвоночника): 1 мл второго болюса, отличающегося от первого включением иммуномодулятора «Глутоксим» (из расчета 2 мг/кг в одной инъекции). «ОП+ОЛ+ИТ» – животные с перитонитом, которым проводили обычное лечение в дозах антибиотика, в 2 раза меньших, чем в группе «ОП+ОЛ» (в составе первого болюса, в объеме 1 мл), плюс инъекции в область таза (1,0 мл второго болюса). «ОП+ОЛ+МЛИ+ИТ» – животные с перитонитом, которым проводили обычное лечение в дозах антибиотика, в 2 раза меньших, чем в группе «ОП+ОЛ» (в составе первого болюса, в объеме 1 мл), плюс межкостистые подкожные инъекции (0,5 мл второго болюса), плюс инъекции в область таза (0,5 мл второго болюса). «ОП+МЛИ+ИТ+СО» – животные с перитонитом, которым проводили сорбционную терапию в день введения каловой смеси и далее – ежедневные межкостистые подкожные инъекции (1,0 мл второго болюса), плюс инъекции в область таза (1,0 мл второго болюса).

В каждую группу «ОП» (без лечения) на каждый срок наблюдения было введено по 12 животных. Во всех остальных группах использовано по 10 животных.

Сорбционную терапию проводили следующим образом. Внутривентриально вводили серебросодержащий сорбент СИАЛ-С (М), представляющий собой округлые гранулы диаметром 0,4–1 мм, модифицированные путем иммобилизации поливинилпирролидоновым комплек-

сом серебра (Вектор-Бест, Россия) в виде 10 % суспензии в 1,5 мл изотонического раствора хлорида натрия сразу же после введения каловой взвеси. После кратковременной обработки брюшной полости сорбентом проводили процедуру по ее промыванию для вымывания из нее сорбента. В качестве промывающего раствора использовали стерильный изотонический раствор хлорида натрия.

В динамике воспаления на 1-е, 3-и и 5-е сутки исследовали препараты крови и тимуса (на парафиновых срезах толщиной 5–6 мкм). Кровь и тимус забирали сразу после декапитации. Внутривентриальные инфекции каловой взвеси и все манипуляции по проведению комплексной иммуномодулирующей и лимфотропной терапии выполняли под гексеналовым наркозом (100 мг/кг). Количество лейкоцитов в стабилизированной крови крыс подсчитывали общепринятым методом в камере Горяева. Лейкоцитарную формулу рассчитывали на основе анализа цитологических препаратов крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе. Иммуноцитохимический анализ клеток крови и гистологических препаратов проводили непрямым стрептавидиновым методом (использована система визуализации Novocastra™ RTU, RE7100-K). Клетки фиксировали в 4 % растворе, демаскировку исследуемых кластеров дифференцировки проводили тритоном X-100 (0,3 % раствор в фосфатном буфере). Для исследования иммунологического фенотипа иммунных клеток использовали мышинные моноклональные антитела к различным кластерам дифференцировки клеток («Becton Dickinson», США): CD3 (Mouse Anti-Rat; Isotype: Mouse IgG3, κ; клон G4.18), CD4 (Mouse Anti-Rat; Isotype: Mouse IgG2a, κ; клон ОХ-38), CD8 (Mouse Anti-Rat; Isotype: Mouse IgG1, κ; клон ОХ-8). Тяжесть нарушений в иммунной системе и состояние иммунного статуса оценивали по изменению соотношения CD4+/CD8+ в крови (иммунорегуляторный индекс – ИРИ) и в Т-зависимых зонах тимуса (в медуллярной зоне), селезенки (в периартериальных лимфоидных муфтах), лимфатических узлов (в паракортикальной зоне), условно обозначенного как иммунорегуляторный коэффициент (ИРК). Статистическую обработку результатов производили методами вариационной статистики, данные в таблицах представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из таблицы, у крыс с экспериментальным острым перитонитом, не получавших лечение (группа «ОП»), отмечалось с 1-х по 5-е сутки постепенное снижение ИРИ крови и ИРК тимуса, селезенки и лимфатических узлов. При этом отмечена следующая закономерность: на 1-е сутки после индукции воспаления наиболее резко изменился ИРИ крови и ИРК тимуса, в меньшей степени – ИРК лимфатических узлов и селезенки. В группе животных «ОП» (не получавших никакого лечения) на 5-е сутки эксперимента погибло 2 животных из 12 (летальность составила 16,6 %). Во всех остальных группах животных, которым проводили лечение, все крысы выжили. Установлено, что при всех оцениваемых вариантах лечения острого разлитого перитонита отмечается нормализация величин ИРИ крови и ИРК тимуса,

лимфатических узлов и селезенки к 5-м суткам лечения. Однако положительная динамика в изменениях ИРИ крови и ИРК исследуемых лимфоидных органов имела существенные различия при использовании различных подходов в лечении животных. Например, при обычном лечении величины ИРИ и ИРК на 5-е сутки хотя и приближались к соответствующим значениям в контроле, однако еще отличались от них, что свидетельствовало о недостаточности проведенной терапии. Наиболее эффективным в этом отношении оказалось комплексное лечение с элементами лимфотропной терапии, включающей межкостистые подкожные лимфотропные инъекции антибиотика «Цефтриаксон» и иммуномодулятора «Глутоксим», инъекции в тазовую область, а также однократное проведение сорбционной терапии при использовании сорбента СИАЛ-С (М). При этом отмечены наименьшие различия между всеми величинами ИРИ и ИРК

Таблица

Иммунорегуляторный индекс крови (ИРИ) и иммунорегуляторные коэффициенты (ИРК) тимуса, селезенки и лимфатических узлов контрольной и опытных групп животных ($M \pm m$)

Время после индукции воспаления и начала лечения	Группа животных	ИРИ крови (CD4+/CD8+)	ИРК тимуса (CD4+/CD8+)	ИРК лимфатических узлов (CD4+/CD8+)	ИРК селезенки (CD4+/CD8+)
	Контроль	1,62 ± 0,11 (10)	1,70 ± 0,26 (10)	2,08 ± 0,15 (10)	1,31 ± 0,14 (10)
1 сут	ОП (без лечения)	1,23 ± 0,13* (12)	1,22 ± 0,06* (12)	1,70 ± 0,10* (12)	1,07 ± 0,12 (12)
1 сут	ОП+ОЛ	1,29 ± 0,18 (10)	1,41 ± 0,15 (10)	1,79 ± 0,12 (10)	1,09 ± 0,11 (10)
1 сут	ОП+ОЛ+СО	1,43 ± 0,25 (10)	1,43 ± 0,09 (10)	1,80 ± 0,13 (10)	1,11 ± 0,10 (10)
1 сут	ОП+ОЛ+МЛИ	1,43 ± 0,24 (10)	1,52 ± 0,17 (10)	1,82 ± 0,13 (10)	1,12 ± 0,12 (10)
1 сут	ОП+ОЛ+ИТ	1,44 ± 0,26 (10)	1,53 ± 0,26 (10)	1,91 ± 0,14 (10)	1,14 ± 0,13 (10)
1 сут	ОП+ОЛ+МЛИ+ИТ	1,52 ± 0,15 (10)	1,60 ± 0,25(10)	1,92 ± 0,08 (10)	1,14 ± 0,09 (10)
1 сут	ОП+МЛИ+ ИТ+СО	1,63 ± 0,08 (10)	1,61 ± 0,05 (10)	2,02 ± 0,09 (10)	1,19 ± 0,08 (10)
3 сут	ОП (без лечения)	1,12 ± 0,16* (12)	1,11 ± 0,07* (12)	1,49 ± 0,11* (12)	0,89 ± 0,04* (12)
3 сут	ОП+ОЛ	1,41 ± 0,25 (10)	1,33 ± 0,16 (10)	1,62 ± 0,14* (10)	1,10 ± 0,09 (10)
3 сут	ОП+ОЛ+СО	1,52 ± 0,16 (10)	1,42 ± 0,15 (10)	1,75 ± 0,11 (10)	1,17 ± 0,08 (10)
3 сут	ОП+ОЛ+МЛИ	1,63 ± 0,27 (10)	1,49 ± 0,08 (10)	1,82 ± 0,13 (10)	1,19 ± 0,11 (10)
3 сут	ОП+ОЛ+ИТ	1,70 ± 0,18 (10)	1,51 ± 0,08 (10)	1,93 ± 0,13 (10)	1,21 ± 0,12 (10)
3 сут	ОП+ОЛ+МЛИ+ИТ	1,91 ± 0,16 (10)	1,63 ± 0,19 (10)	2,05 ± 0,12 (10)	1,29 ± 0,07 (10)
3 сут	ОП+МЛИ+ИТ+СО	2,10 ± 0,09* (10)	1,72 ± 0,09 (10)	2,11 ± 0,11 (10)	1,33 ± 0,06 (10)
5 сут	ОП (без лечения)	0,92 ± 0,19* (10)	1,10 ± 0,12* (10)	1,21 ± 0,10* (10)	0,82 ± 0,08* (10)
5 сут	ОП+ОЛ	1,73 ± 0,35 (10)	1,31 ± 0,17 (10)	1,62 ± 0,12 (10)	1,14 ± 0,09 (10)
5 сут	ОП+ОЛ+СО	1,81 ± 0,07 (10)	1,42 ± 0,16 (10)	1,83 ± 0,11 (10)	1,18 ± 0,10 (10)
5 сут	ОП+ОЛ+МЛИ	2,00 ± 0,16 (10)	1,51 ± 0,07 (10)	1,91 ± 0,14 (10)	1,21 ± 0,06 (10)
5 сут	ОП+ОЛ+ИТ	2,09 ± 0,26 (10)	1,53 ± 0,16 (10)	2,07 ± 0,10 (10)	1,28 ± 0,08 (10)
5 сут	ОП+ОЛ+МЛИ+ИТ	2,33 ± 0,06* (10)	1,72 ± 0,09 (10)	2,29 ± 0,08 (10)	1,41 ± 0,12 (10)
5 сут	ОП+МЛИ+ИТ+СО	2,54 ± 0,15* (10)	1,93 ± 0,05 (10)	2,52 ± 0,07* (10)	1,64 ± 0,07* (10)

Примечание. Обозначения групп: ОП – острый перитонит, ОЛ – обычное лечение, МЛИ – межкостистые подкожные лимфотропные инъекции в нижней части грудного отдела позвоночника, ИТ – инъекции в область таза, СО – внутрибрюшинное введение сорбента. Количество животных в группах приведено в скобках (n). * – Различия между контролем и опытом статистически значимы ($p < 0,05$).

опытной и контрольной групп. Комплексная терапия привела к более быстрому восстановлению ИРИ крови и ИРК тимуса, лимфатических узлов и селезенки до соответствующих величин в контроле и даже некоторому их увеличению к 5-м суткам лечения, что свидетельствует не только о нормализации иммунного статуса, но и о мобилизации иммунной системы в целом.

В ходе исследования установлено, что крысы с экспериментальным острым перитонитом, не получавшие лечение, характеризовались постепенным снижением у них ИРИ крови за счет уменьшения относительного содержания Т-хелперов (CD4+) без существенного возрастания доли Т-супрессоров (CD8+). Вместе с тем следует подчеркнуть, что с учетом значительного возрастания количества лейкоцитов в крови у животных с экспериментальным перитонитом (более чем в 1,5 раза), не получавших лечения, абсолютное количество Т-хелперов (CD4+) практически не изменилось, а количество Т-супрессоров (CD8+) возросло более чем на 50 % по сравнению с контролем. Показано, что величина ИРК тимуса снижалась при развитии острого перитонита за счет возрастания количества Т-супрессоров (CD8+) при сохранении количества Т-хелперов (CD4+) на одном уровне. Это может свидетельствовать как об определенной «консервативности» тимуса в отношении механизмов, регулирующих процессы дифференцирования тимоцитов в CD4+-фенотипы при остром разлитом перитоните, так и о более быстрой эмиграции Т-хелперов из тимуса в кровяное русло при указанном патологическом процессе. При оценке величин ИРК лимфатических узлов и селезенки на фоне развития острого перитонита выявлено, что они снижаются как за счет возрастания содержания Т-супрессоров (CD8+), так и за счет снижения количества Т-хелперов (CD4+). При всех видах терапии отмечены тенденции к увеличению количества Т-хелперов (CD4+) и снижению количества Т-супрессоров (CD8+), что выразилось в повышении иммунорегуляторного индекса крови. Аналогичная тенденция была выявлена при оценке ИРК тимуса, лимфатических узлов и селезенки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе результатов настоящего исследования можно сделать заключение, что дополнительная к базовому лечению комплексная лимфотропная терапия в сочетании с применением иммунотерапии и элементов сорбционной терапии на ранней стадии лечения острого разлитого перитонита, несомненно, повышает

эффективность последней, что выражается в нормализации различных иммунорегуляторных показателей, характеризующих системные нарушения иммунного статуса. Результаты исследования могут явиться основой для дальнейших экспериментальных и клинико-лабораторных исследований, необходимых для разработки новых подходов в области лимфотропной терапии не только острого разлитого перитонита, но, возможно, и других патологий инфекционной и неинфекционной этиологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерюхин И.А., Шляпников С.А., Ефимова И.С. Перитонит и абдоминальный сепсис // Инфекции в хирургии. 2004. (2). 2–8.
2. Ларичев А.Б., Волков А.В., Абрамов А.Ю. Лечение распространенного послеоперационного перитонита // Рос. мед. журн. 2006. (1). 8–12.
3. Mulier S., Penninckx F., Verwoest C. et al. Factors affecting mortality in generalized postoperative peritonitis: multivariate analysis in 96 patients // J. Surg. 2003. 27. (4). 379–384.
4. Альперович Б.И., Барабаш В.И. Способ наложения управляемой лапаростомии при распространенном перитоните // Бюл. сибирской мед. 2003. (2). 22–25.
5. Белужников А.Б., Любарский М.С., Нимаев В.В. Коррекция синдрома эндогенной интоксикации при распространенном перитоните с использованием лимфотропных технологий // Бюл. СО РАМН. 2008. (5). 67–71.
6. Gcnne D., Menetrey A., Jaquet A. et al. Treatment of secondary peritonitis: is a less expensive broad-spectrum antibiotic as effective as a carbapenem? // Dig. Surg. 2003. 20. (5). 415–420.
7. Yamamoto T., Umegae S., Kitagawa T., Matsuoto K. Intraperitoneal cytokine productions and their relationship to peritoneal sepsis and systemic inflammatory markers in patients with inflammatory bowel disease // Dis. Colon. Rectum. 2005. 48. 1005–1015.
8. Корчагин Е.П., Миминошвили А.О., Коцубанов К.В., Яроцак С.В. Опыт прямой антероградной эндолимфатической терапии в лечении послеоперационного пареза кишечника при распространенном перитоните // Укр. журн. хирургии. 2011. (1). 109–112.
9. Александров В.П., Михайличенко В.В., Печерский А.В. Лимфотропный способ введения антибиотиков при лечении больных хроническим простатитом // Урология и нефрология. 1998. (5). 22–24.
10. Белужников А.Б., Любарский М.С., Нимаев В.В. и др. Лимфотропные технологии в лечении пациентов с перфоративной язвой, осложненной перитонитом // Третий Съезд хирургов Сибири и Дальнего Востока. Томск, 2009. 6–7.

11. Добрынина И.Ю. Нейрокомпьютерный системный анализ показателей иммунограммы у больных сахарным диабетом 2 типа с различными клиническими вариантами течения // Вестн. новых мед. технологий. 2007. 14. (1). 45–48.

12. Evans D., Zhu G., Duffy D. et al. A major quantitative trait locus for CD4–CD8 ratio is located on chromosome 11 // Genes Immun. 2004. 5. 548–552.

13. Damoiseaux J., Cautain B., Bernard I. et al. A dominant role for the thymus and MHC genes in

determining the peripheral CD4/CD8 T cell ratio in the rat // J. Immunol. 1999. 163. 2983–2989.

14. Pecaat M., Nelson G., Peters L. et al. Selected Contribution: Effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. I. Immune population distributions // J. Appl. Physiol. 2003. 94. (5). 2085–2094.

15. Рагимов Р.М. Применение озонированного перфторана в комплексном лечении острых перитонитов и профилактике послеоперационных осложнений: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Махачкала, 2010.

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF COMPLEX CORRECTION OF IMMUNE STATUS DISTURBANCES AT ACUTE POURED PERITONITIS BY METHODS OF LYMPHOTROPIC THERAPY IN EXPERIMENT

Anatoly Anatoljevich ANIKEEV¹, Mikhail Semenovich LUBARSKY²,
Maria Gennadjevna PUSTOVETOVA¹, Sergey Alekseevich ARKHIPOV¹,
Irina Aleksandrovna GOLUBEVA¹, Igor Raufovich VALEEV², Igor Pavlovich ZHURAKOVSKY¹,
Mariya Vyacheslavovna BITKHAEVA¹, Tatyana Anatoljevna KUNTS¹

¹Novosibirsk State Medical University of Federal Agency of Public Health and Social Development
630009, Novosibirsk, Krasnyi av., 52

²Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

On the model of an acute poured peritonitis at rats the features of system immune status disturbances at an experimental peritonitis have been investigated and the evaluation of different methods of their correction based on the usage of common medicamentous therapy and complex therapy including sorption technology, immunotherapy and two methods of indirect lymphotropic therapy has been carried out. The ratio of T-lymphocytes-helper (CD4+) and T-lymphocytes-suppressor (CD8+) levels in blood, thymus gland, spleen and lymphatic nodes has been used as the characteristic describing the immune status of investigated animals. It has been shown that the complex therapy of acute poured peritonitis including hypodermic lymphotropic injections of medicinal drugs in area of thoracal and lumbar departments of vertebral column in combination with sorbent is more effective, than traditional way of treatment.

Keywords: acute experimental peritonitis, lymphotropic injections, immunoregulatory index, immunoregulatory coefficient, blood, thymus gland, spleen, lymphatic nodes.

Anikeev A.A. – candidate of medical sciences, researcher of central research laboratory

Lyubarsky M.S. – doctor of medical sciences, professor, deputy director on scientific work

Pustovetova M.G. – doctor of medical sciences, professor, head of central research laboratory,
e-mail: patophysiol@mail.ru

Arkhipov S.A. – doctor of biological sciences, senior researcher of CRL, e-mail: arhipowsergei@yandex.ru.

Golubeva I.A. – doctor of medical sciences, professor

Valeev I.R. – post-graduate student

Gurakovsky I.P. – candidate of medical sciences, senior researcher of CRL

Bitkhaeva M.V. – researcher of CRL

Kunts T.A. – junior researcher of CRL

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Людмила Викторовна СЕРДЮК¹, Светлана Ивановна ЛЕЩУК¹,
София Марковна ПОПКОВА¹, Галина Валерьевна ЮРИНОВА²,
Елена Борисовна РАКОВА¹

¹ ФГБУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН
664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет Минобрнауки России
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) остается по-прежнему в арсенале диагностических тестов исследователей, поскольку как в медицинской, так и в ветеринарной практике зарекомендовала себя с хорошей стороны за счет сочетаемости высокой специфичности и экономичности. Однако имеющиеся на вооружении лабораторий диагностикумы, к сожалению, отличаются низкой чувствительностью и небольшим сроком хранения. В данной работе предлагаются и рассматриваются некоторые методы совершенствования иммунодиагностических систем для РНГА по двум основным направлениям: использование конъюгирующего компонента, усиливающего адсорбционные свойства носителя (эритроцита) и способствующего увеличению срока хранения, а также подбор высокоактивного антигена для сенсibilизации эритроцитов, повышающего чувствительность диагностикума. В работе анализируются результаты испытания диагностикумов с водорастворимым полимером поли-1-винилимидазолом, используемым в качестве конъюгата, в сравнении с традиционным конъюгатом хлористым хромом, производится оценка антигенной активности разных фракций микробных клеток при иммунизации животных и в составе диагностикумов, обосновываются преимущества применения новых компонентов диагностикумов. Установлено, что применяемая технология способствует улучшению качественных характеристик эритроцитарного диагностикума: специфичности, чувствительности, срока хранения, воспроизводимости результатов.

Ключевые слова: эритроцитарный иммунодиагностикум, антиген, клеточные фракции, синтетический полимер, антитело.

Современная серодиагностика бактериальных инфекций опирается на модернизацию классических методов анализа и разработку новых. Следует отметить, что в научной литературе имеется достаточное количество работ, посвященных сравнительной оценке качеств различных серологических тестов, а также перспектив их применения [5, 7, 13]. При этом указывается, что совпадения результатов, к примеру, иммуноферментного метода с традиционными серологическими тестами (реакция связывания компонента; реакция непрямой гемагглютинации эритроцитов – РНГА), при выявлении антител к различным патогенам могут колебаться от 71 до 93 % [6]. Таким образом, совершенствуя качественные характеристики тест-систем для РНГА,

можно повысить чувствительность реакции до уровня чувствительности иммуноферментного анализа [13]. Специфичность РНГА всегда считалась весьма высокой, к достоинствам метода можно отнести его практичность и универсальность [4, 5].

Совершенствование классической РНГА ведется по нескольким направлениям: получение функционально активных антигенных препаратов; использование в дизайне тест-систем полифункциональных конъюгирующих компонентов; модификация условий постановки реакции; разработка способов повышения специфической активности и срока хранения тест-систем.

Сердюк Л.В. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории микробиологии, e-mail: radugarose@yandex.ru

Лещук С.И. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии, e-mail: leschuk.swet@yandex.ru

Попкова С.М. – д.б.н., руководитель лаборатории микробиологии, e-mail: smpopkova@gmail.com

Юринова Г.В. – к.б.н., доцент кафедры физико-химической биологии, e-mail: yurinova@yandex.ru

Ракова Е.Б. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории микробиологии, e-mail: lenova_@mail.ru

В ряду данных направлений важным фактором, определяющим эффективность серологического теста, по-прежнему остается качество используемого антигенного препарата, обуславливающего чувствительность и специфичность как РНГА, так и любого другого метода в серологической диагностике [4]. Не менее существенной нам представляется задача усиления адсорбционных свойств носителя (эритроцита), способствующих повышению чувствительности иммунодиагностикума [1].

В связи с вышесказанным целью исследований явилось совершенствование технологии изготовления бактериальных иммунодиагностикумов с помощью синтетических конъюгирующих компонентов и функционально активных белковых (антигенных) субстанций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве антигенов в работе использовались клеточные фракции бифидобактерий, культивированных из коммерческого штамма *Bifidobacterium bifidum* № 1 производства «Ланафарм» (г. Москва). Фракцию клеточных стенок и цитоплазматическую фракцию получали путем двукратного разрушения клеток на ультразвуковом дезинтеграторе (UD-20, Польша) в течение 2 мин при 4 °С (непрерывная волна рабочей частоты – 22 кГц). Дезинтегрированную микробную массу суспендировали в 100 мл фосфатного буфера (рН 7,2) и центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин (центрифуга К 70D, ГДР) при 4 °С для осаждения неразрушенных клеток бифидобактерий. Супернатант повторно центрифугировали в течение 10 мин при 8000 об/мин на лабораторной медицинской центрифуге ОПН-8 (Россия). Полученный осадок представлял собой фракцию клеточных стенок, а надосадочная жидкость – цитоплазматическую фракцию. Таким образом, были получены две клеточные фракции бифидобактерий – фракция клеточных стенок (ФКС) и цитоплазматическая фракция (ЦПФ) [19].

Изучение белкового спектра и аминокислотного состава клеточных фракций бифидобактерий проводилось с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и на аминокислотном анализаторе.

В качестве второго антигена была использована фракция клеточных стенок нетоксигенных коринебактерий дифтерии (НТКД) (белок с молекулярной массой 64 кДа), полученная методом дезинтеграции и любезно предоставленная доктором Е.А. Шмелевой (г. Москва, НИИ экспериментальной медицины) [12].

При конструировании тест-систем применялись конъюгирующие компоненты: хлорид хрома ($\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3%), традиционно используемый при изготовлении эритроцитарных диагностикумов, и синтетический полимер поли-1-винилимидазол (ПВИ) в концентрации 0,01 мкг/мл. Последний был синтезирован и предоставлен для испытания В.В. Анненковым в рамках совместных исследований конъюгирующих и адьювантных свойств синтетических водорастворимых полимеров (г. Иркутск, Лимнологический институт РАН) [1]. В состав оригинальных диагностикумов входили стандартизованные эритроциты барана, формализированные по методу R. Weinbach [19].

При приготовлении эритроцитарных диагностикумов формализированные эритроциты барана конъюгировали полимером ПВИ или CrCl_3 в течение 2 ч при комнатной температуре (шутель ИФКО-1, Россия), после чего сенсibilизировали антигенами (дезинтегрированные клетки бифидобактерий и нетоксигенных коринебактерий дифтерии в концентрациях, соответствующих стандарту мутности не менее 10 ед.) при 56 °С (аппарат АИС, Россия) в течение 30 мин, отмывали физиологическим раствором, содержащим 1 % твина-80, на центрифуге 70D (ГДР) при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. Затем готовили 0,8 % взвесь сенсibilизированных эритроцитов в физиологическом растворе, содержащем 1 % твина-80 с добавлением консерванта (0,1% азид натрия), которая и являлась готовым диагностикумом [9], хранившемся в условиях бытового холодильника при температуре 4–6 °С. Всего изготовлено 15 серий тест-систем.

Контролем специфичности и чувствительности диагностикумов служили гипериммунные сыворотки крови животных, полученные в результате иммунизации антигенами *Bifidobacterium bifidum* № 1 и бактериальной вакциной «Кодивак». В эксперименте использовали 60 мышей. Схема иммунизации – 4-кратная с интервалом 7 дней и ревакцинацией через месяц. Забор крови производили через 7 дней после последней инъекции. Исследования на животных выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. По окончании эксперимента животных умерщвляли методом

Таблица 1

Антигенная активность клеточных фракций бифидобактерий

	Титры антител					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Пулы сывороток от мышей, иммунизированных ФКС	++++	++++	++++	++++	+++	++
Пулы сывороток от мышей, иммунизированных ЦПФ	++++	++++	+++	++	+–	–

декапитации, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Содержание гуморальных антибактериальных антител в сыворотках крови определяли методом РНГА с помощью полученных иммунодиагностических препаратов на основе антигенов клеточных стенок нетоксигенных коринебактерий дифтерии [12] и фракций клеток бифидобактерий. Сыворотки крови для исследования взяты от пациентов гастроэнтерологического отделения Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, на что было получено информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антигены бактерий представляют собой мультимолекулярные сложные смеси, способные вызывать образование антител разной специфичности, в связи с чем проводились исследования функциональной активности клеточных фракций бифидобактерий. Клеточную стенку штамма *Bifidobacterium bifidum* составляет обширная группа гетерогенных белков, которые, в свою очередь, представлены тридцатью отдельными субъединицами с молекулярной массой от 44,2 до 125 кДа. В структурообразовании белков клеточных стенок большая часть приходится на неполярные гидрофобные (44 мол.%) и заряженные аминокислоты (34 мол.%). Значительное содержание неполярных аминокислот (44 %) в белках ФКС свидетельствует в пользу их участия в формировании адгезинов. В белковом спектре ЦПФ белковые субъединицы с вы-

сокими и средними молекулярными массами, характерными для белков ФКС, отсутствовали [13].

Для оценки антигенности полученных клеточных фракций проводили иммунизацию лабораторных мышей, одна часть животных иммунизировалась ЦПФ бифидобактерий, другая – ФКС. Функциональная активность данных фракций оценивалась по уровню специфических антител в образцах сывороток крови, полученных от вакцинированных животных [14, 18]. Кровь мышей по окончании опытов собирали от каждой группы в одну пробирку (в виде пула) и анализировали на наличие антител к вводимым антигенам методом РНГА при помощи оригинальной тест-системы на основе ФКС. Данные эксперимента представлены в табл. 1.

Эксперимент показал, что ФКС бифидобактерий обладает большей антигенной активностью по сравнению с ЦПФ, что, скорее всего, обусловлено особенностями ее белкового и аминокислотного состава. Таким образом, ФКС бифидобактерий наиболее перспективна в качестве антигена как для получения гипериммунных контрольных сывороток, так и при конструировании диагностических систем.

Следующим важнейшим моментом в технологии изготовления эритроцитарных диагностикумов является подбор конъюгирующего (связывающего) компонента между эритроцитом и белком (антигеном). Вещества, наиболее часто используемые для связывания иммуноактивных частиц с поверхностью эритроцита (глутаровый альдегид, гидрохинон, хлорид хрома), не обеспечивают достаточной воспроизводимости результатов и стабильности тест-систем при хранении. Довольно часто наблюдаются явления спонтанной агглютинации эритроцитов. Конъюгация с применением подобных низкомолекулярных веществ основана на образовании ковалентных связей между сенсибилизируемым белком и поверхностью эритроцита. При хранении таких эритроцитарных диагностикумов происходит постепенное конформирование макромолекулярных цепей белка, что и обуславливает их нестабильность, отражающуюся на воспроизводимости РНГА [10].

Напротив, при конъюгации эритроцита синтетическим полимером с последующей сенсибилизацией белковыми составляющими клеточных фракций между синтетическим полимером и белком формируются ионно-водородные связи. Многоочечная система ионных и водородных контактов молекул белка и синтетического полимера обеспечивает устойчивость системы. При данных химических взаимодействиях об-

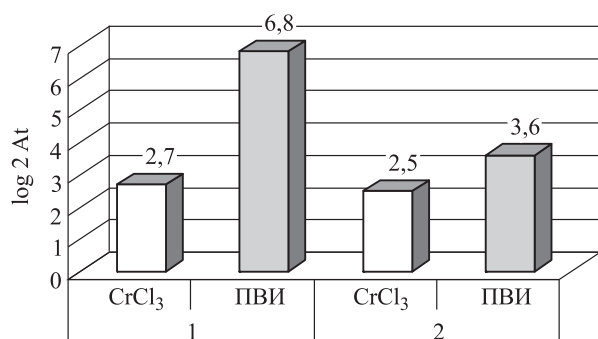


Рис. Зависимость диагностического титра антибактериальных антител от связующего компонента в тест-системах (CrCl₃ и ПВИ); 1 – диагностикум на основе фракции клеточных стенок по определению антител к бифидобактериям, 2 – диагностикум по определению антител к коринебактериям дифтерии

разуется комплекс, подобный интерполимерному, в котором синтетическая часть не изменяет структуру белковой молекулы [11]. При испытании новых конъюгирующих компонентов нами также учитывались концентрация полимера и объемные соотношения взвеси эритроцитов, антигена и раствора полимера.

Сравнительный анализ результатов испытания сконструированных диагностикумов на основе антигенов ФКС бифидобактерий и коринебактерий дифтерии с разными конъюгирующими компонентами (см. рисунок) показал, что с помощью CrCl₃ возможна эффективная связь эритроцитов с белками, но при этом отмечалась более низкая чувствительность и нестабильность диагностикумов при хранении (не более 3–5 месяцев). Использование синтетического полимера в качестве конъюгирующего компонента позволило повысить их чувствительность, стабильность и продлило срок хранения готовых тест-систем до 3 лет и более [1–3, 8]. В данных опытах было показано, что чувствительность тест-систем, изготовленных с помощью синтетических полимеров, в 2 раза и более превышает чувствительность диагностических систем на основе хлорида хрома.

Для сравнения чувствительности диагностикумов, приготовленных с эритроцитами, sensibilizированными антигенами разных фракций микробных клеток бифидобактерий, нами изготовлены и испытаны 3 варианта тест-систем. В качестве конъюгата использовался ПВИ, а антигенными составляющими были фракция клеточных стенок, цитоплазматическая фракция и целые клетки бифидобактерий. Исследовались сыворотки крови людей, содержащие антитела к бифидобактериям.

Таблица 2

Сравнительная характеристика диагностикумов на основе фракций (ФКС и ЦПФ) и целых клеток бифидобактерий

№ исследуемой сыворотки	Титры антибактериальных антител при использовании антигенных диагностикумов		
	на основе ФКС	на основе ЦПФ	на основе целых клеток бифидобактерий
1	1:8	1:2	1:2
2	1:16	1:2	1:4
3	1:16	1:2	1:4
4	1:16	1:2	1:4
5	1:32	1:4	1:16
6	1:64	1:16	1:2
7	1:32	1:8	1:16
8	1:16	1:8	1:16
9	1:16	1:2	1:2
10	1:16	1:4	1:4
11	1:16	1:2	1:4
12	1:16	1:4	1:4
13	1:32	1:4	1:2
14	1:64	1:2	1:16
15	1:64	1:2	1:16
<i>M ± m (log₂)</i>	4,46 ± 0,44*	1,73 ± 0,14	2,40 ± 0,22

Примечание. *M* – среднее арифметическое; *m* – ошибка среднего; * – log₂ титра исследуемых сывороток составил 6,8 ± 0,7; отличие от величин во втором и третьем столбцах статистически значимо по критерию Стьюдента (*p* < 0,05).

Полученные результаты (табл. 2) свидетельствовали о том, что эритроцитарный иммунодиагностикум на основе ФКС бифидобактерий определял антитела в средних и высоких титрах (1:16 – 1:64) в 93 % сывороток, эритроцитарный иммунодиагностикум на основе ЦПФ — в 6,6 % сывороток (только средние титры антител 1:16). Третий вариант диагностикума (на основе целых клеток бифидобактерий) выявлял антитела в таких же титрах в 33,3 % сывороток. Средний титр антител к ФКС бифидобактерий был значимо выше, чем аналогичный показатель при использовании ЦПФ или целых клеток бифидобактерий.

Следовательно, использование антигенов клеточной стенки бифидобактерий для sensibilizации эритроцитов при конструировании иммунодиагностикумов по данной технологии значительно усиливает их эффективность. Это обстоятельство можно объяснить тем, что в результате процесса дезинтеграции клеток

«обнажаются» антигенные детерминанты, локализованные в более глубоких слоях клеточных стенок бактерий, что значительно расширяет их антигенный спектр и в дальнейшем приводит к увеличению сенсibilизационной активности белка с носителем. Как следствие – повышается чувствительность тест-систем [7, 13]. Проведенные исследования показали преимущество ФКС как при иммунизации животных с целью получения гипериммунных сывороток, так и в качестве антигенной составляющей эритроцитарных диагностикумов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установление и подтверждение диагноза как при вирусных, так и при бактериальных заболеваниях в большой степени зависит от лабораторных данных, поэтому разработка и совершенствование тестовых систем и методов лабораторной диагностики, выбор наиболее рационального подхода при конструировании и оценке функциональных характеристик диагностических препаратов являются чрезвычайно актуальной проблемой. При этом следует обращать внимание на простоту постановки анализа, воспроизводимость результатов, а также информативность методов, эффективность которых может быть оценена при проведении как клинических, так и популяционных исследований. Особое значение для повышения качества диагностикумов, по нашему мнению, имеют выбор антигена, выбор способа изготовления диагностикума, а также использование качественного конъюгирующего компонента.

Иммунодиагностика на основе РНГА остается по-прежнему в арсенале исследователей, поскольку она зарекомендовала себя с хорошей стороны как в медицинской, так и в ветеринарной практике. Тем не менее имеются некоторые негативные моменты при использовании тест-систем, связанные как с их невысокой чувствительностью, так и с короткими сроками сохранности препаратов [15, 16]. Использование нами синтетических полимеров (поливинилимидазолов) в качестве конъюгатов позволяет не только на порядок усилить чувствительность иммунодиагностикумов по сравнению с традиционными способами их приготовления (хлорид хрома), но и значительно повысить сроки использования (до 3–5 лет) с хорошей воспроизводимостью результатов. В исследованиях G. Rubinsky-Elefant и соавт. [17] за счет совершенствования только способа приготовления антигена для сенсibilизации эритроцитов авторам удалось довести сроки хранения до 9 мес., что представлялось значительным дости-

жением, особенно в масштабных популяционных исследованиях. При этом чувствительность полученной ими тест-системы для определения антител к *Streptococcus pyogenes* оставалась на таком же уровне. Применяемая нами технология, основанная на введении в конструкцию тест-системы водорастворимых полимеров в качестве конъюгатов, связывающих антиген (белок) с поверхностью эритроцита-носителя, существенно повлияла на основные качественные характеристики иммунодиагностикумов (чувствительность, воспроизводимость), значительно удлинив сроки хранения тест-системы до 3 лет. Таким образом, применение новых конъюгирующих компонентов и многофункциональных белковых составляющих представляет перспективу создания высокочувствительных и экономичных диагностических систем для широкого применения, в том числе и в популяционных исследованиях.

Авторы благодарят доктора биологических наук Шмелеву Елену Александровну, доктора химических наук Анненкова Вадима Владимировича за консультативную и техническую помощь в проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анненков В.В., Леуцук С.И., Попкова С.М. и др. Современные подходы к конструированию препаратов в иммунотехнологии // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2004. (9). 50–54.
2. Анненков В.В., Мазяр Н.Л., Круглова В.А. и др. Исследование взаимодействия полиакриловой кислоты с поли-1 винилазолами // Высокомолекулярные соединения. Сер. А. 1999. 41. (2). 357–362.
3. Анненков В.В., Мазяр Н.А., Леуцук С.И. и др. Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с поли-N-винилазолами // Высокомолекулярные соединения. Сер. А. 2000. 42. (11). 1804–1810.
4. Каральник Б.В. Эритроцитарные реагенты в клинической иммунологии // Иммунология. 1995. (6). 4–6.
5. Кокорев В.С. Методология повышения диагностической эффективности вирусных препаратов. Екатеринбург, 2000. 350 с.
6. Никитин В.М. Справочник методов иммунологии. Кишинев: Штиинца, 1982. 304 с.
7. Николаева Т.Н., Бондаренко В.М., Николаева А.И. и др. Иммуномодулирующий эффект белковых фракций, выделенных из бифидобактерий // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004. (2). 60–64.
8. Пат. 2009126306 РФ. Способ получения эритроцитарного антигенного диагностикума / С.И. Леуцук, В.В. Анненков, С.М. Попкова, Л.В. Сердюк; Опубл. 08.07.2009.

9. Пат. 2499483 РФ. Способ получения эритроцитарного антигенного диагностикума / С.И. Лещук, Е.Н. Даниловцева, Л.В. Сердюк и др.; Опубл. 20.09.2011.

10. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Конъюгированные полимер-субъединичные иммуногены и вакцины // Вестн. РАМН. 2003. (1). 10–14.

11. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о механизмах действия полиоксидония // Иммунология. 2005. (4). 197–199.

12. Шмелева Е.А. Биологическая функция антигенов клеточной стенки *S. diphtheriae* и научно-производственная разработка иммуномодулирующего препарата «Кодивак»: автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 1992.

13. Юринова Г.В. Совершенствование технологии приготовления эритроцитарных иммунодиагностикумов для РППА на основе клеточных фракций бифидобактерий с использованием синтетических полимеров: дис. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ, 2005.

14. Andrianov A.K., De Collibus D.P., Gillis H.A. et al. Poly[di(carboxyphenoxy)phosphazene] is a po-

tent adjuvant for intradermal immunization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. 106. 18936–18941.

15. Barakat A.M.A., Abd Elaziz M.M., Fadaly H.A. Comparative diagnosis of toxoplasmosis in Egyptian small ruminants by indirect hemagglutination assay and ELISA // Global Veterinaria. 2009. 3. (1). 9–14.

16. Nakarin J., Pradutkanchana S. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect hemagglutination assay for detection of leptospiral antibody by using three different antigens // J. Med. Assoc. Thai. 2004. 87. (10). 1218–1224.

17. Rubinsky-Elefant G., Hoshino-Shimizu S., Mamizuka E.M., Asciti M.M.R. Improvement of the indirect hemagglutination test for the detection of antibodies to *Streptococcus pyogenes* // Braz. J. Med. Biol. Res. 1998. 31. 1081–1089.

18. Tagliabue A., Rappuoli R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real // Hum. Vaccin. 2008. 4. 347–349.

19. Weinbach R. Die Verwendbarkeit formol behandelter Erythrozyten als Antigen-Tädger in der indirekten Hämagglutination // Z. Allerg. Path. 1959. 22. 1–8.

WAYS OF INCREASING THE EFFICIENCY OF IMMUNODIAGNOSTIC BACTERIAL PREPARATIONS

Lyudmila Viktorovna SERDYUK¹, Svetlana Ivanovna LESHCHUK¹, Sofiya Markovna POPKOVA¹, Galina Valer'evna YURINOVA², Elena Borisovna RAKOVA¹

¹ *Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS 664025, Irkutsk, Timiryazev str., 16*

² *Irkutsk State University 664003, Irkutsk, Karl Marx str., 1*

Indirect haemagglutination (IHA) test remains as before in an arsenal of researchers diagnostic tests both in medical and veterinary fields owing to fortunate combination of such factors as high specificity and savings on costs. Nevertheless diagnostic antigens currently using in laboratories, unfortunately, are characterized by low sensitivity and a short storage life. In the article some methods for development of IHA immunodiagnostic test-systems in two main directions as a pairing component using to enhance adsorption activity of a carrier (erythrocyte) and to increase immunodiagnostic antigens storage life and also highly active antigen selecting for erythrocytes sensitization to improve diagnostic antigen sensitivity are offered and considered. Test data of diagnostic test-systems with the water-soluble polymer poly-1-vinyl imidazol as a conjugate in comparison with generally accepted conjugate, chromium chloride, are analyzed. Antigen activity of microbial cell different particles at animals' immunization and in structure diagnostic test-systems itself is assessed. Advantages of diagnostic test-systems new components application are proved too. The applied technology of preparing antigenic erythrocyte diagnostic systems promotes an improvement of their qualitative characteristics such as specificity, sensitivity, storage life, results reproducibility.

Key words: erythrocyte immunodiagnostics, antigen, cell wall, synthetic polymer, antibody.

Serdyuk L.V. – candidate of biological sciences, researcher of the laboratory of microecology, e-mail: radugarose@yandex.ru

Leshchuk S.I. – doctor of biological sciences, leading researcher of the laboratory of microecology, e-mail: leschuk.swet@yandex.ru

Popkova S.M. – doctor of biological sciences, head of laboratory of microecology, e-mail: smpopkova@gmail.com

Yurinova G.V. – candidate of biological sciences, associate professor of the chair for physical and chemical biology, e-mail: yurinova@yandex.ru

Rakova E.B. – candidate of biological sciences, researcher of the laboratory of microecology, e-mail: lenova_@mail.ru

АПОПТОЗ ТРОМБОЦИТОВ: ПРИЧИНЫ НЕДОСТАТОЧНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТРОМБОЦИТАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Гелена Анатольевна БЕРЕЗОВСКАЯ

ФГБУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»

Минздравсоцразвития России

197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Повышенная агрегация тромбоцитов лежит в основе патогенеза большого количества заболеваний. Однако не всегда удается преодолеть гиперагрегацию тромбоцитов и предотвратить развитие тромботических осложнений с помощью антитромбоцитарных препаратов. Данная статья посвящена апоптозу тромбоцитов, который, как предполагается, может рассматриваться в качестве неучтенного фактора их активации и нового предиктора развития осложнений у больных ишемической болезнью сердца, а также новой мишени для антиагрегантных препаратов.

Ключевые слова: апоптоз, тромбоциты, агрегация, тромбин, каспазы, фосфатидилсерин, аннексин V.

Тромбоциты, как известно, являются одними из основных участников сосудистых катастроф при ишемической болезни сердца (ИБС). Их активация приводит не только к формированию тромба – морфологического субстрата атеротромбоза, но и к образованию большого количества биологически активных веществ: факторов роста (PD-EGF – эпидермального фактора роста тромбоцитов, PDGF A+B – тромбоцитарного фактора роста, TGF- β – трансформирующего фактора роста, IGF-I, II – инсулиноподобных факторов роста, VEGF – фактора роста эндотелия сосудов, ECGF – фактора роста эндотелиальных клеток, bFGF – основного фактора роста фибробластов, EGF – эпидермального фактора роста), адгезивных белков (фибриногена, фибронектина, витронектина, тромбоспондина-1), факторов свертывания (фактора V, фактора XI, белка S, антитромбина), фибринолитических факторов (плазминогена, ингибитора урокиназы, α 2-антиплазмина), протеаз (тканевого ингибитора матриксной металлопротеазы-4) и антипротеаз (металлопротеазы-4, α 2-антитрипсина), основных белков (тромбоцитарного фактора-4, β -тромбоглобулина, эндостатинов), мембранных гликопротеинов (CD-40, P-селектина), а также биологически активных молекул, содержащихся в плотных гранулах тромбоцитов (серотонина, гистамина, дофамина, АДФ, АТФ, Ca^{2+} , катехоламинов) [1, 2]. Подобная многофункциональность делает эти клетки ключевы-

ми фигурами как в системе гемостаза, так и в регуляции репаративных процессов. Попыткой преодолеть некоторые нежелательные явления, связанные с активацией тромбоцитов, а также регламентировать их участие в различных патологических состояниях, обусловлено назначение антитромбоцитарных препаратов. Однако в ряде случаев, несмотря на наличие в терапии данных препаратов, развиваются события, как ухудшающие течение самой ИБС, так и в значительной мере ограничивающие возможности эффективного использования различных методов лечения данной патологии. Речь, прежде всего, идет о чрескожном коронарном вмешательстве со стентированием.

С каждым годом расширяется перечень, как потенциальных мишеней для антитромбоцитарных препаратов, так и модификаций стентов, используемых при чрескожном коронарном вмешательстве. Однако проблема по-прежнему остается далекой от окончательного решения. Подобное положение дел заставляет исследовать качественно новые аспекты жизнедеятельности тромбоцитов с целью улучшения прогноза осложнений и поиска новых подходов в лечении. К числу таких инноваций относится изучение апоптоза тромбоцитов.

Апоптоз, или запрограммированная смерть клетки, – явление, хорошо изученное для ядродержащих клеток. Как известно, этот процесс характеризуется морфологическими и биохими-

Березовская Г.А. – к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ острого коронарного синдрома, e-mail: berezovgel@mail.ru

мическими изменениями в ядре, митохондриях, цитоплазме и плазматической мембране, а образующиеся при этом апоптотические тела подвергаются фагоцитозу [3, 4]. Известны два пути активации апоптоза ядродержащих клеток: «внешний» путь, который индуцируется сигналами, полученными от взаимодействия так называемых «лигандов смерти» с соответствующими рецепторами на поверхности клеток, и «внутренний» путь, который запускается при нарушении целостности митохондрий и деполаризации их мембран (снижении мембранного потенциала $\Delta\Psi_m$), высвобождении кофакторов апоптоза, таких как цитохром *c*, происходящих под контролем про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [4, 5].

В последние два десятилетия появилась информация и о том, что апоптозу подвергаются также безъядерные клетки – цитопласты [6–8], к которым прежде всего относятся эритроциты [9] и тромбоциты [10–12]. В результате немногочисленных исследований стало известно, что образование тромбоцитов и их последующая продолжительность жизни регулируется, по крайней мере частично, апоптотическими механизмами [13]. Стало известно, что превращение мегакариоцитов в протромбоциты происходит при участии антиапоптотических белков (Bcl-2 и Bcl-xL) [14, 15] и апоптотических факторов, к которым относятся каспазы (3 и 9), оксид азота и SMAD-белки, модулирующие действие TGF-1 [16, 17]. Данные факты были установлены в исследованиях с использованием тромбоцитов как человека, так и животных. Что же касается изучения апоптоза тромбоцитов в целом, то, как правило, для этой цели используются тромбоциты человека [18–20], собак [21] и мышей [22].

Установлено, что в основе апоптоза тромбоцитов лежит деполаризация мембран митохондрий ($\Delta\Psi_m$), усиление влияния проапоптотических (Bax и Bak) и уменьшение влияния антиапоптотических (Bcl-2) белков, активация каспазы-3 и транслокация фосфатидилсерина с внутренней поверхности мембран тромбоцитов на внешнюю [20] (см. рисунок).

Одним из первых в изучении данной проблемы встал вопрос о причинах, вызывающих апоптоз тромбоцитов. Внимание исследователей, прежде всего, привлек целый ряд агонистов агрегации и адгезии тромбоцитов. Попытка установить взаимосвязь между активацией тромбоцитов и их апоптозом была предпринята в нескольких экспериментальных исследованиях. Так, КН. Lin с соавт. удалось продемонстрировать на примере апоптоза человеческих

тромбоцитов различную степень участия в этих процессах известных индукторов их активации: арахидоновой кислоты (100 мкМ), АДФ (20 мкМ), коллагена (10 мкг/мл), тромбина (0,1 Ед/мл), U46619 (синтетического аналога простагландина PGH_2) (10 мкМ) и ионофора кальция A23187 (5 мкМ). Было установлено, что наиболее сильными индукторами апоптоза тромбоцитов, вызывающими транслокацию фосфатидилсерина, $\Delta\Psi_m$, активацию каспаз и эукариотического фактора инициации 2α (eIF2 α), являются тромбин, U46619 и A23187, а арахидоновая кислота, напротив, не вызывает появления апоптотических событий в тромбоцитах [23].

Самым сильным из известных эндогенных индукторов запрограммированной смерти тромбоцитов является тромбин. Он относится к числу так называемых «лигандов смерти», запускающих «внешний путь» апоптоза, хотя прежде всего тромбин известен как один из основных факторов свертывания крови благодаря участию в преобразовании фибриногена в фибрин, а также как мощный индуктор активации тромбоцитов. В различные фазы коагуляции крови тромбин образуется в чрезвычайно широком диапазоне концентраций, от пико- до наномолярных (максимально до 0,8–1,4 нмоль/л) [24, 25]. Соответственно, во время коагуляции тромбоциты подвергаются воздействию различных концентраций тромбина, способным в различной мере вызывать активацию и апоптоз тромбоцитов. Установлено, что в ядродержащих клетках (нейронах, эпителиоцитах, эндотелиоцитах, фибробластах и опухолевых клетках) тромбин индуцирует или ингибирует апоптоз в зависимости от типа клетки и его концентрации [26]. J. Zain с соавт. показал зависимый от концентрации бимодальный эффект тромбина на рост и апоптоз опухолевых клеток. Низкие концентрации тромбина (1–5 нмоль/л в течение 72 ч) увеличивали рост раковых клеток, тогда как высокие концентрации (5–10 нмоль/л в течение того же времени) снижали его и вызывали апоптоз. В данном исследовании показано, что под действием тромбина происходит остановка клеточного цикла в фазе G_2M , что приводит к угнетению роста опухолевых клеток. Также установлено, что подавление роста и индукция апоптоза опухолевых клеток осуществлялись через активацию находящихся на их поверхности активируемых протеазами рецепторов к тромбину PAR-1 (proteinase-activated receptor 1) [27].

В работе V. Leytin с соавт. показано, что низкие концентрации тромбина вызывают глав-

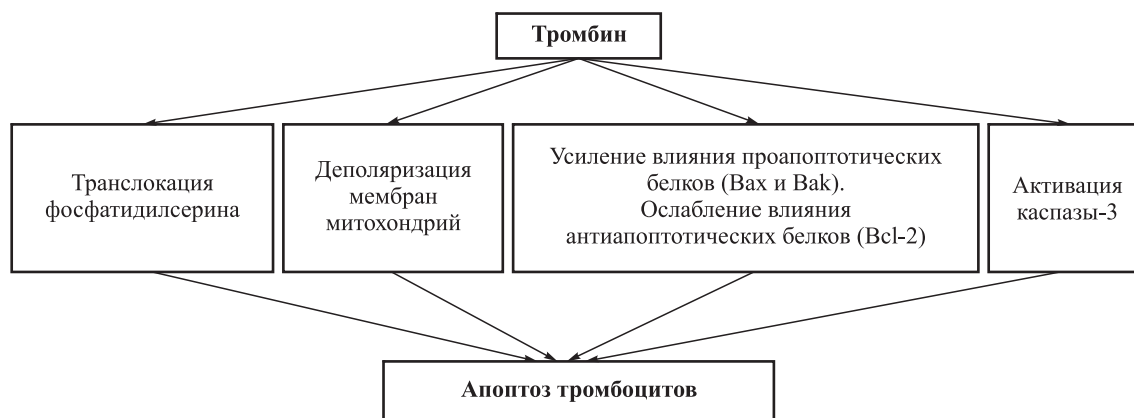


Рис. Механизмы активации апоптоза тромбоцитов

ным образом активацию тромбоцитов, характеризующуюся усилением экспрессии Р-селектина, тогда как высокие концентрации тромбина способствуют запуску апоптотической программы тромбоцитов, вызывая $\Delta\psi_m$, активацию каспазы-3 и транслокацию фосфатидилсерина [28].

Хорошо известно, что воздействие тромбина на тромбоциты приводит к активации клеточных механизмов, вовлеченных в регулирование основных физиологических функций этих клеток, к числу которых относится мобилизация Ca^{2+} из внутриклеточных источников, главным образом из эндоплазматического ретикулума [29–32], активация фосфолипазы A2 [33] и тирозинкиназы [34]. Установлено также, что воздействие тромбина на активируемые протеиназами рецепторы 1 (PAR-1–proteinase-activated receptor 1) приводит к усилению апоптоза ядродержащих клеток (нейронов, фибробластов, опухолевых клеток, эпителиоцитов, эндотелиоцитов) в результате изменения митохондриального мембранного потенциала и связанного с этим увеличения проницаемости мембран митохондрий [26]. Аналогичные пути PAR-1-опосредованной сигнализации были описаны для тромбин-индуцированной активации и проапоптотических ответов тромбоцитов, включая стимуляцию фосфолипазы C, образование инозитолтрифосфата, диацилглицерола и активацию протеинкиназы C [35], которые реализуются через взаимодействие с G-белками. Так, например, соединение с G_q приводит к активации протеинкиназы C, освобождению ионов кальция из внутриклеточных депо тромбоцитов и активации фосфолипазы C с последующим запуском фосфоинозитидного гидролиза, тогда как взаимодействие с G_i , напротив, ингибирует аденилатциклазу. $G_{\beta\gamma}$ участвует в активации фосфатидилинозитол-3-киназы, что приводит к повышению проницаемости мембран тромбоцитов, в том числе

и для внеклеточного кальция, а также увеличению ее чувствительности к действию различных сигнальных белков. Следует отметить, что из всех известных на данный момент изоформ PAR максимальной чувствительностью к действию тромбина обладает именно PAR-1. В эксперименте на мышах было показано, что дефицит этих рецепторов [36] и их блокада с помощью мощных селективных антагонистов (RWJ-58259) [37, 38] существенно уменьшают развитие рестеноза артерий после баллонной ангиопластики. При этом влияние на гиперплазию неоинтимы оказалось более значительным, нежели антитромбоцитарный эффект.

Совершенно очевидно, что тромбин является одним из основных регуляторов жизнедеятельности как ядродержащих, так и безъядерных клеток. В зависимости от концентрации он способен вызывать не только активацию и рост клеток, но и их апоптоз, что делает его чрезвычайно актуальным в изучении патологических состояний, сопровождающихся дисбалансом этих процессов.

Одним из механизмов реализации апоптотической программы является активация тромбином каспазы-3 – ключевого медиатора апоптоза. Так называемая «ранняя активация» каспазы-3 (низкими концентрациями тромбина) – физиологический процесс, в то время как поздняя активация каспазы-3 (высокими концентрациями тромбина) приводит к развитию апоптоза тромбоцитов [39].

Каспазы (caspases, cysteine-aspartic proteases) относятся к классу цистеиновых протеаз, функционирующих как медиаторы сигналов смерти в процессе апоптоза [40]. На данный момент известно 14 каспаз, находящихся в клетке в форме неактивных зимогенов и объединенных в несколько групп по специфичности к субстрату и функциям. В апоптозе тромбоцитов за-

действованы главным образом каспазы-3, 8 и 9. Следует отметить, что каспазы-8 и 9 являются инициаторами начала и распространения сигнала клеточной гибели: каспаза-9 индуцирует выход митохондриального цитохрома *c* и активацию каспазы-3, а каспаза-8 принимает участие в активации рецептора Fas/CD95. В свою очередь активированная каспаза-3, относящаяся к эффекторным каспазам, способствует расщеплению ключевых структурных белков клетки, в результате чего возникают типичные для апоптоза морфологические изменения [41]. Таким образом, цепь превращений приводит к активации одних каспаз другими и заканчивается образованием апоптосом.

Активация каскада каспаз происходит при поступлении апоптогенных сигналов (FasL, TNF- α и TRAIL) через «рецепторы смерти» (DRs, death receptors), расположенные на поверхности клеток. Воздействие на эти рецепторы приводит к их олигомеризации и кластеризации цитоплазматических доменов смерти (DDs, death domains) внутри клетки. Далее, путем сложных взаимодействий происходит активация зимогена каспазы-8 с последующим запуском каскада активации каспаз [42], приводящего к апоптозу.

Недостаточная эффективность антитромбоцитарных препаратов является одной из основных проблем в лечении больных ИБС. Тромбозы интракоронарных стентов также принято связывать с резистентностью к данным препаратам. В настоящее время невосприимчивыми к действию антитромбоцитарных препаратов принято считать пациентов с недостаточными изменениями индуцированной агрегации тромбоцитов. Однако до сих пор остается непонятным, что именно лежит в основе этого явления и каков процент истинной резистентности к антиагрегантам. Ситуация осложняется еще и тем, что до сих пор не существует абсолютно достоверного метода оценки резистентности. С этой целью используется анализ изменений агрегационной активности тромбоцитов под воздействием различных индукторов: арахидоновой кислоты, АДФ, коллагена и других [43, 44]. Однако, по мнению ряда исследователей, данный подход более уместен для характеристики эффекта клопидогреля, нежели аспирина [45], и не отражает степени влияния других факторов активации тромбоцитов, определяющих склонность к тромбообразованию. Вполне возможно, что изучение апоптоза тромбоцитов позволит приоткрыть завесу над тем, что является причиной так называемой остаточной гиперактивности тромбоцитов, которая обнаруживается в 20–30 % случаев «аспиринрезистентности». Под

остаточной гиперактивностью тромбоцитов принято считать наличие устойчивой реактивности тромбоцитов, несмотря на адекватное ингибирование циклооксигеназы-1 [46]. По данным зарубежных авторов, от 5 до 40 % пациентов, принимающих аспирин и клопидогрель, устойчивы либо частично устойчивы к их действию [47–49]. Авторы утверждают, что увеличение дозы препаратов в 2 раза позволяет в четверти случаев преодолеть резистентность, но эта проблема до настоящего времени остается до конца не решенной.

При активации тромбоцитов, как было отмечено выше, происходит транслокация фосфатидилсерина, обладающего мощным прокоагулянтным и тромбиногенным потенциалом, с внутренней поверхности цитоплазматической мембраны на внешнюю. Установлено, что перенос фосфатидилсерина осуществляется с помощью фермента аминоксифолипидтрансферазы (APLT) [50], блокада которого значительно снижает подверженность тромбоцитов апоптозу. Кроме того, открытие митохондриальных пор, участвующих в деполяризации мембран митохондрий [51, 52], и использование в эксперименте на тромбоцитах мышей ингибитора этих пор циклоспорина А позволили получить более детальное представление о механизмах регуляции данного процесса [53–55]. Однако следует отметить, что экспрессия фосфатидилсерина может также происходить после активации тромбоцитов для поддержания генерации тромбина, но не приводит к апоптозу [56].

Таким образом, тромбининдуцированная деполяризация мембран митохондрий способствует увеличению их проницаемости и транслокации фосфатидилсерина на внешнюю поверхность тромбоцитов. Последнее приводит к усилению продукции тромбина, вызывающего активацию или апоптоз тромбоцитов с образованием микрочастиц. В результате этого замыкается несколько порочных кругов, независимо либо совместно ведущих к индукции тромбообразования.

В ходе немногочисленных исследований стало очевидно, что активации и апоптозу подвергаются далеко не все тромбоциты. Изучение механизмов активации тромбоцитов в эксперименте позволило сделать вывод о наличии неоднородности в ответе тромбоцитов на воздействие тромбина в сочетании с коллагеном [57]. Обнаружено, что большей прокоагулянтной активностью обладают тромбоциты, на поверхности которых экспрессируется высокий уровень фосфатидилсерина и α -гранулярного фактора V. Такие тромбоциты были названы «укутанны-

ми». Позднее было установлено, что на поверхности данной фракции тромбоцитов обнаруживаются и другие α -гранулярные белки – фактор фон Виллебранта, тромбоспондин, фибриноген, фибронектин и α_2 -антиплазмин, которые служат субстратами для трансглутаминаз тромбоцитов (тканевой трансглутаминазы и фактора XIIIa) [58]. На тромбоцитах человека показано, что ингибирование тканевой трансглутаминазы приводит к 3–7-кратному снижению образования подобных форм клеток [59, 60].

На данный момент общепринятым является представление о том, что предшественников субпопуляции «укутанных» тромбоцитов не существует, а их появление зависит только от условий активации [61, 62]. Предполагают также, что в формировании данной генерации тромбоцитов принимают участие коллагеновые рецептор-связанные молекулы FcR γ и митохондриальные поры [63, 64]. В эксперименте на мышах показано, что отсутствие FcR γ препятствует выходу α -гранулярных белков и активации рецепторов фибриногена, т. е. коллаген-индуцированным реакциям тромбоцитов. Доказанным считается также влияние АДФ, тромбина [59, 60], внутриклеточных путей сигнализации (активации фосфоинозитид-3-киназы и Src-тирозинкиназы) на формирование различных субпопуляций тромбоцитов при их активации [57].

В настоящее время активно ведется изучение механизмов формирования гетерогенности тромбоцитов. Вполне вероятно, что и подверженность апоптозу у тромбоцитов определяется схожими факторами, в пользу чего свидетельствует наличие общих проявлений этих процессов. Так, например, транслокация фосфатидилсерина, которая, как известно, является одним из основных признаков активации и апоптоза тромбоцитов, приводит к выравниванию концентрации фосфолипидов между внутренней и внешней поверхностью мембраны тромбоцита и потери ее асимметрии, существующей в норме. В результате этого происходит не только сборка прокоагулянтных комплексов (теназного и протромбиназного), но и реализация апоптотической программы. Общим для этих процессов является и открытие митохондриальных пор, определяющих проницаемость и изменение полярности мембран митохондрий — главных эффекторов апоптоза тромбоцитов, а также формирование их гетерогенности.

Несмотря на наличие большого количества инициаторов апоптоза, для поддержания активности данного процесса в рамках физиологических потребностей существуют факторы, препятствующие его развитию. К их числу от-

носится влияние антиапоптотических белков (Bcl-2) и аннексина V.

Аннексин V (ANV) является кальций-зависимым гликопротеином с мощным антикоагулянтным потенциалом [65]. Источниками циркулирующего ANV могут быть клетки сосудистой стенки (эндотелиоциты, гладкомышечные клетки), секреторные клетки селезенки, печени и многие другие. Однако причиной появления ANV во внеклеточном пространстве является лишь апоптоз или разрушение этих клеток. Оказавшись в плазме, он связывается с клетками крови (тромбоцитами и эритроцитами), а также эндотелиоцитами [66]. Установлено, что ANV, обладая высоким сродством к фосфатидилсерину, появляется на поверхности тромбоцитов на ранних этапах запрограммированной гибели клеток и рассматривается как неспецифический маркер апоптоза [67]. Данный гликопротеин образует «антитромботический щит» вокруг фосфолипидов тромбоцитов, изолируя их от влияния факторов свертывания крови [68]. В эксперименте на животных показано, что ANV эффективно ингибирует образование венозных и артериальных тромбов. В работе Van Ryn J. McKenna с соавт. на модели повреждения яремной вены у кроликов обнаружено, что введение ANV в кровь животных в большей мере, нежели инъекция гепарина, препятствовало выпадению фибрина [69]. Чуть позднее были получены убедительные данные и о том, что низкий уровень ANV наряду с повышением содержания антител к нему в плазме пациентов при инфаркте миокарда характеризуют состояние гиперкоагуляции и не связаны с традиционными факторами сердечно-сосудистого риска [70].

Образование комплекса фосфатидилсерина и внеклеточного ANV в ряде случаев стимулирует выработку специфических антител (aANVAs, anti-annexin V antibodies), обнаруженных при различных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка [71–74], антифосфолипидный синдром [75] и цереброваскулярные заболевания [76]. Появление этих антител напрямую связано с возникновением тромбозов и абортос у пациентов с системной красной волчанкой и антифосфолипидным синдромом, а также с развитием синдрома ишемии у пациентов, страдающих системной склеродермией. Кроме того, высказывалось предположение о том, что продукция aANVAs может приводить к нарушению функции ANV и увеличивать тем самым риск развития тромбоза и/или сосудистой окклюзии [77]. Несмотря на то что ANV широко используется в качестве

ве маркера апоптоза [78], его физиологическая роль изучена недостаточно. В ходе немногочисленных исследований были получены противоречивые данные об участии aANVAs в патогенезе острого коронарного синдрома [79, 80]. Длительное время считалось, что исследование роли ANV, aANVAs и антител к кардиолипину при инфаркте миокарда способно пролить свет на механизмы гиперкоагуляции при остром коронарном синдроме. Позднее М. Shojaie с соавт. опубликовали результаты своего исследования, свидетельствующие о том, что низкий уровень ANV и высокое содержание в крови aANVAs напрямую связаны с гиперкоагуляцией и могут рассматриваться в качестве независимых факторов риска развития инфаркта миокарда [81]. Кроме того, было установлено, что содержание данного гликопротеина в крови прямо пропорционально масштабам повреждения миокарда, что позволяет рассматривать кардиомиоциты в качестве одного из основных источников ANV при инфаркте [82].

Следует отметить также, что не только изменение содержания ANV и антител к нему имеет существенное прогностическое значение. Наличие корреляционных связей с другими факторами, характеризующими дисфункцию эндотелия (липопротеина (а), антител к окисленным липопротеинам низкой плотности (ЛПНП)), позволяет рассматривать эти показатели как маркеры дисфункции и апоптоза эндотелия при остром коронарном синдроме [83].

В последние годы большое внимание уделяется изучению роли активных форм кислорода (АФК) в процессе апоптоза. Традиционно они рассматриваются как индукторы апоптоза, хотя известно, что течение данного процесса возможно и в анаэробных условиях [84]. Предполагают даже, что в результате апоптоза происходит удаление клеток с аномально высоким уровнем продукции АФК (O_2^- , H_2O_2 , OH^\bullet , NO^\bullet , $ONOO^-$ и др.) [85].

Оксид азота (NO^\bullet) является еще одним кислородсодержащим соединением, спектр действия которого выходит далеко за рамки свободнорадикальных процессов. Хорошо известно, что эффекты NO^\bullet варьируют в зависимости от дозы и окружения. Он может выступать в роли вазодилататора и антиагреганта и, напротив, при соединении с супероксидным анион-радикалом, образовывать пероксинитрит – соединение, отличающееся чрезвычайно высокой степенью агрессии. Наличие подобной двойственности этой молекулы отмечено и в отношении апоптоза. Вызванный NO^\bullet апоптоз был впервые продемонстрирован в экспериментах на пе-

ритонеальных макрофагах [86]. Установлено, что антиапоптотические эффекты NO^\bullet в малых концентрациях опосредованы через нитрозилирование и инактивацию каспаз, в том числе каспазы-3, 1 и 8. Другие механизмы включают активацию p53 [86], белка теплового шока 70 [87, 88] и, следовательно, блокирование прокаспазы-9 и Araf-1 апоптозом, а также регуляцию Bcl-2 и Bcl-XL с последующим торможением выхода из митохондрий цитохрома c и синтеза цГМФ, ведущего к активации цГМФ-зависимой протеинкиназы, и пресечение деятельности каспаз [89]. В больших концентрациях NO^\bullet , напротив, способен индуцировать апоптоз путем прямого токсического влияния на митохондрии. При этом происходит ингибирование окислительного фосфорилирования и образование пероксинитрита в митохондриях [90, 91], открытие гигантских пор митохондриальных мембран с последующим выходом цитохрома c и запуском каспазного каскада [92, 93]. Однако все эти эффекты выявлены при апоптозе ядросодержащих клеток, и до сих пор остается непонятным, насколько возможна экстраполяция этих данных на апоптоз тромбоцитов. На данный момент доподлинно известно, что принцип деления эффектов NO^\bullet на апоптоз в зависимости от участия цГМФ приемлем и для запрограммированной гибели тромбоцитов. Установлено, что NO^\bullet ингибирует и цГМФ-зависимый апоптоз тромбоцитов, препятствуя транслокации фосфатидилсерина, и цГМФ-независимый, устраняя деполяризацию мембран митохондрий [94].

В работе В. Wachowicz с соавт. показано, что $ONOO^-$ *in vitro* вызывает дозозависимую активацию каспазы-3 и деполяризацию мембран митохондрий. Под действием 0,01, 0,1 и 1,0 mM $ONOO^-$ в течение 10 минут было отмечено увеличение экспрессии фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов и образование микрочастиц прямо пропорционально нарастающую концентрацию. Кроме того, было установлено, что присутствие (-)-эпикатехина, флавоноида растительного происхождения, заметно сокращает уровень апоптотических маркеров и активность тирозинкиназы тромбоцитов, индуцированной пероксинитритом [95].

Результаты другого экспериментального исследования позволяют сделать вывод о том, что один из механизмов тромбин-индуцированного апоптоза тромбоцитов связан с продукцией эндогенного H_2O_2 : вызванное тромбином усиление продукции перекиси водорода приводило к деполяризации мембран митохондрий, активации каспазы-3 и 9, транслокации фосфатидилсерина и выходу из митохондрий цитохрома c

[96]. Устранение данных эффектов с помощью введения каталазы также свидетельствует о непосредственном участии H_2O_2 в процессе запрограммированной гибели тромбоцитов, индуцированной тромбином.

Многие продукты свободнорадикальных окислительных реакций, как было установлено, обладают способностью индуцировать апоптоз. Хорошо изучена роль окисленных ЛПНП в патогенезе атеросклероза. Однако известно также, что окисленные в присутствии ионов меди или облучением УФ-светом ЛПНП способны вызывать апоптоз человеческих моноцитов, макрофагов [97, 98], гладкомышечных клеток [99], эндотелиоцитов [100], а также нейрональных клеток дорсального ганглия крыс [101]. В клиническом исследовании А. Sener и соавт. было установлено, что гиперлипидемия не только способствует активации процессов перекисного окисления липидов, но и влияет на образование лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов, активацию и апоптоз тромбоцитов [102].

Суммируя вышеизложенное, можно с уверенностью сказать, что изучение процесса апоптоза тромбоцитов позволит посмотреть на решение давно существующих проблем с качественно новых позиций. Основные успехи в изучении данного аспекта жизнедеятельности тромбоцитов достигнуты в тех областях медицины, в которых судьба этих клеток является ключевой в патогенезе соответствующих состояний. Речь прежде всего идет о коагулопатиях, хранении тромбоцитарных масс, различных септических состояниях и синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания. В последние годы к изучению данной проблемы подключились и гастроэнтерологи, так как было установлено, что в основе патогенеза идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, возникающей у инфицированных *Helicobacter pylori* пациентов, лежит все та же запрограммированная гибель тромбоцитов [103]. При этом неоправданно мал интерес к обсуждаемой проблеме со стороны кардиологов. Хотя данные, приведенные выше, не только весьма убедительно демонстрируют возможности использования связанных с апоптозом тромбоцитов процессов с диагностической целью, но и открывают перспективы создания новых лекарственных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2000. 227 с.
2. Gresele P., Fuster V., Lopez J. et al. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders: a clinical handbook. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. 511 p.
3. Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death // Nat. Med. 2000. 6. 513–519.
4. Danial N.N., Korsmeyer S.J. Cell death: critical control points // Cell. 2004. 116. 205–219.
5. Green D.R., Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death // Science. 2004. 305. 626–629.
6. Jacobson M.D., Burne J.F., Raff M.C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus // EMBO J. 1994. 13. 1899–1910.
7. Castedo M., Hirsch T., Susin S.A. et al. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis // J. Immunol. 1996. 157. 12–21.
8. Martin S.J., Finucane D.M., Amarante-Mendes G.P. et al. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity // J. Biol. Chem. 1996. 271. 28753–28756.
9. Birka C., Lang A.P., Kempe S.D. et al. Enhanced susceptibility to erythrocyte «apoptosis» following phosphate depletion // Eur. J. Physiol. 2004. 448. 471–477.
10. Perrotta P.L., Perrotta C.L., Snyder E.L. Apoptotic activity in stored human platelets // Transfusion. 2003. 43. 526–535.
11. Rand M.L., Wang H., Bang K.W. et al. Procoagulant surface exposure and apoptosis in rabbit platelets: association with shortened survival and steady-state senescence // J. Thromb. Haemost. 2004. 2. 651–659.
12. Leytin V., Mykhaylov S., Starkey A.F. et al. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-GPIIb-induced platelet apoptosis in a murine model of ITP // Br. J. Haematol. 2006. 133. 78–82.
13. Kleiman N.S., Freedman J.E., Tracy P.B. et al. Platelets: developmental biology, physiology, and translatable platforms for preclinical investigation and drug development // Platelets. 2008. 19. 239–251.
14. Vanags D.M., Orrenius S., Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis // Br. J. Haematol. 1997. 99. 824–831.
15. Shcherbina A., Remold-O'Donnell E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses // Blood. 1999. 93. 4222–4231.
16. Wolf B.B., Goldstein J.C., Stennicke H.R. et al. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation // Blood. 1999. 94. 1683–1692.
17. Li J., Xia Y., Bertino A.M. et al. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage // Transfusion. 2000. 40. 1320–1329.

18. Bertino A.M., Qi X.Q., Li J. et al. Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37 °C // *Transfusion*. 2003. 43. 857–866.
19. Leytin V., Allen D.J., Mykhaylov S. et al. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. 320. 303–310.
20. Leytin V., Allen D.J., Mykhaylov S. et al. Thrombin-triggered platelet apoptosis // *J. Thromb. Haemost.* 2006. 4. 2656–2663.
21. Pereira J., Soto M., Palomo I. et al. Platelet aging in vivo is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs // *Thromb. Haemost.* 2002. 87. 905–909.
22. Leytin V., Mutlu A., Mykhaylov S. et al. The GPIIb/IIIa antagonist drugs eptifibatid and tirofiban do not induce activation of apoptosis executioner caspase-3 in resting platelets but inhibit caspase-3 activation in platelets stimulated with thrombin or calcium ionophore A23187 // *Haematologica*. 2009. 94. 1783–1784.
23. Lin K.H., Chang H.C., Lu W.J. et al. Comparison of the relative activities of inducing platelet apoptosis stimulated by various platelet-activating agents // *Platelets*. 2009. 20. (8). 575–581.
24. Mann K.G., Brummel K., Butenas S. What is all that thrombin for? // *J. Thromb. Haemost.* 2003. 1. 1504–1514.
25. Brummel-Ziedins K.E., Pouliot R.L., Mann K.G. Thrombin generation: phenotypic quantitation // *J. Thromb. Haemost.* 2004. 2. 281–288.
26. Flynn A.N., Buret A.G. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis // *Apoptosis*. 2004. 9. 729–737.
27. Zain J., Huang Y.Q., Feng X. et al. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells // *Blood*. 2000. 95. 3133–3138.
28. Leytin V., Allen D.J., Lyubimov E., Freedman J. Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation // *Br. J. Haematol.* 2007. 136. (5). 762–764.
29. Rink T.J., Sage S.O. Calcium signalling in human platelets // *Annu. Rev. Physiol.* 1990. 52. 431–439.
30. Rosado J.A., Sage S.O. Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets // *J. Physiol.* 2000. 529. 159–169.
31. Amor N.B., Pariente J.A., Salido G.M. et al. Thrombin-induced caspases 3 and 9 translocation to the cytoskeleton is independent of changes in cytosolic calcium in human platelets // *Blood. Cell Mol. Dis.* 2006. 36. 392–401.
32. Ben Amor N., Pariente J.A., Salido G.M., Bartegi A., Rosado J.A. Caspases 3 and 9 are translocated to the cytoskeleton and activated by thrombin in human platelets. Evidence for the involvement of PKC and the actin filament polymerization // *Cell Signal*. 2006. 18. 1252–1261.
33. Nozawa Y., Nakashima S., Nagata K. Phospholipid-mediated signaling in receptor activation of human platelets // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. 1082. 219–238.
34. Brunati A.M., Deana R., Folda A. et al. Thrombin-induced tyrosine phosphorylation of HS1 in human platelets is sequentially catalyzed by Syk and Lyn tyrosine kinases and associated with the cellular migration of the protein // *J. Biol. Chem.* 2005. 280. 21029–21035.
35. Coughlin S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology // *J. Thromb. Haemost.* 2005. 3. 1800–14.
36. Cheung W.M., D'Andrea M.R., Andrade-Gordon P., Damiano B.P. Altered vascular injury responses in mice deficient in protease-activated receptor-1 // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999. 19. 3014–3024.
37. Takada M., Tanaka H., Yamada T. et al. Antibody to thrombin receptor inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation without causing inhibition of platelet aggregation or altering hemostatic parameters after angioplasty in rat // *Circ. Res.* 1998. 82. (9). 980–987.
38. Andrade-Gordon P., Derian C.K., Maryanoff B.E. et al. Administration of a potent antagonist of protease-activated receptor-1 (PAR-1) attenuates vascular restenosis following balloon angioplasty in rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. 298. 34–42.
39. Rosado J.A., Lypez J.J., Gymez-Arteta E. et al. Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function // *J. Cell Physiol.* 2006. 209. 142–152.
40. Блохин Д.Ю. Программированная гибель клеток: путь от индукции до исполнения // *Патогенез*. 2003. (2). 25–33.
41. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis // *Mol. Cell*. 2002. 9. (3). 459–470.
42. Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R. et al. An induced proximity model for caspase-8 activation // *J. Biol. Chem.* 1998. 273. (5). 2926–2930.
43. Guyer K.E. The present state of aspirin and clopidogrel resistance // *Hamostaseologie*. 2009. 29. (3). 285–290.
44. Pinto Slottow T.L., Bonello L., Gavini R. et al. Prevalence of aspirin and clopidogrel resistance among patients with and without drug-eluting stent thrombosis // *Am. J. Cardiol.* 2009. 104. (4). 525–530.

45. Ben-Dor I., Kleiman N.S., Lev E. Assessment, mechanisms, and clinical implication of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy // *Am. J. Cardiol.* 2009. 104. (2). 227–233.
46. Remy J.L., Bonvini R.F., Barazer I. et al. The concept of aspirin «resistance». Mechanisms and clinical relevance // *Rev. Med. Inteme.* 2009. 30. (12). 1020–1029.
47. Steinhubl S.R., Berger P.B., Mann J.T. et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial // *JAMA.* 2002. 288. (19). 2411–2412.
48. Kumar A., Kao J. Platelet resistance to antiplatelet drugs // *Recent Pat Cardiovasc. Drug Discov.* 2009. 4. (2). 98–108.
49. Kuliczowski W., Witkowski A., Polonski L. et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs. A position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology // *Eur. Heart J.* 2009. 30. (4). 426–435.
50. Daleke D.L., Lyles J.V. Identification and purification of aminophospholipid flippases // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. 1486. 108–127.
51. Zamzami N., Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. 2. 67–71.
52. Zamzami N., Kroemer G. Methods to measure membrane potential and permeability transition in the mitochondria during apoptosis // *Methods Mol. Biol.* 2004. 282. 103–115.
53. Ly J.D., Grubb D.R., Lawen A. The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis: an update // *Apoptosis.* 2003. 8. 115–128.
54. Remenyi G., Szasz R., Friese P., Dale G.L. Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. 25. 467–471.
55. Leytin V., Allen D.J., Mutlul A. et al. Mitochondrial control of platelet apoptosis. effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore // *Lab. Invest.* 2009. 89. 374–384.
56. Leung R., Gwozdz A.M., Wang H. et al. Persistence of procoagulant surface expression on activated human platelets. involvement of apoptosis and aminophospholipid translocase activity // *J. Thromb. Haemost.* 2007. 5. (3). 560–570.
57. Alberio L., Safa O., Clemetson K.J. et al. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin // *Blood.* 2000. 95. 1694–1702.
58. Dale G.L., Friese P., Batar P. et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface // *Nature.* 2002. 415. 175–179.
59. Котова Я.Н., Костанова Е.А., Розенфельд М.А. и др. Влияние ингибиторов цистеиновых протеиназ на тромбоцитарное и плазменное звенья системы свертывания крови // *Биол. мембраны.* 2009. 26. (5). 1–7.
60. Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A. Coated platelets formation is regulated by the dense granule secretion of ADP acting via the P2Y12 receptor // *J. Thromb. Haemost.* 2008. 6. 1603–1605.
61. London F.S., Marcinkiewicz M., Walsh P.N. A subpopulation of platelets respon to thrombin- or SFLLRN-stimulation with binding sites for factor IXa // *J. Biol. Chem.* 2004. 279. (19). 19854–19859.
62. Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J. et al. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex // *J. Thromb. Haemost.* 2005. 3. (11). 2545–53.
63. Jobe S.M., Leo L., Eastvold J.S., Dickneite G. et al. Role of FcRgamma and factor XIIIa in coated platelet formation // *Blood.* 2005. 106. (13). 4146–4151.
64. Remenyi G., Szasz R., Friese P., Dale G.L. Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. 25. (2). 467–471.
65. Rand J.H., Wu X., Andree H.A.M. et al. Anti-phospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting annexin-V binding to phospholipids: a «lupus procoagulant» phenomenon // *Blood.* 1998. 5. 1652–1660.
66. Van Heerde W.L., De Groot P.G., Reutelingsperger C.P.M. The complexity of the phospholipid binding protein ANV // *Thromb. Haemost.* 1995. 73. 172–179.
67. Gerke V., Moss S.E. Annexins: from structure to function // *Physiol. Rev.* 2002. 82. 331–371.
68. Rand J.H. «Annexinopathies» a new class of diseases // *N. Engl. J. Med.* 1999. 340. 1035–1036.
69. Van Ryn McKenna J., Merk H., Muller T.H. et al. The effect of heparin and annexin V on fibrin accretion after injury in the jugular vein of rabbits // *Thromb. Haemost.* 1993. 69. 227–230.
70. Van Heerde W.L., Sakariassen K.S., Hemker H.C. et al. ANV inhibits the procoagulant activity of matrices of TNF-stimulated endothelium under flow conditions // *Arterioscler. Thromb.* 1994. 14. 824–830.
71. Rodriguez-Garcia M.I., Fernandez J.A., Rodriguez A. et al. ANV auto antibodies in rheumatoid

- arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* 1996. 55. (12). 895–900.
72. *Kaburaki J., Kuwana M., Yamamoto M. et al.* Clinical significance of anti-ANV antibodies in patients with systemic lupus erythematosus // *Am. J. Hematol.* 1997. 54. 209–213.
73. *Reutelingsperger C.P., van Heerde W.L.* ANV, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis // *Cell. Mol. Life. Sci.* 1997. 53. 527–532.
74. *Ogawa H., Zhao D., Dlott J.S. et al.* Elevated anti-ANV antibody levels in antiphospholipid syndrome and their involvement in antiphospholipid antibody specificities // *Am. J. Clin. Pathol.* 2000. 114. 619–628.
75. *Lakos G., Kiss E., Regeczy N., Tarjan P. et al.* Antiprothrombin and antiannexin V antibodies imply risk of thrombosis in patients with systemic autoimmune diseases // *J. Rheumatol.* 2000. 27. 924–949.
76. *Gaspersic N., Rot U., Cucnik S. et al.* Antiannexin V antibodies in patients with cerebrovascular disease // *Ann. Rheum. Dis.* 2003. 62. 188–189.
77. *Nakamura N., Shidara Y., Kawaguchi N. et al.* Lupus anticoagulant autoantibody induces apoptosis in umbilical vein endothelial cells. involvement of ANV // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. 205. 1488–1493.
78. *Cederholm A., Svenungsson E., Jensen-Urstad K. et al.* Decreased binding of annexin V to endothelial cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. 25. 198–203.
79. *Kaneko N., Matsuda R., Hosoda S. et al.* Measurement of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction // *Clin. Chim. Acta.* 1996. 251. 65–80.
80. *Roldan V., Marin F., Pineda J. et al.* Annexin V levels in survivors of early myocardial infarction // *Rev. Esp. Cardiol.* 2002. 55. 1230–1234.
81. *Shojaie M., Sotoodah A., Roozmeh S. et al.* Annexin V and anti-annexin V antibodies: two interesting aspects in acute myocardial infarction // *Thromb. J.* 2009. 7. 13.
82. *Васина Л.В.* Аннексин А5 и антитела к аннексину А5 при остром коронарном синдроме с подъемом и без подъема сегмента ST // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2009. (2). 22–25.
83. *Петрищев Н.Н., Васина Л.В.* Эндогенные механизмы, препятствующие апоптозу эндотелия при атеросклерозе // Естественные и технические науки. 2008. (4). 116–126.
84. *Jacobson M.D., Raff M.C.* Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen // *Nature.* 1995. 374. 814–816.
85. *Скулачев В.П.* В своем межмембранном пространстве митохондрия таит «белок самоубийства», который, выйдя в цитозоль, вызывает апоптоз (обзор) // *Биохимия.* 1996. 61. (11). 2060–2063.
86. *Брюне Б., Сандау К., фон Кнетен А.* Апоптотическая гибель клеток и оксид азота. Механизмы активации и антагонистические сигнальные пути // *Биохимия.* 1998. 63. (7). 966–975.
87. *Мальшиев И.Ю., Манухина Е.Б.* Стресс, адаптация и оксид азота // *Биохимия Biochemistry.* 1998. 63. (7). 992–1006.
88. *Тейлор Б.С., Аларсон Л.Х., Биллиар Т.Р.* Индуцибельная синтаза оксида азота в печени. Регуляция и функции // *Биохимия.* 1998. 63. (7). 905–923.
89. *Rossig L., Haendeler J., Hermann C. et al.* Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels. involvement in endothelial cell protection from apoptosis // *J. Biol. Chem.* 2000. 275. 25502–25507.
90. *Moriya R., Uehara T., Nomura Y.* Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells // *FEBS Lett.* 2000. 484. 253–260.
91. *Borutaite V., Morkuniene R., Brown G.C.* Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms // *FEBS Lett.* 2000. 467. 155–159.
92. *Hortelano S., Dallaporta B., Zamzami N. et al.* Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition // *FEBS Lett.* 1997. 410. 373–377.
93. *Balakirev M.Yu., Khramtsov V.V., Zimmer G.* Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide // *Eur. J. Biochem.* 1997. 246. 710–718.
94. *Rukoyatkina N., Walter U., Gambaryan S.* NO inhibits platelet apoptosis by cGMP-dependent and-independent pathways // *BMC Pharmacol.* 2009. 9. (Suppl. 1). 60.
95. *Wachowicz B., Rywaniak J.Z., Nowak P.* Apoptotic markers in human blood platelets treated with peroxyxynitrite // *Platelets.* 2008. 19. (8). 624–635.
96. *Lopez J.J., Salido G.M., Gomez-Arteta E. et al.* Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets // *J. Thromb. Haemost.* 2007. 5. (6). 1283–1291.
97. *Bjorkerud S., Bjorkerud B.* Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability // *Am. J. Pathol.* 1996. 149. (2). 367–380.
98. *Hardwick S.J., Hegvi L., Clare K. et al.* Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein // *J. Pathol.* 1996. 179. (3). 294–302.

99. Joving S., Crisby M., Thyberg J., Nilsson J. DNA fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997. 17. (10). 2225–2231.

100. Escargueil-Blanc I., Meilhac O., Pieraggi M.T. et al. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurointricarboxylic acid // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997. 17. (2). 331–339.

101. Papassotiropoulos A., Ludwig M., Naib-Majani W., Rao G.S. Induction of apoptosis and second-

ary necrosis in rat dorsal root ganglion cell cultures by oxidized low density lipoprotein // *Neurosci. Lett.* 1996. 209. (1). 33–36.

102. Sener A., Ozsavci D., Oba R. et al. Do platelet apoptosis, activation, aggregation, lipid peroxidation and platelet-leukocyte aggregate formation occur simultaneously in hyperlipidemia? // *Clin. Biochem.* 2005. 38. (12). 1081–1087.

103. Yeh J.J., Tsai S., Wu D.C. et al. P-selectin-dependent platelet aggregation and apoptosis may explain the decrease in platelet count during *Helicobacter pylori* infection // *Blood.* 2010. 115. (21). 4247–4253.

PLATELET APOPTOSIS. ON THE ISSUE OF FACTORS OF INSUFFICIENT ANTIPLATELET DRUG EFFECTIVENESS

Gelena Anatol'evna BEREZOVSAYA

*FSBI «Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre n.a. V.A.Almazov»
of Ministry of Health and Social Development of the RF
197341, Saint Petersburg, Akkuratov str., 2*

Increased platelet aggregation is the bases for the pathogenesis of many diseases. However, it's not always possible to overcome platelets hyperaggregation and to prevent the development of thrombotic complications using antiplatelet drugs. This article focuses on apoptosis of platelets, which are supposed to be regarded as unaccounted factor of platelets activation and as a new predictor of complications with coronary heart diseases patients, and its mechanisms – as a new target for antiplatelet drugs.

Key words: apoptosis, platelets, aggregation, thrombin, caspase, phosphatidyl serine, annexin V.

Berezovskaya G.A. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of acute coronary syndrome, e-mail: berezovgel@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ГИСТОХРОМА НА ЭКССУДАТИВНУЮ И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ ФАЗЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Ольга Сергеевна ТАЛАЛАЕВА¹, Наталья Петровна МИЩЕНКО²,
Валерий Михайлович БРЮХАНОВ¹, Яков Федорович ЗВЕРЕВ¹,
Сергей Александрович ФЕДОРЕЕВ², Вячеслав Витальевич ЛАМПАТОВ¹,
Александр Юрьевич ЖАРИКОВ¹

¹ ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

² Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН
690022, г. Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159

В опытах *in vivo* изучено влияние длительного введения препарата гистохром на разные стадии процесса воспаления. Антиэкссудативное действие изучали на модели острого воспалительного отека лапы крысы, индуцированного введением под плантарный апоневроз правой задней конечности животного 0,1 мл 1%-го раствора каррагинана, влияние на течение пролиферативной фазы воспаления – на модели хлопчатобумажной гранулемы. Животным подопытных групп в течение 12 дней подкожно вводили гистохром в дозе 10 мг/кг. Контрольные крысы получали эквивалентные количества воды. Экспериментально показано, что превентивное применение 10 мг/кг гистохрома подавляло формирование воспалительного отека лапы крысы на 58,5 % уже через час после введения каррагинана. Антиэкссудативное действие препарата сохранялось на высоком уровне в течение двух часов эксперимента и несколько ослабевало к концу периода наблюдения. Выявленный эффект гистохрома сопоставим с действием ряда классических нестероидных противовоспалительных средств, и может быть обусловлен его вмешательством в пусковые механизмы воспалительного процесса. Пролиферативную фазу воспаления гистохром не угнетает и, таким образом, не оказывает существенного влияния на течение хронического воспалительного процесса.

Ключевые слова: гистохром, противовоспалительное действие.

В последние десятилетия большое внимание уделяется созданию лекарственных препаратов на основе веществ природного происхождения. Интерес к таким соединениям обусловлен их относительно высокой биологической активностью и низкой токсичностью для организма человека. Выявление и экспериментальное обоснование новых свойств природных эффекторов является важным звеном фармакологических исследований.

С этих позиций перспективным соединением представляется хиноидный пигмент морских беспозвоночных эхинохром (2,3,5,6,8-пентагидроксил-7-этил-1,4-нафтахинон). При изучении физико-химических свойств этого спинохрома было установлено, что, блокируя различные

свободнорадикальные реакции, эхинохром оказывает мощный антиоксидантный эффект. В Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН была разработана водорастворимая лекарственная форма эхинохрома — гистохром. Гистохром дал возможность активной молекуле проникать непосредственно к клеточной мишени, открывая новые возможности для лечения целого ряда заболеваний [1–3]. В частности, клинические испытания препарата в ведущих кардиологических учреждениях страны выявили его выраженный терапевтический эффект при ишемической болезни сердца и острым инфаркте миокарда [1, 3–5].

Вместе с тем опыт применения гистохрома в офтальмологической практике показал, что

Талалаева О.С. – к.м.н., ассистент кафедры фармакологии, e-mail: talalaeva_olga@mail.ru

Мищенко Н.П. – к.х.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: mischenkonp@mail.ru

Брюханов В.М. – д.м.н., проф., ректор

Зверев Я.Ф. – д.м.н., проф. кафедры фармакологии, e-mail: zver@asmu.ru

Федореев С.А. – д.х.н., зав. лабораторией

Лампатов В.В. – д.б.н., проф. кафедры фармакологии

Жариков А.Ю. – к.б.н., доцент кафедры фармакологии

препарат не только стимулирует репаративные и метаболические процессы в структурах глаза, но и способствует рассасыванию гемофтальмов различной локализации, уменьшает отек стромы роговицы и сетчатки. Более того, был выявлен выраженный терапевтический эффект гистохрома при комплексном лечении ряда воспалительных заболеваний глаз [2, 3, 6, 7].

Это позволило нам предположить наличие возможного противовоспалительного действия гистохрома, и целью данного исследования стало изучение влияния гистохрома на экссудативную и пролиферативную фазы воспаления.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали препарат «Гистохром, раствор для внутривенного введения 1 %» (Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток).

Для оценки противовоспалительной активности гистохрома определяли его влияние на разные стадии процесса воспаления [8, 9]. Эксперименты выполнены на крысах линии Wistar массой 180–210 г. Режим дозирования и схема введения гистохрома подопытным животным основаны на традиционных методах применения растительных противовоспалительных средств, так как эхинохром представляет собой вещество природного происхождения. При этом были учтены особенности курсового применения гистохрома в практической медицине.

Антиэкссудативное действие изучали на модели острого воспалительного отека лапы крысы, индуцированного введением под плантарный апоневроз правой задней конечности животного 0,1 мл 1%-го раствора каррагинана. Предварительно подопытным животным в течение 12 дней подкожно вводили гистохром в дозе 10 мг/кг ($n = 16$). Измерение объема правой задней конечности проводили с помощью плетизмометра через 60, 120 и 240 минут после введения флогистика. Животные контрольной группы на протяжении 12 дней вместо препарата получали эквивалентное количество воды ($n = 18$). На основании данных среднего прироста объема конечности животных, полученных в результате трех параллельных измерений, рассчитывали степень противовоспалительной активности (X) по формуле: $X = ((P_k - P_0)/P_k) \times 100 \%$, где P_k – средний прирост объема конечности в контроле, P_0 – средний прирост объема конечности в опыте. Если величина X превышает 30 %, то, как принято считать, препарат обладает выраженным противовоспалительным действием.

Влияние гистохрома на течение пролиферативной фазы воспаления изучали на модели хлопчатобумажной гранулемы. Наркотизированным крысам в асептических условиях имплантировали стерильные хлопчатобумажные тампоны массой 20 мг. Ежедневно, начиная со дня операции, на протяжении 12 дней прооперированные животные подопытной группы получали гистохром в дозе 10 мг/кг подкожно ($n = 18$). Контрольные крысы получали эквивалентное количество воды ($n = 18$). По окончании курса введения препарата марлевые имплантаты с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью извлекали и определяли массу влажной и высушенной до постоянной массы гранулемы. Массу грануляционно-фиброзной ткани определяли по разнице между массой образовавшейся гранулемы и массой марлевого имплантата (20 мг). Разницу между влажной и сухой массами гранулемы оценивали как экссудативный компонент воспалительной реакции [9].

Умерщвление подопытных животных производили передозировкой эфирного наркоза с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (Страсбург, 1986 г.), и в соответствии с Федеральным законом Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997.

Полученные результаты подвергали статистической обработке методом вариационных рядов, вычисляли среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментально установлено, что уже через 60 мин после введения каррагинана объем конечности в контрольной группе крыс увеличился на $0,53 \pm 0,061 \text{ см}^3$ ($p < 0,001$) (табл. 1). При этом максимальный объем лапы определялся через 4 ч после введения флогистика. Так, если исходный объем конечности контрольных животных составлял в среднем $1,31 \pm 0,038 \text{ см}^3$, то к концу периода наблюдения этот показатель возрос почти в 1,7 раза, составив $2,39 \pm 0,037 \text{ см}^3$ ($p < 0,001$). В этих условиях превентивное применение гистохрома существенно подавляло формирование воспалительного отека лапы крыс. Из табл. 1 видно, что эффект препарата достигал максимума уже через 1 ч после инъек-

Таблица 1

Влияние длительного введения гистохрома на формирование каррагинанового отека правой задней конечности крыс

Время после инъекции каррагинана, ч	Показатель	Контроль	Гистохром
1	Прирост, см ³	0,53 ± 0,061*	0,22 ± 0,031*
	Противовоспалительная активность, %	–	<u>58,5</u>
2	Прирост, см ³	0,85 ± 0,046*	0,41 ± 0,054*
	Противовоспалительная активность, %	–	<u>51,8</u>
4	Прирост, см ³	1,08 ± 0,046*	0,80 ± 0,076*
	Противовоспалительная активность, %	–	25,9

Примечание: Звездочкой обозначены достоверные отличия от величины исходных показателей соответствующей группы; подчеркнуты цифры, отражающие выраженную противовоспалительную активность.

ции каррагинана, когда его антиэкссудативная активность составила 58,5 %. Интересно, что выявленный эффект гистохрома сопоставим с действием таких классических нестероидных противовоспалительных средств, как ацетилсалициловая кислота или диклофенак [10–12]. Антиэкссудативное действие гистохрома сохранялось на высоком уровне в течение двух часов эксперимента, а затем несколько ослабевало.

Известно, что процесс формирования каррагинанового отека в течение первого часа связан с дегрануляцией тучных клеток и высвобождением таких медиаторов воспаления, как гистамин и серотонин. В последующие 60 мин флогенный эффект поддерживается накапливающимся в очаге воспаления брадикинином, а после этого – простагландинами типа E [13]. Учитывая эффективность гистохрома в период энергичного нарастания отека, можно предположить его вмешательство в пусковые механизмы воспалительного процесса. Не исключено, что препарат не только угнетает сосудистый компонент воспаления, но, стабилизируя мембраны тучных клеток, препятствует их дегрануляции.

При изучении антипролиферативных свойств установлено, что в данных экспериментальных условиях гистохром не оказывал существенного влияния на пролиферативный компонент воспаления, хотя во всех экспериментах выявлена тенденция к ослаблению воспалительной реакции. Из табл. 2 видно, что

Таблица 2

Влияние длительного введения гистохрома на формирование хлопчатобумажной гранулемы у крыс

Показатель	Контроль	Гистохром
Влажная масса, мг	94 ± 5,8	82 ± 3,7
Сухая масса, мг	14,9 ± 1,07	12,6 ± 0,92
Разность, мг	79 ± 4,8	69 ± 3,1

масса сухой и влажной воспалительной гранулемы, равно как и разность между ними, достоверно не отличались от таковой у контрольной группы животных, не получавших гистохром.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обнаруженное в эксперименте угнетение экссудативной стадии воспаления под действием гистохрома указывает на его эффективность при остром воспалении и является предпосылкой для расширения терапевтического использования препарата. В частности, превентивное применение гистохрома может стать полезным в процессе фармакологической подготовки больных перед хирургическим вмешательством для профилактики послеоперационного асептического воспаления. Превентивное введение нестероидных противовоспалительных средств с этой целью ограничивают их многочисленные побочные эффекты.

Вместе с тем отсутствие эффекта на пролиферативную фазу воспаления позволяет заключить, что в данных экспериментальных условиях гистохром не оказывает существенного влияния на течение хронического воспалительного процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пат. 2137472 РФ. Лекарственный препарат «Гистохром» для лечения острого инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца / Г.Б. Еляков, О.Б. Максимов, Н.П. Мищенко и др.; опубл. 20.09.1999.
2. Пат. 2134107 РФ. Препарат «Гистохром» для лечения воспалительных заболеваний сетчатки и роговицы глаз / Г.Б. Еляков, О.Б. Максимов, Н.П. Мищенко и др.; опубл. 10.08.1999.
3. Мищенко Н.П., Федорев С.А., Догадова Л.П. Препарат гистохром для офтальмологии // Вестн. ДВО РАН. 2004. (3). 111–119.

4. Закирова А.Н., Иванова М.В., Голубятников В.Б. и др. Фармакокинетика и клиническая эффективность гистохрома у больных острым инфарктом миокарда // Эксперим. клин. фармакол. 1997. 60. (4). 21–24.

5. Закирова А.Н., Лебедев А.В., Кухарчук В.В. и др. Антиоксидант гистохром: влияние на перекисное окисление липидов и реологические свойства крови у больных нестабильной стенокардией // Тер. архив. 1996. (8). 12–14.

6. Красногорская В.Н., Басинский С.Н., Басинский А.С. Клинические результаты применения транскориоидального введения гистохрома при лечении дистрофических заболеваний сетчатки // Рус. мед. журн. 2007. 8. (1). 3–5.

7. Полунин Г.С., Воробьева О.К., Макашова Н.В. и др. Опыт применения препарата гистохром в офтальмологической практике // Рефракц. хирургия офтальмол. 2003. 3. (2). 23–28.

8. Тихомирова С.В., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф. и др. Антиоксидантное действие сбора

лекарственных растений, применяемого при экспериментальном гломерулонефрите // Нефрология. 2004. 8. (2). 155–156.

9. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005. 832 с.

10. Кац Д.В., Егоров А.Е., Егорова Т.Е. Противовоспалительный эффект 0,1% раствора диклофенака натрия при лазерных офтальмологических вмешательствах у пациентов с глаукомой // Рус. мед. журн. 2008. 9. (2). 57–61.

11. Мазуров В.И., Якушева В.А. Диклофенак натрия в терапевтической практике // Рус. мед. журн. 2004. 12. (12). 712–715.

12. Насонов Е.Л. Нестероидные противовоспалительные препараты // Рус. мед. журн. 1999. 7. (8). 9–12.

13. Дыгай А.М., Клименко Н.А. Воспаление и гемопоз. Томск, 1992. 276 с.

THE INFLUENCE OF HISTOCHROME ON EXUDATIVE AND PROLIFERATIVE PHASES OF THE EXPERIMENTAL INFLAMMATION

Olga Sergeevna TALALAEVA¹, Natalia Petrovna MISHCHENKO²,
Valery Mikhailovich BRYUKHANOV¹, Yakov Fjodorovich ZVEREV¹,
Sergey Aleksandrovich FEDOREYEV², Vjacheslav Vitalevich LAMPATOV¹,
Aleksandr Yurevich ZHARIKOV¹

¹Altai State Medical University of Roszdrav, 656038, Barnaul, Lenin av., 40

²Pacific ocean's Institute of Bioorganic Chemistry FWB RAN
690022, Vladivostok, 100 years of Vladivostok av., 159

In experiences *in vivo* influence of long introduction of a preparation histochrom on different stages of process of an inflammation was investigated. Antiexudative action was studied on model of a sharp inflammatory hypostasis of a paw of the rat, induced by introduction under plantar aponeurosis the right back finiteness with animal 0.1 ml of 1 % carrageenan solution. The histochrome's effect on current proliferative phases of an inflammation was studied on model cotton granulomas. Animal of experimental groups within 12 days hypodermically entered histochrom in a doze of 10 mg/kg. Control rats received the same quantities of water. It was experimentally shown, that preliminary application of 10 mg/kg histochrom suppressed formation of an inflammatory hypostasis of a paw of rats on 58.5 % in one hour after carrageenan injection. Antiexudative action of the preparation was kept at a high level within two hours of experiment and weakened by the end of the period of supervision a little. The revealed effect of histochrom is comparable with the action of some classical nonsteroid anti-inflammatory agents, and can be caused by his intervention in starting mechanisms of inflammatory process. Proliferative phase of an inflammation by histochrom does not oppress and, thus, does not render essential influence on current of chronic inflammatory process.

Key words: histochrome, antiinflammatory action.

Talalaeva O.S. – candidate of medical sciences, assistant of the chair of pharmacology,
e-mail: talalaeva_olga@mail.ru

Mishchenko N.P. – candidate of chemical sciences, e-mail: mischenkonp@mail.ru

Bryukhanov V.M. – doctor of medical sciences, professor; rector

Zverev Ya.F. – doctor of medical science, professor of the chair for pharmacology, e-mail: zver@asmu.ru

Fedoreyev S.A. – doctor of chemical sciences, head of the laboratory

Lampatov V.V. – doctor of biological sciences, professor of the chair for pharmacology

Zharikov A.Yu. – candidate of biological sciences, assistant professor of the chair for pharmacology

ПРИМЕНЕНИЕ ЦИКЛОФОСФАНА ДЛЯ ОГРАНИЧЕНИЯ РОСТА КАРЦИНОСАРКОМЫ WALKER 256 У КРЫС УСУГУБЛЯЕТ ПАРАНЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ПЕЧЕНИ

Анатолий Васильевич ЕФРЕМОВ, Татьяна Анатольевна КУНЦ,
Елена Владимировна ОВСЯНКО, Ирина Юрьевна ИЩЕНКО,
Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА

ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

В печени крыс с карциносаркомой Walker 256 через 7 суток после введения циклофосфана выявлены показатели лизиса и некробиоза клеток паренхимы и стромы. В части клеток отмечены компенсаторно-приспособительные перестройки и развитие апоптоза. Сочетанные воздействия паранеопластических факторов и циклофосфана усиливают субклеточные проявления синусоидального обструктивного синдрома, вызванного действием циклофосфана. Ультраструктурные особенности паренхиматозных клеток отражают нарастание функционального ответа печени через запуск детоксикационных механизмов в гепатоцитах с развитой агранулярной цитоплазматической сетью.

Ключевые слова: печень, ультраструктура, карциносаркома Walker 256, циклофосфан.

Развитие опухоли сопровождается синдромом эндогенной интоксикации, обусловленным распадом опухолевых клеток и выделением паранеопластических токсических продуктов, разносимых током крови по организму и повреждающих мембраны нормальных клеток [1, 2]. Это приводит к системному нарушению обменных, иммунных и регуляторных функций организма, метаболических и адаптационных функций печени – центрального органа гомеостаза, обезвреживающего токсические вещества, в том числе и цитостатики. Применяемый в экспериментальной и клинической практике циклофосфан заметно тормозит рост злокачественных опухолей, в частности, карциносаркомы Walker 256, однако его метаболиты оказывают на печень побочные эффекты, вызывая синусоидальный обструктивный синдром в связи с нарушением обмена глутатиона в клетках эндотелия печени [3] и снижением в них активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы [4]. Анализ литературы,

посвященный ультраструктурным изменениям клеток печени при действии циклофосфана и карциносаркомы Walker 256, показал фрагментарность и недостаточную изученность этих вопросов на субклеточном уровне в плане исследования клеток, составляющих стромальный компартмент, особенностей синусоидальных и перисинусоидальных пространств на фоне изменений микроциркуляции и фиброзирования. Целью настоящего исследования явилось изучение ультраструктурных преобразований в сосудистом русле печени крыс на фоне сочетанных влияний паранеопластических факторов карциносаркомы Walker 256 и циклофосфана.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Крысам-самцам Wistar массой 180–200 г в мышцу бедра осуществляли трансплантацию 1×10^6 клеток карциносаркомы Walker 256 [5]. Циклофосфан («Биохимик», г. Саранск, Россия) вводили на 5-е сутки после перевивки опухоли однократно внутривентриально в дозе 25 мг/кг.

Ефремов А.В. — д.м.н., проф., член-кор. РАН, зав. кафедрой патофизиологии, заслуженный деятель науки РФ

Кунц Т.А. — научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ), e-mail: tkunts@ngs.ru

Овсянко Е.В. — к.м.н., доцент кафедры анатомии, гистологии, биологии стоматологического факультета

Ищенко И.Ю. — к.б.н., научный сотрудник ЦНИЛ

Пустоветова М.Г. — д.м.н., проф., зав. ЦНИЛ

Образцы печени для исследования забирали спустя 7 суток после введения препарата. В качестве контроля использовали крыс-опухоленосителей на 7-е сутки после перевивки опухоли и здоровых животных на 7-е сутки после введения циклофосфана. Все манипуляции с лабораторными животными проводились с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Для электронно-микроскопических исследований образцы печени фиксировали в 4 % параформальдегиде (Serva, Германия) на 0,1 М фосфатном буфере Миллонига (рН 7,4) при комнатной температуре в течение 2 ч с дополнительной дофиксацией в 1 % растворе четырехоксида осмия на том же буфере на льду в течение 1 ч. После дегидратации образцы заключали в эпоновую смесь и полимеризовали. Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие срезы (35–45 нм) получали на ультратоме LKB-8800 (Швеция). Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца, напыляли слоем углерода и изучали в электронном микроскопе JEM-100SX (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование полутонких срезов печени крыс с карциносаркомой Walker 256 спустя 7 суток после однократного введения циклофосфана показало расширение центральных и портальных вен, застойное полнокровие синусоидов, связанное со сладжированием эритроцитов, адгезированных к эндотелию совместно с гемолизированными эритроцитами, и появлением детрита разрушенных клеток, создающих obturационные комплексы, иногда закупоривающие просветы капилляров и способствующие гипоксии. Ухудшение трофики и оксигенации обусловлено в большей степени повреждающим действием факторов неспецифической эндогенной интоксикации (НЭИ) – протеолитических агентов и цитокинов, в первую очередь, фактора некроза опухоли, который вызывает деструкцию клеток, подавляя их пролиферацию [1]. Обнаружены цитолитические изменения эндотелиоцитов и клеток Купфера синусоидов с утратой участков плазмалеммы и выходом из них органоидов цитоплазмы, нередко заполняющих пространства капилляров.

Нами показано, что воздействие циклофосфана вызывало появление участков десквамации эндотелия синусоидов, приводя к нарушению гематопаренхиматозного барьера и открытию прямых контактов поверхностей гепатоцитов с

кровью (рис. 1, б), а некробиотические изменения эндотелиоцитов (рис. 2, а) подтверждали данные об индукции циклофосфаном синусоидального обструктивного синдрома, обусловленного гибелью части клеток синусоидальной выстилки [3]. Возможной причиной этого при воздействии метаболитов циклофосфана может быть подавление экспрессии белка профилина-1, связанного с примембранным актином, которое способствует появлению дефектов в мембранах этих клеток. Процесс десквамации и сегрегации эндотелиоцитов синусоидов при сочетанном воздействии факторов НЭИ и циклофосфана был выражен сильнее, что, очевидно, приводило к большей повреждаемости плазмалеммы гепатоцитов (см. рис. 2, в), так как участков синусоидов, лишенных синусоидальной выстилки, наблюдалось значительно больше, чем при раздельном воздействии повреждающих факторов НЭИ и циклофосфана.

Дистрофические и некротические изменения клеток паренхимы и стромы были локализованы в печеночных дольках от перипортальных до периферических зон, видимо, в связи с преимущественными повреждающими эффектами циклофосфана на клетки периферии долек – перипортальные зоны, а факторов НЭИ – на периферические зоны долек. Для части эндотелиоцитов застойных синусоидов были характерны черты апоптоза: конденсация хроматина ядер и уплотнение цитоплазмы (см. рис. 2, б). Показано, что причиной активации апоптозных триггеров – каспазы-3 и каспазы-9 – является гипоксия, которая способна повысить активность каспазы-3 в 30 раз в течение 5 ч [7].

По сравнению с другими группами, намного чаще выявлялись плазматические клетки и в синусоидах, и в пространствах Диссе (см. рис. 1, в). Известно, что появление в печени плазматических связано с иммунологическими сдвигами и циркуляцией противоопухолевых иммунных комплексов при росте злокачественных опухолей [1, 2]. Сам факт накопления в печени плазматических и их апоптотических изменений (см. рис. 1, в) объясняется наличием хемокинов из разрушенных клеток, привлекающих сюда лимфоциты, адгезивные взаимодействия которых с эндотелием приводят к апоптозу и гибели, что обеспечивает динамическое равновесие между производством и устранением «излишних» лимфоцитов [8].

Часть клеток Купфера обнаруживала признаки усиления фагоцитоза (см. рис. 1, а). Согласно литературным данным, активированные фагоциты печени стимулируют пролиферацию

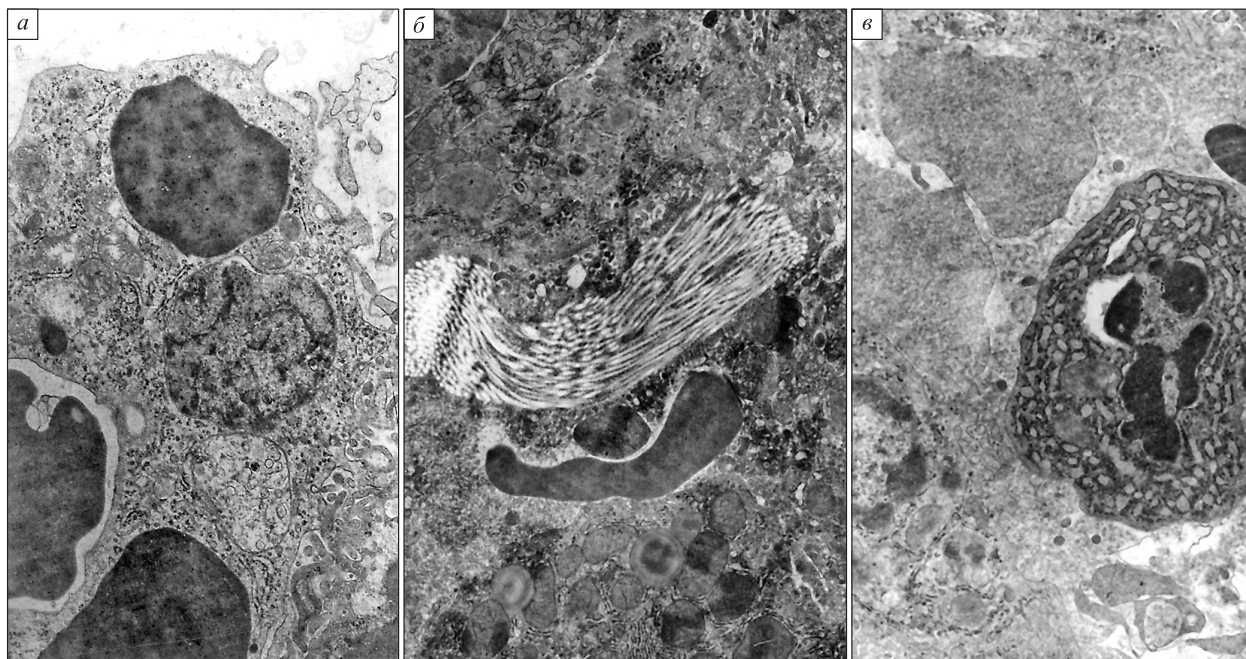


Рис. 1. Ультраструктурные изменения клеток печени крыс. а – фрагмент активированной клетки Купфера. В цитоплазме видны захваченные гемолизированные эритроциты и гетерофагосомы с клеточным детритом (7 сут после введения циклофосфана). Ув. 7000; б – обилие коллагена в пространстве Диссе, в котором видны эритроциты и клеточный детрит, проникшие туда из-за нарушения гематопаренхиматозного барьера; пространство застойного синусоида переполнено клеточным детритом, среди которого виден фрагмент плазматической клетки (опухоленосители через 7 сут после введения циклофосфана). Ув. 15000; в – часть застойного синусоида с гемолизированными эритроцитами, фибриноподобным материалом, клеточным детритом и апоптотным плазмоцитом (опухоленосители через 7 сут после введения циклофосфана). Ув. 15000

клеток Ито и их способность синтезировать коллаген [9], являясь причиной субэндотелиального фиброза, характерного для синусоидального obstructивного синдрома [3]. В печени опухоленосителей под действием циклофосфана наблюдалось выраженное переполнение пространств Диссе коллагеном, обусловленное высокой степенью трансдифференциации клеток Ито.

Наряду с некробиотически поврежденными эндотелиоцитами, имеющими литические дефекты плазмалемм, в части синусоидов выявлялись укрупненные, активированные клетки эндотелия с развитыми цитоплазматическими органоидами, округлыми или фестончатыми очертаниями ядер, т. е. с увеличенной поверхностью ядер (см. рис. 2, з) – чертами, свойственными гипертрофированным клеткам. Показано, что эндотелиоциты приобретают подобные характеристики под воздействием эндотелиостимулирующего фактора (ESF), продуцируемого клетками карциносаркомы Walker 256 [10]. Цитируемые авторы показали, что этот фактор вызывает неспецифическую для клеточных типов эндотелия гипертрофию и способность к формированию дополнительных капиллярных пространств

в органах. Мы полагаем, что в рассматриваемой экспериментальной ситуации, когда имеют место обширные цитолитические повреждения эндотелия синусоидов, ESF мог выполнять ремодулирующую восстанавливающую функцию в печени. В ядрах гипертрофированных эндотелиоцитов нами обнаружены ядрышкоподобные гроздьевидные тельца, окруженные двойными мембранами (см. рис. 2, з), которых обычно не наблюдается вокруг ядрышек. Нам не удалось идентифицировать и интерпретировать эти тельца согласно имеющимся литературным источникам по ультраструктуре ядра, хотя сомнений не вызывает, что их появление связано с активацией функций эндотелия, направленной на восполнение функций утраченных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, воздействие циклофосфана с целью ограничения роста карциносаркомы Walker 256 на печень крыс-опухоленосителей отягощало субклеточные проявления некробиотических процессов, определяемых воздействием факторов НЭИ за счет суммирования их пов-

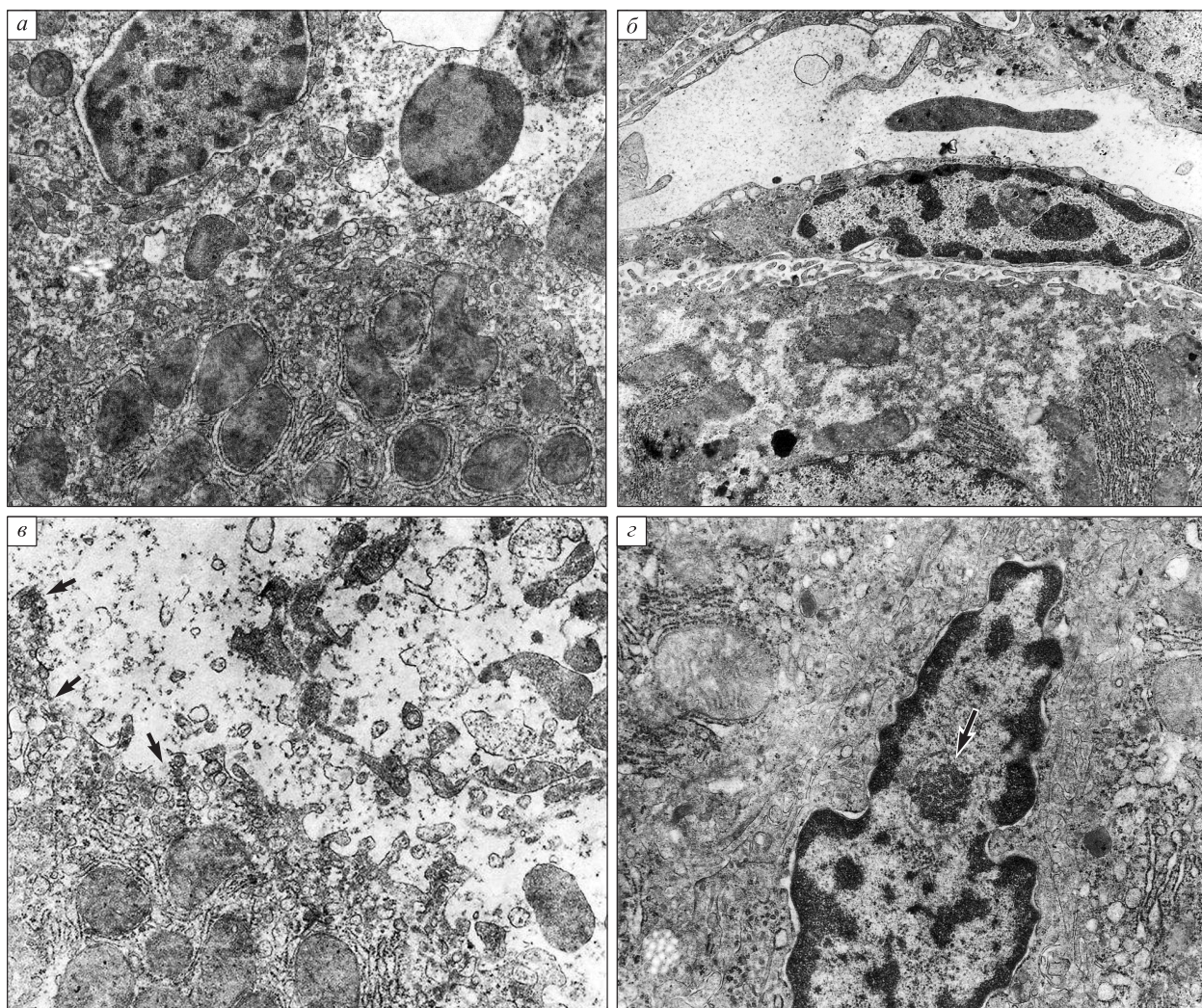


Рис. 2. Ультраструктурные изменения клеток печени крыс-опухоленосителей на 7-е сут после введения циклофосфана. а – некробиотически измененный эндотелиоцит (слева вверху) и лишенный эндотелиальной выстилки фрагмент гепатоцита с втягиваниями цитоплазматических отростков. Тени гемолизированных эритроцитов и цитоплазматический детрит разрушенных клеток контактируют с плазмалеммой гепатоцита. Ув. 18000; б – апоптотически измененный эндотелиоцит с конденсированным хроматином ядра и компактизованной цитоплазмой. Ув. 10000; в – в просвете синусоида видны фрагменты эндотелия после десквамации и сегрегации. В плазмалемме гепатоцита видны литические дефекты (стрелки). Ув. 15000; г – фрагмент активированного эндотелиоцита с увеличенной поверхностью ядра, в котором находится образование неясной природы, окруженное двойной мембраной (стрелка). В расширенных каналах гладкого эндоплазматического ретикулума гепатоцитов виден белковый материал. Ув. 9600

реждающих влияний на клетки стромы органа. В совокупности эти влияния усиливали проявления синусоидального обструктивного синдрома, вызываемого циклофосфаном. Обнаружены ультраструктурные признаки цитолитических процессов, вызывающие дефекты плазмалемм клеток, развитие апоптотических изменений клеток стромы. Наряду с этим отмечались субклеточные проявления компенсаторных и восстановительных процессов в эндотелиальных клетках синусоидов, выраженные в меньшей

мере, чем при раздельном влиянии метаболитов циклофосфана и опухолевых факторов НЭИ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории электронной микроскопии НИИ физиологии СО РАМН за техническую поддержку и признательны специалисту по научной фотографии НГМУ Ложкину М.И. за действенную помощь в изготовлении иллюстраций к статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганцев Ш.Х. Онкология. М., 2004. 516 с.
2. Онкология: национальное руководство. М., 2008. 1072 с.
3. Wang X., Kanel G.C., DeLeve L.D. Support of sinusoidal endothelial cell glutathione prevents hepatic veno-occlusive disease in the rat // *Hepatology*. 2000. 31. 428–434.
4. Sulkowska M., Sulkowski S., Skrzydlewska E. The effect of pentoxifylline on ultrastructure and antioxidant potential during cyclophosphamide-induced liver injury // *J. Submic. Cytol. Pathol.* 1999. 31. (3). 413–422.
5. Хегай И.И., Попова Н.А., Иванова Л.Н. Влияние экспрессии гена вазопрессина на рост карциносаркомы Walker 256 у крыс // *Генетика*. 2000. 42. (7). 993–995.
6. Ding Z., Lambrechts A., Parepally M., Roy P. Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis // *J. Cell Sci.* 2006. 119. (19). 4127–4137.
7. Dong Z., Saikumar P., Patel Y., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A. Serine protease inhibitors suppress cytochrome c-mediated caspase-9 activation and apoptosis during hypoxia–reoxygenation // *Biochem. J.* 2000. 347. (3). 669–677.
8. Ruoslahti E., Reed J.C. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis // *Cell*. 1994. 77. (4). 477–478.
9. Gressner A.M. Transdifferentiation of hepatic stellate (Ito) cells to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis // *Kidney Int.* 1996. 49. (1). 39–45.
10. McAuslan B.R., Hoffman H. Endothelium stimulating factor from Walker carcinoma cells: Relation to tumor angiogenic factor // *Exp. Cell Res.* 1979. 119. (1). 181–190.

CYCLOPHOSPHAMIDE ADMINISTRATION FOR LIMITATION OF CARCINOSARCOMA WALKER 256 GROWTH IN RATS AGGRAVATES THE PARANEOPLASTIC ULTRACTRUCTURAL DISTURBANCES IN THE LIVER

Anatoly Vasilyevich EFREMOV, Tatyana Anatolyevna KUNTS, Elena Vladimirovna OVSYANKO, Irina Yuryevna ISHENKO, Marya Gennadyevna PUSTOVETOVA

*Novosibirsk State Medical University
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

The signs of lysis and necrobiosis intensification in parenchyma and stroma cells were revealed in the liver of carcinosarcoma Walker 256-bearing rats at the 7th day after cyclophosphamide administration. Compensatory and adaptive reconstructions and apoptosis were noted in part of cell as a result of cyclophosphamide cytostatic effect. Combined effects of paraneoplastic factors and cyclophosphamide enhance subcellular sinusoidal obstructive syndrome manifestation caused by cyclophosphamide. Hepatocytes ultrastructural features reflect the functional liver response via triggering of detoxification mechanisms in hepatocytes with extensive smooth endoplasmatic reticulum.

Key words: liver, ultrastructure, carcinosarcoma Walker 256, cyclophosphamide.

Efremov A.V. — doctor of medical sciences, professor, Corresponding Member of RAMN, head of the chair of pathophysiology, honored scientist of the RF

Kunts T.A. — researcher of Central Research Laboratory, e-mail: tkunts@ngs.ru

Ovsyanko E.V. — candidate of medical sciences, associated professor of the chair of anatomy, histology, biology

Ishenko I.Yu. — candidate of biological sciences, researcher of Central Research Laboratory

Pustovetova M.G. — doctor of medical sciences, professor, head of Central Research Laboratory

УДК: 616.831-006-089.87-089.5

ИНТРАОПЕРАЦИОННЫЙ МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ СТВОЛА МОЗГА ПРИ УДАЛЕНИИ БАЗАЛЬНО РАСПОЛОЖЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ, ОСОБЕННОСТИ АНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ И ВИТАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ (Сообщение 2)

Сергей Борисович ЦВЕТОВСКИЙ, Вячеслав Владимирович СТУПАК

ФГБУ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии Минздрава России
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

В ходе нейрохирургических операций по удалению базально расположенных опухолей функциональное состояние ствола мозга контролировалось путем регистрации коротколатентных акустических (стволовых) потенциалов. Отмечено, что амплитудные показатели коротколатентных акустических вызванных потенциалов коррелируют с величиной артериального давления и реагируют на введение препаратов, регулирующих гемодинамику. При этом изменения амплитуды акустических стволовых вызванных потенциалов (АСВП) запаздывают по отношению к изменениям артериального давления, таким образом, изменения функционального состояния ствола не являются первичными. Результаты свидетельствуют об отсутствии существенного раздражающего или угнетающего воздействия на ствол мозга при манипуляциях хирургическим лазерным инструментом. Кратковременное снижение АСВП и увеличение их задержки, не сочетающееся со снижением артериального давления и сменяющееся затем повышением амплитуды, сохраняющимся до конца операции, не являются прогностически неблагоприятным признаком.

Ключевые слова: ствол мозга, интраоперационный мониторинг, наркоз, витальные функции.

В настоящем сообщении приводятся данные о динамике амплитуд коротколатентных слуховых вызванных потенциалов при их мониторинге в ходе операций по удалению базально расположенных опухолей головного мозга и связи этих показателей функционального состояния ствола с параметрами, контролируемые анестезиологом.

Данные о методике и обследованных пациентах приведены в сообщении 1 (Бюл. СО РАМН, № 3, 2012 г.)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как было отмечено в сообщении 1, наркоз существенно снижал амплитуду и увеличивал задержки компонентов вызванных потенциалов (ВП) по сравнению с дооперационным периодом. Наибольшее снижение амплитуды ВП в начале операции имело место в момент вводного наркоза. В 27 % случаев снижавшиеся на фоне вводного наркоза ВП при переходе к основному наркозу несколько увеличивались по амплитуде, в пределах 5–9 %.

В случаях, когда хирургические манипуляции по удалению опухоли осуществлялись в непосредственной близости от стволовой области и, вероятно, приводили к механическим воздействиям на нее, комплекс компонентов IV–V слуховых стволовых ВП реагировал оперативно. Так, при удалении невриномы VIII нерва у пациентки А. большее увеличение латентности и снижение амплитуды наблюдалось в левом отведении, на стороне опухоли. После декомпрессии исчезла разница в задержках слева и справа (рис. 1). Наблюдалась также фазная реакция: снижение амплитуды компонента V при удалении опухоли сменялось фазой увеличения комплекса IV–V на оперируемой стороне, что может быть отражением локальной стволовой ирритации на стороне, прилегающей к операционному полю. После окончания манипуляций стволовые компоненты IV–V слева и справа выравнивались. В том и другом случае у пациенток, данные которых приведены в качестве примера, не было снижения артериального давления (АД) в ходе операции, в частности на этапах выделения опухоли и ее удаления. У па-

Цветовский С.Б. – к.б.н., зав. нейрофизиологической лабораторией, e-mail: scvetovskiy@niito.ru
Ступак В.В. – д.м.н., проф., зав. клиникой нейрохирургии, e-mail: vstupak@niito.ru

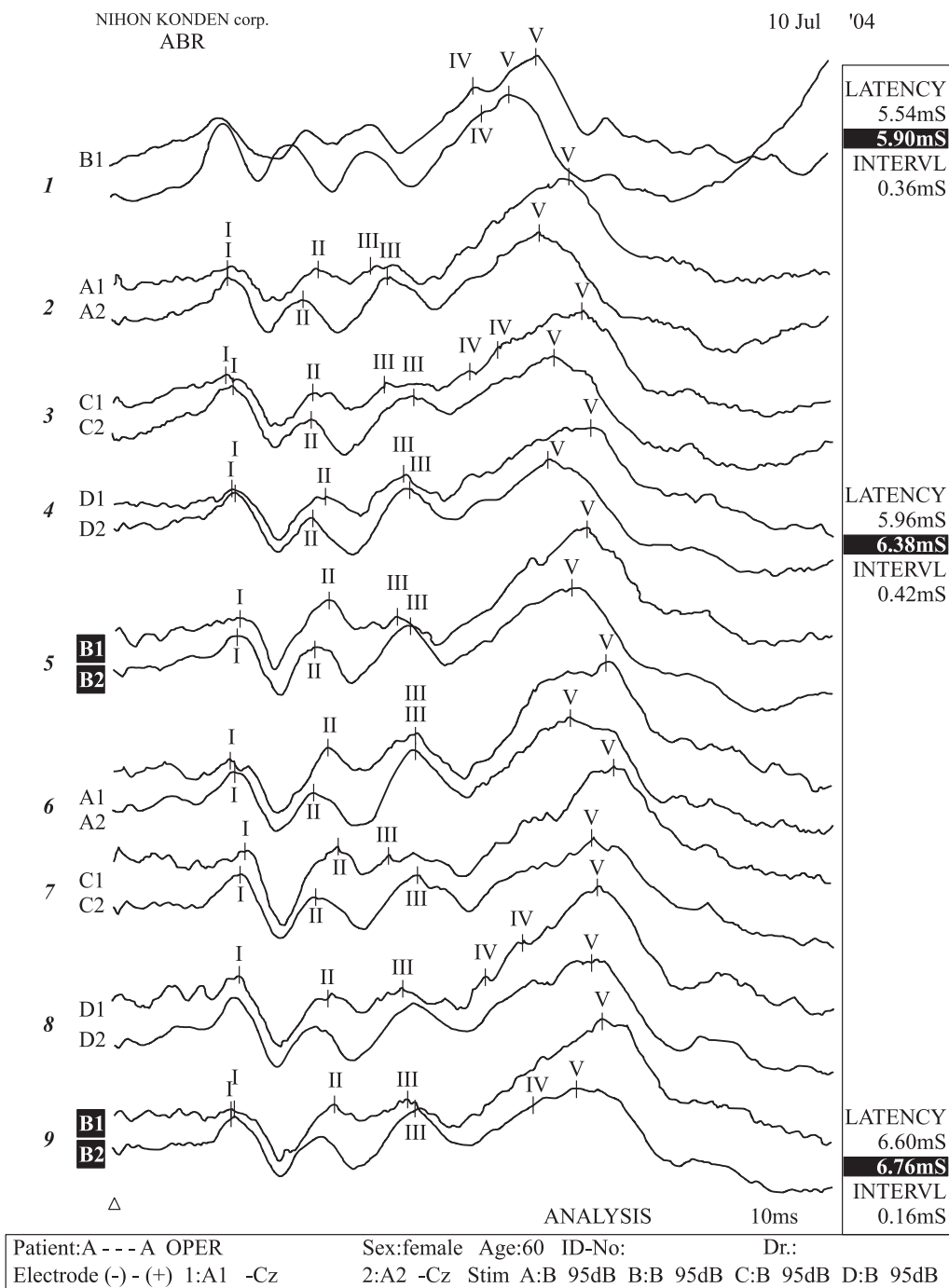


Рис. 1. Мониторинг с помощью АСВП функционального состояния ствола мозга при удалении опухоли VIII нерва слева. 1 – асимметрия ВП до операции; 2, 3 – начальные этапы операции; 4, 5 – этап доступа к опухоли; 4, 6 – кратковременные реакции в виде снижения и задержки на оперируемой стороне; 6, 7 – удаление; 8, 9 – опухоль удалена, уменьшение асимметрии ВП

пациентки А. при вскрытии твердой мозговой оболочки АД было выше (150/90 мм рт. ст.), чем в начале операции (124/84 мм рт. ст.).

Асимметрия акустических стволовых вызванных потенциалов (АСВП) с более низкой амплитудой комплекса IV–V на стороне операционного поля отмечалась и при удалении менингиом. Так, АСВП пациентки с базальной

опухолью большого и малого крыла основной кости в левом отведении были ниже, чем в правом, и в меньшей степени обнаруживали реакцию повышения амплитуды, коррелирующую с эпизодами повышения артериального давления.

Сопоставление амплитуд ВП с величиной артериального давления в ходе операции показало, что стволовые ВП высокой амплитуды ре-

гистрируются у пациентов со стабильным, нормальным или умеренно повышенным АД. При низком давлении или при его быстром снижении амплитуда ВП ниже, а задержки увеличиваются.

Из 32 оперированных пациентов 15 (46,9 %) на начальном этапе операции имели систолическое АД более 140 мм рт. ст. У пациентов этой группы средняя величина амплитуды ВП имела тенденцию к увеличению ($0,56 \pm 0,07$ мкВ для группы с относительно высоким АД, $0,43 \pm 0,09$ мкВ – для остальной группы, $p < 0,10$).

Сопоставление динамики в ходе операции АД и параметров АСВП также выявило наличие корреляционной связи между АД и амплитудой АСВП. Для 14 пациентов, у которых регистрировались колебания систолического давления в пределах 30 мм рт. ст. и более и среднего АД в пределах 20 мм рт. ст. и более, длившиеся не менее 15 мин, проводился анализ сопряженности знаков изменения давления и амплитуд АСВП по отношению к предыдущему этапу. Использовался парный критерий знаков [1]. Для ситуаций со снижением давления однонаправленность изменений была достоверной ($p < 0,05$). Отмечено также увеличение, восстановление амплитуды АСВП при последующем подъеме давления (9 случаев), однако это происходило с запаздыванием, при сохранении стабильного давления в течение 25 и более минут. В четырех случаях увеличение амплитуды АСВП наблюдалось при увеличении давления без предшествующей фазы его снижения.

Выраженное повышение амплитуды АСВП при небольшом, в пределах нормального, увеличении АД с 128/78 до 138/92 мм рт. ст. с последующим снижением отмечалось у пациентки, оперированной под кетаминовым наркозом, которой вводился глюкокортикоидный препарат

целестон, ввиду возникавшей воздушной эмболии. При возникновении эмболии снижались показатели сатурации кислорода. После преодоления нештатной ситуации, в отсутствие введения глюкокортикоида, амплитуда АСВП снова снизилась.

Увеличение амплитуды АСВП могло отражать как раздрационную реакцию ствола на умеренную гипоксию, так и влияние на метаболические процессы вводимого препарата.

На отображенной на рис. 2, а диаграмме приведен пример, иллюстрирующий связанные изменения АД и амплитуды АСВП при применении препаратов, регулирующих давление. Этап 2 соответствует ситуации, когда исходное давление 160/70 мм после введения клофелина быстро снизилось до 100/50 мм рт. ст. Затем на фоне клофелина имело место дальнейшее снижение систолического АД до 82 мм рт. ст., причем непосредственно перед этим возникла воздушная эмболия (этап 4). Гемодинамическая ситуация стабилизировалась введением вазопрессоров. Необходимо отметить, что в хирургическом плане это был этап доступа к опухоли, ее выделения. Лазер на данном этапе еще не использовался. При продолжении доступа и начале удаления с применением лазерного хирургического инструмента (этап 6) амплитуда ВП не уменьшалась. Снижавшиеся с момента возникновения воздушной эмболии показатели сатурации кислорода (92–88 %) минимальных значений достигли на этапе удаления опухоли (до 84 %). Необходимость расширения бронхов и гемодинамическая ситуация потребовали введения эфедрина. В дальнейшем параллельно с ростом АД (в основном систолического) на фоне дофамина и эфедрина происходило увеличение амплитуды АСВП. При значениях АД порядка 100/60 мм рт. ст. амплитуда ВП была высокой.

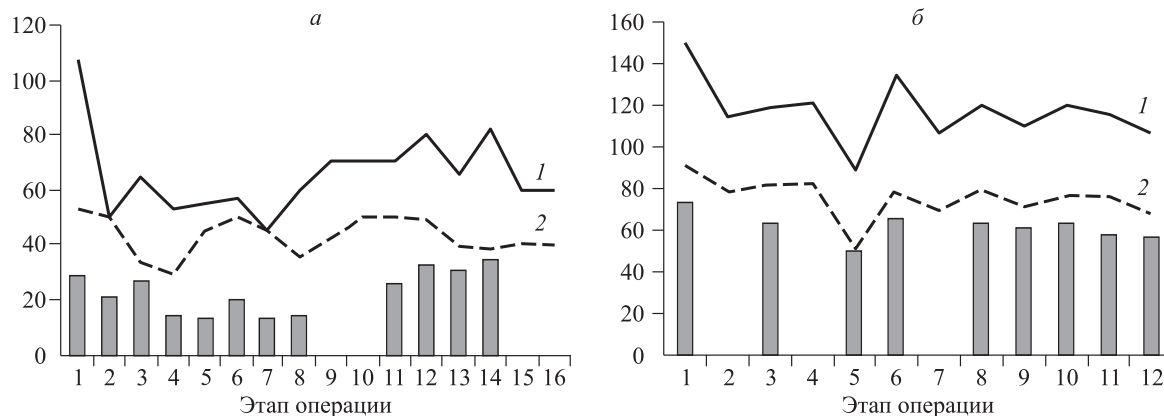


Рис. 2. Изменения систолического (1) и диастолического (2) АД (мм рт. ст.), амплитуды АСВП (мкВ × 100, столбики) в ходе операции. Пояснения в тексте

Коэффициент корреляции между измеряемыми в ходе данной операции значениями систолического АД и амплитудой ВП составил 0,553; при числе степеней свободы 10 наличие связи между этими параметрами достоверно.

Задержки же компонентов АСВП перманентно увеличивались; в конце операции, на этапах гемостаза и пластики твердой мозговой оболочки, латентное время максимума компонента V было равно 6,91 мс, что было на 15,2 % больше, чем в начале операции.

В наших исследованиях снижение амплитуды и задержка АСВП коррелировали со снижением АД. Эпизоды со значительным снижением АД чаще имели место при кетаминовом наркозе. В то же время известно, что кетамин (калипсол) увеличивает ударный и минутный объемы сердца, повышает уровень эндогенных катехоламинов, увеличивает объем циркулирующей крови. АД при его введении повышается на 20–30 мм рт. ст. [2]. Наоборот, пропофол (диприван) при слабом анальгетическом действии обладает ваготоническими свойствами, вызывает брадикардию, снижение АД. Возникает противоречие между фактами лучшей сохранности амплитуды и задержки АСВП в отсутствие периодов значительного снижения АД и тем обстоятельством, что таковые периоды, а также удлинение латентного времени и снижение ВП наблюдались больше при кетамине, обладающем тонизирующими в отношении АД свойствами.

Приводимая иллюстрация сопряженного изменения АД и амплитуды АСВП отображает данные, полученные для пациентки, оперированной с использованием пропофола. При этом виде наркоза в значительно меньшей степени применялись препараты, регулирующие гемодинамику, в частности клофелин. В то же время АД при наркозе пропофолом сохранялось более стабильным, эпизоды резкого его снижения (более чем на 30 мм рт. ст.) зарегистрированы у 2 из 8 пациентов. В приводимом примере снижение давления до 89/52 мм рт. ст. (этап 5) было обусловлено массивным кровотечением. У четырех оперируемых отмечались периоды умеренного повышения давления по сравнению с таковым в начале операции. Известно, что клофелин обладает выраженным седативным и некоторым анальгетическим действием. Таким образом, на электрогенез мозговых структур, в том числе ствола, оказывает влияние не только регулирование гемодинамических параметров, таких как объем циркулирующей крови, артериальное давление, сопротивление сосудов и, как следствие, изменение мозговой перфузии.

При использовании, например, клофелина с его седативным и анальгетическим эффектом несомненно воздействие непосредственно на нейрорхимические процессы, в том числе в подкорковых структурах центральной нервной системы. Этим можно объяснить парадоксальные на первый взгляд факты.

Диаграмма на рис. 2, б отображает связанные изменения АД и амплитуды АСВП, зарегистрированные в ходе операции по удалению менингиомы; для наркоза использовался пропофол. В данном случае наблюдалась тесная и достоверная связь; параметрический коэффициент корреляции между численными значениями систолического АД и амплитудой равен $r = 0,96$. Однако в целом по группе достоверные при соответствующем числе степеней свободы значения коэффициентов численной корреляции, отражающие наличие средней (от $r = 0,53$) и сильной связи, получены только в 63 % случаев, причем обусловлено это, в первую очередь, запаздыванием тенденции к восстановлению амплитуды при стабилизации давления. Для выявления «запаздывающего» повышения амплитуды АСВП в ситуациях, когда сниженное, в том числе применением клофелина, АД нормализуется или устанавливается на значениях, несколько превышающих норму, нами проведено сравнение амплитуд АСВП, зарегистрированных во временных интервалах за 3–1 минуту до момента фиксации увеличения АД, со значениями, измеренными в реализациях, зарегистрированными спустя 4–6 минут после этого момента. Из 29 проведенных сравнений в 25 случаях отмечено приращение амплитуды АСВП на величину не менее 10 %.

Введение препаратов, повышающих АД, влияет на амплитуду АСВП, на прогрессирующее увеличение задержки введение адренергических препаратов видимого воздействия не оказывает.

Таким образом, снижение артериального давления коррелирует со снижением амплитуды АСВП, а повышение АД после применения соответствующих препаратов – с увеличением АСВП. Возникает вопрос – являются ли изменения функционального состояния ствола следствием или причиной снижения системного АД.

В рассмотренном выше примере изменения АД, как и снижение сатурации кислорода, определено были вызваны иной, внешней причиной – возникновением воздушной эмболии. Наименьшее значение сатурации составляло 84 %. Всего в наших наблюдениях уменьшение в ходе операции показателей сатурации кисло-

рода ниже 98 % на время более 15 мин отмечено лишь в трех случаях, причем в двух из них минимальные значения не опускались ниже 90 и 95 % соответственно. Во всех случаях падение АД и сатурации происходило параллельно: с 162/112 до 104/70 мм рт. ст., минимальная сатурация 95 % (пациентка Б.); с 160/70 до 82/53 мм рт. ст., минимальная сатурация 90 % (пациентка С.); с 128/78 – 138/92 до 65/25 мм рт. ст., минимальная сатурация 84 % (пациентка К.). В двух последних случаях изменения амплитуды ВП достоверно коррелировали с величинами гемодинамических показателей, с восстановлением амплитуды после введения препаратов, повышающих АД. Таким образом, изменения функционального состояния ствола, в частности условий генерации стволовых вызванных потенциалов, были вторичными.

Необходимо отметить, что положительная корреляция между величиной АД и амплитудой АСВП наблюдалась в основном в условиях наркоза кетаминем и при дополнительном применении препаратов, снижающих АД. Восстановление, увеличение амплитуды отмечалось при повышении АД от низких значений до нормальных или несколько повышенных. При применении пропופола было отмечено, что эпизоды быстрого повышения давления до величин, существенно превышающих норму (172/117 мм рт. ст.), совпадают с уменьшением амплитуды комплекса IV–V. При нормализации АД (117/88 мм рт. ст.) амплитуда вновь увеличивалась. В целом по группе значимой связи между частотой сердечных сокращений и динамикой стволовых ВП не выявлено.

В ходе операций манипуляции лазерным инструментом с целью удаления менингиом ни в одном случае не привели к существенным изменениям стволовых ВП, что подтверждает локальность термического действия лазерного инструмента и адекватность используемых хирургических приемов и хирургической тактики.

Снижение и задержка комплекса стволовых компонентов IV–V, исходно измененных при предоперационном обследовании и при вводном наркозе (удлинение компонента 5), зарегистрированы в одном случае при удалении невриномы слухового нерва справа. Данные мониторинга использованы для принятия решения о степени радикальности удаления опухоли. В послеоперационном периоде какие-либо симптомы стволовых нарушений отсутствовали.

Таким образом, в момент удаления опухоли кратковременное снижение амплитуды комплекса IV–V (в основном компонента V) и увеличение их задержки, не сочетающееся со сни-

жением артериального давления и сменяющееся затем повышением амплитуды, сохраняющимся до конца операции, не являются прогностически неблагоприятным признаком. При этом нужно отметить, что в двух случаях со снижением и задержкой комплекса IV–V на фоне низкого АД в конце операции, на этапе гемостаза, в послеоперационном периоде также не наблюдалось серьезных осложнений. Так, в одном из наблюдений в конце операции компонент V имел низкую амплитуду, задержку 7,0–7,1 мс при АД, достигавшем минимального значения 78/45 мм рт. ст., при этом в послеоперационном периоде осложнения отсутствовали.

Как уже указывалось в первой части статьи, низкие, нестабильные и задержанные АСВП на начальном этапе операции могут быть отнесены к прогностически неблагоприятным признакам. Пример данных мониторинга второго из двух пациентов с неблагоприятным исходом в раннем послеоперационном периоде приведен на рис. 3. Пациентка Б. с менингиомой мосто-мозжечкового угла справа: исходно, до операции при двусторонней стимуляции регистрировались АСВП сниженной амплитуды, особенно в правом отведении. В правом отведении амплитуда пятого компонента выражено ниже, чем у компонента IV. При моноауральной стимуляции справа АСВП практически отсутствуют, лишь в левом отведении регистрируется сильно задержанный (6,5 мс) низкоамплитудный компонент V. На фоне наркоза (использовался кетамин) в начале операции при двусторонней стимуляции в левом отведении компонент V имел задержку 6,3 мс (увеличение по отношению к исходной составляло 10 %). На этапе подхода и выделения опухоли регистрировались сопряженные с эпизодами снижения систолического давления со 130 до 100 мм рт. ст. эпизоды снижения и сильной задержки компонента V, наряду с небольшим повышением амплитуды других компонентов, со второго по четвертый. Эти изменения АСВП были преходящими, параллельно с повышением давления после принятия соответствующих мер параметры вызванных потенциалов восстанавливались.

К моменту удаления опухоли с использованием лазера задержки всех компонентов АСВП, начиная со второго, увеличились. Так, латентное время пика компонента III составляло 4,39 мс (в начале операции – 4,00 мс).

Непосредственно после удаления опухоли регистрировалось выраженное изменение комплекса IV–V, в первую очередь за счет задержки и снижения компонента IV. Задержка его пика увеличилась с 5,55 мс на предыдущем этапе

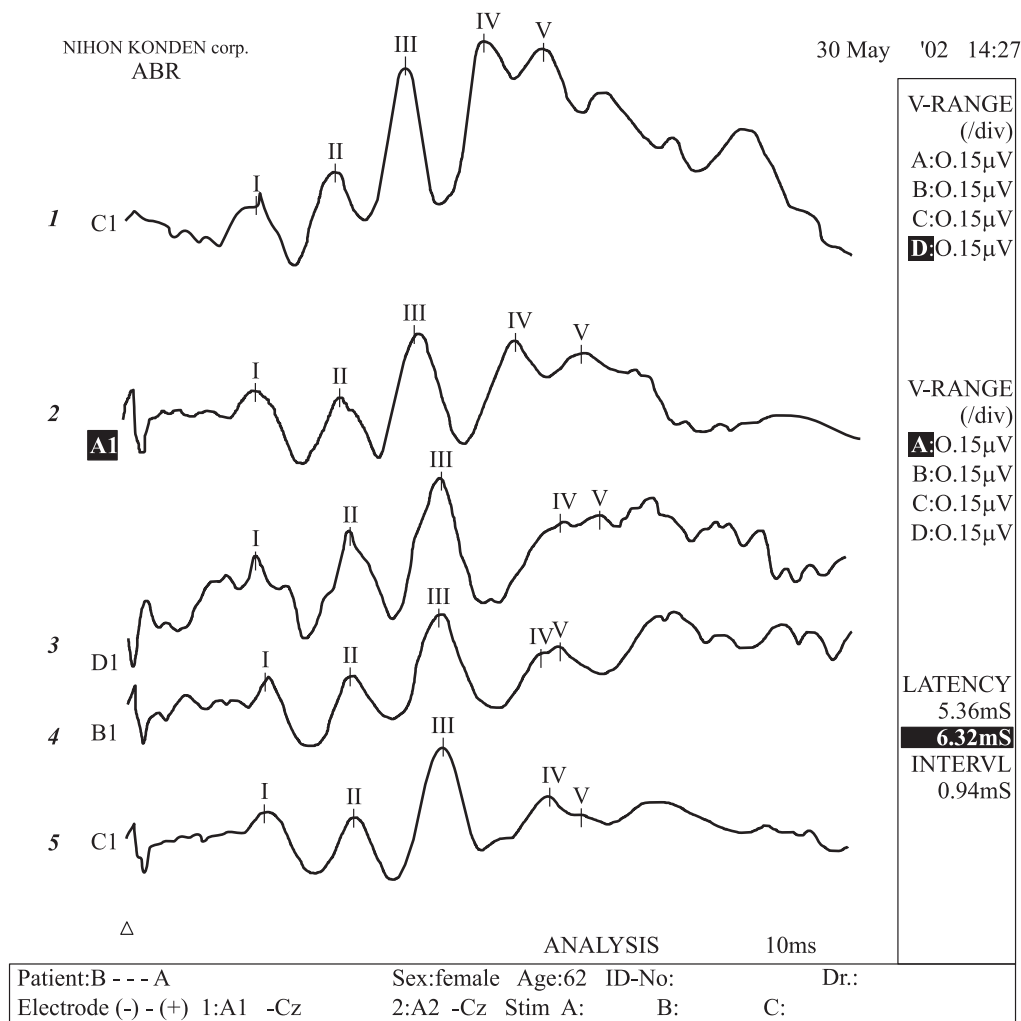


Рис. 3. Реакции на особенности гемодинамической ситуации у пациентки с исходно измененными стволовыми ВП. 1 – предоперационное обследование; 2 – наркоз, начало операции; 3 – снижение артериального давления на этапе подхода к опухоли, до применения лазера; 4 – удаление опухоли; 5 – окончание операции

до 6,05 мс, амплитуда снизилась на 20 %. Одновременно уменьшилось АД, составив 95/53 мм рт. ст. В последующем комплекс компонентов IV–V изменился следующим образом: вначале при некотором улучшении формы компонента IV (более ранний и «крутой» передний фронт при практически той же задержке максимума) резко снизился компонент V, дифференцирование этого компонента от четвертого стало невозможным. Далее, на этапах гемостаза, окончания операции, произошло дальнейшее снижение компонента IV при отсутствии компонента V. АД при этом составляло 129/55 мм рт. ст. – низкое диастолическое.

В ближайшем послеоперационном периоде у больной развилась кома. АСВП, зарегистрированные в реанимационной палате на вторые сутки после операции, по амплитуде были

почти вдвое ниже, чем при предоперационном обследовании, однако форма и соотношение амплитуд компонентов не обнаруживали существенных отклонений от нормальных. Компонент V, в отличие от ситуации в конце операции, присутствовал. Задержки же «стволовых» компонентов были большими, чем до операции. Латентное время компонента IV увеличилось до 5,23 мс (до операции 4,88 мс), компонента V – до 6,25 мс (до операции 5,78 мс). Больная умерла на 3-и сутки после операции. Приведенные данные об изменениях задержек и амплитуд компонентов АСВП при неблагоприятном исходе операции по удалению опухоли в области мосто-мозжечкового угла могут быть учтены при прогнозировании исхода операции.

Таким образом, наши результаты регистрации АСВП в ходе выполнения хирургических

вмешательств на базальных структурах мозга показали, что в условиях длительного пребывания под наркозом увеличение задержки компонента V до значений, превышающих 6,2 мс, при сохранении соотношения амплитуд компонентов без их существенного снижения, не отражает однозначно возникновение патологических изменений в стволовой области, хотя в работах [3, 4], объединяющих литературные данные с собственными данными авторов, такая задержка, причем регистрируемая при меньшей (70 дБ), чем использовавшаяся нами интенсивности стимуляции, считается определено патологической.

Есть сообщения [5, 6] о множестве зарегистрированных случаев выраженной активации АСВП во время удаления опухолей мозга. Изменения амплитуды отмечались в 62 % наблюдений, при этом 48 % от данного числа составляли случаи, когда амплитуда АСВП увеличивалась в 2 раза и более, 39 % – с «умеренным» увеличением. При этом лишь при хирургических вмешательствах на образованиях задней черепной ямки преобладало увеличение амплитуды компонентов III–V, во многих других случаях увеличивались все пики АСВП. Изменения расценивались как ирритативные. Возможность столь значительных ирритативных изменений в условиях контролируемого наркоза вызывает вопросы, тем более что компоненты I–II генерируются периферическими структурами нервного аппарата слуха и лишь третьему компоненту приписывается «медулопонтинное» происхождение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Амплитудные показатели коротколатентных акустических (стволовых) вызванных потенциалов коррелируют с величиной артериального давления и реагируют на введение препаратов, регулирующих гемодинамику. При этом изменения амплитуды АСВП запаздывают по отношению к изменениям АД, таким образом, изменения функционального состояния ствола не являются первичными. Кратковременное сни-

жение комплекса собственно стволовых компонентов IV–V (отмечается в основном снижение пятого) и увеличение их задержки, не сочетающееся со снижением артериального давления и сменяющееся затем повышением амплитуды, сохраняющимся до конца операции, не являются прогностически неблагоприятным признаком. В нашей работе мы не наблюдали значительных увеличений амплитуды коротколатентных слуховых ВП, связанных с каким-либо этапом хирургических вмешательств при операциях по поводу удаления менингиом. Лишь у одной больной на этапе до применения лазера отмечено изменение формы комплекса стволовых компонентов IV–V. На наш взгляд, это подтверждает не только отсутствие существенного ирритирующего или угнетающего воздействия на стволовую область мозга при манипуляциях хирургическим лазерным инструментом, но и достаточность анестезиологического обеспечения операций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 31 с.
2. Анестезиология и реаниматология / *Ред. О.А. Долина*. 2-е изд., переработ. и доп. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. 552 с.
3. *Гнездицкий В.В.* Вызванные потенциалы мозга в клинической практике. Таганрог, 1997. 252 с.
4. *Щекутьев Г.А.* Нейрофизиологические исследования в клинике. М., 2001. 232 с.
5. *Острейко Л.М.* Особенности нейрофизиологического интраоперационного мониторинга при удалении опухолей головного мозга: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2000.
6. *Хилько В.А., Лытаев С.А., Острейко Л.М.* Мониторинг акустических стволовых вызванных потенциалов при удалении опухолей задней черепной ямки // *Клинич. мед. патофизиол.* 1999. (2). 23–26.

INTRAOPERATIVE MONITORING OF THE BRAINSTEM STATE DURING BASAL TUMOR REMOVAL, ANESTHESIA SPECIFICS, AND VITAL FUNCTIONS (Report 2)

Sergey Borisovich TSVETOVSKY, Vyacheslav Vladimirovich STUPAK

*Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

Functional state of the brain stem during neurosurgical removal of the basal tumor was controlled via registration of short-latency brainstem auditory evoked potentials (BAEP). It was shown that amplitude parameters of BAEP correlate with arterial pressure values and respond to administration of drugs for hemodynamic regulation. Alterations in the BAEP amplitude delay relative to alterations in arterial pressure, therefore changes in the functional status of the brainstem are not primary ones. Results speak for the absence of significant irritating or inhibitory effect of laser surgical manipulation on the brainstem. Short-time decrease in the BAEP and the increase in its delay not associated with the arterial pressure decrease and followed by the amplitude increase persisting till completion of the surgery do not present unfavorable prognostic signs.

Key words: brain stem, intraoperative monitoring, anesthesia, vital functions.

*Tsvetovsky S.B. – candidate of biological sciences, head of neurophysiological laboratory,
e-mail: scvetovskiy@niito.ru*

Stupak V.V. – doctor of medical sciences, head of the clinic for neurosurgery, e-mail: vstupak@niito.ru

КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АТОРВАСТАТИНА И АНТИОКСИДАНТА КОЭНЗИМ Q₁₀ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Наталья Сергеевна ЮБИЦКАЯ, Марина Владимировна АНТОНЮК,
Вера Иннокентьевна ЯНЬКОВА

*Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания
СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения
690105, г. Владивосток, ул. Русская, 73-г*

Изучена динамика состояния глюкозно-инсулинового гомеостаза, процессов липопероксидации у пациентов с метаболическим синдромом при применении аторвастатина и его комбинации с коэнзимом Q₁₀. Установлено, что аторвастатин угнетает антиоксидантную систему, а также способствует увеличению инсулинорезистентности при метаболическом синдроме. Комбинированная терапия аторвастатином и коэнзимом Q₁₀, повышая антиоксидантную защиту, нивелирует интенсификацию свободнорадикального окисления липидов, индуцированную приемом статины, и не оказывает негативного влияния на состояние углеводного обмена. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности назначения коэнзима Q₁₀ при статинотерапии.

Ключевые слова: метаболический синдром, статины, антиоксиданты, перекисное окисление липидов.

Достижение адекватного метаболического контроля – один из основных принципов лечения пациентов с метаболическим синдромом (МС). Часто встречаемым компонентом МС является дислипидемия [1–3]. Для коррекции нарушений липидного обмена у пациентов с МС препаратами выбора являются статины [4, 5]. Известно, что гиполипидемическое действие статинов основано на их способности ингибировать активность фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы, катализирующего образование мевалоновой кислоты. Доказано, что по мевалоновому пути осуществляется биосинтез не только холестерина, но также жизненно необходимого коэнзима Q₁₀ – основного клеточного антиоксиданта, защищающего фосфолипидный слой клеточной мембраны от воздействия свободных радикалов. В эксперименте на животных убедительно доказано, что статинотерапия приводит к дефициту коэнзима Q₁₀ в крови и тканях [6]. Интенсификация свободнорадикального окисления липидов, имеющая патогенетическое значение при формировании МС, в условиях статининдуцированного дефицита коэнзима Q₁₀ может приводить к неблагоприятным послед-

ствиям [6–9]. В этой связи правомерно возникает вопрос о целесообразности назначения антиоксиданта коэнзима Q₁₀ больным с МС, получающим статины. В литературе данные по этому вопросу противоречивы [1, 6, 8, 10].

Среди статинов широкое применение имеет аторвастатин. Выбор данного препарата обусловлен сочетанием высокой эффективности и фармакоэкономическими преимуществами [11]. Среди плейотропных эффектов аторвастатина неоднозначным является его влияние на углеводный обмен. Как побочное действие со стороны обмена веществ разработчики аторвастатина и его дженериков отмечают возможность развития как гипергликемии, так и гипогликемии. Такое действие данного препарата может ограничивать его применение при лечении пациентов с МС.

Целью исследования явилось изучение динамики состояния глюкозно-инсулинового гомеостаза, процессов липопероксидации у пациентов с метаболическим синдромом при пролонгированном применении аторвастатина и его комбинации с коэнзимом Q₁₀.

*Юбицкая Н.С. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения,
e-mail: natalia.yb@mail.ru*

Антонюк М.В. – д.м.н., зав. лабораторией восстановительного лечения, e-mail: antonyukm@mail.ru

Янькова В.И. – к.б.н., ученый секретарь, e-mail: jankova_nch@list.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В открытое проспективное контролируемое исследование включены 44 пациента с метаболическим синдромом (12 мужчин, 32 женщины; средний возраст $52,6 \pm 1,5$ года). Метаболический синдром диагностировали в соответствии с рекомендациями Всероссийского научного общества кардиологов (2009 г.). Исследование проводили согласно Хельсинкской декларации (2008 г.), после получения у пациентов информированного согласия. Первую группу составили 21 человек, получавшие аторвастатин, вторую группу – 23 пациента, принимавшие аторвастатин и коэнзим Q₁₀. Пациенты обеих групп получали ежедневно аторвастатин в дозе 20 мг/сут. Коэнзим Q₁₀ назначали в суточной дозе 30 мг/сут ежедневно в течение 8 недель с последующим перерывом 8 недель (в 1 год 3 курса приема коэнзима Q₁₀).

Длительность наблюдения составила 12 месяцев. Клинико-лабораторное обследование проводилось всем пациентам в начале наблюдения, через 6 и 12 месяцев.

В сыворотке крови определяли содержание триглицеридов, холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), общего холестерина (ОХС), мочевой кислоты с помощью стандартных энзимных наборов (наборы фирмы «Ольвекс», Россия), аполипопротеинов А1 и В. Рассчитывали содержание холестерина липопротеидов низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП). Интенсивность липопероксидации оценивали по содержанию ее конечного продукта малонового диальдегида в эритроцитах крови. Для характеристики системы антиоксидантной защиты измеряли содержание восстановленного глутатиона (ГЛ), активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в эритроцитах крови, определяли интегральный показатель антиоксидантной активности в плазме крови [12]. Исследование углеводного обмена включало определение содержания глюкозы (наборы фирмы «Вектор Бест», Россия) в сыворотке крови натощак и через 2 ч после пероральной нагрузки глюкозой, уровня инсулина иммуноферментным методом (наборы фирмы «DRG-diagnostics», Германия). Инсулинорезистентность оценивали по критерию НОМА. Значение индекса НОМА больше 2,7 считалось повышенным и соответствовало состоянию инсулинорезистентности.

Переносимость и безопасность терапии аторвастатином оценивали по частоте возникновения побочных эффектов, активности аланин- и аспартатаминотрансфераз (наборы фирмы «Ольвекс», Россия).

Для количественного представления изученных показателей рассчитывали среднее арифметическое значение (M) и ошибку среднего (m). Оценку достоверности различий проводили, используя критерии параметрической (t -критерий Стьюдента) и непараметрической (W -критерий Вилкоксона) статистики. С помощью t -критерия Стьюдента проверяли достоверность различий средних значений при нормальном распределении показателей вариационных рядов у здоровых людей и пациентов до и в динамике лечения. Для проверки различий между двумя выборками парных измерений у пациентов до лечения и в различные сроки лечения (6 и 12 месяцев) использовали критерий суммы рангов Вилкоксона, который позволяет сопоставить показатели зависимых выборок и установить направленность сдвига показателей вариационных рядов, их выраженность по интенсивности сдвигов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для пациентов обеих групп наблюдения характерным явилось наличие ожирения (индекс массы тела в I группе составил 36,9, во II – 31,9). Практически все пациенты имели инсулинорезистентность, гипертриглицеридемию, гиперхолестеринемию или гипоальфахолестеринемию, повышенные уровни ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП (табл. 1). Содержание аполипопротеинов А1 и В в среднем по группе были в пределах значительной верхней границы нормы, а их соотношение превышало нормальный уровень. Большинство изучаемых показателей системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у пациентов с МС в обеих группах до приема препаратов не отличалось от нормальных значений [12], за исключением активности глутатионпероксидазы, которая была снижена в I и II группах на 38 и 34 % соответственно ($p < 0,01$).

Переносимость аторвастатина у пациентов обеих групп была хорошей. При приеме аторвастатина в дозе 20 мг не было зафиксировано случаев трехкратного повышения предельной активности аланин- и аспартатаминотрансфераз, которые являются критерием прекращения приема препарата [4].

Через 6 месяцев приема препаратов у пациентов обеих групп отмечен гиполипидемический эффект. В I группе позитивные изменения липидного спектра крови характеризовались достоверным снижением уровня ОХС на 23 %, ХС ЛПНП на 30 % и ХС ЛПОНП на 53 % ($p < 0,01$). Соотношение показателей аполипопротеинов В/А1 достоверно увеличилось

Таблица 1

Результаты динамического наблюдения за пациентами с метаболическим синдромом, $M \pm t$

Показатель	Норма	I группа (n = 21)			II группа (n = 23)		
		До лечения	Динамика лечения		До лечения	Динамика лечения	
			через 6 месяцев	через 12 месяцев		через 6 месяцев	через 12 месяцев
Содержание глюкозы, ммоль/л	5,6–6,1	5,7 ± 0,3	6,1 ± 0,4**	5,5 ± 0,3	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,2
Содержание инсулина, мкЕд/мл	1–17	14,3 ± 2,2	15,9 ± 2,6**	17,1 ± 4,2**	14,0 ± 1,1	14,1 ± 1,5	14,5 ± 1,3
Индекс НОМА	< 2,27	4,1 ± 0,5	4,9 ± 1,1**	4,6 ± 1,1**	3,2 ± 0,3	2,9 ± 0,4**	3,2 ± 0,3
Содержание мочевой кислоты, мкмоль/л	142–339 (женщины); 202–416 (мужчины)	335,4 ± 20,3	327,1 ± 29,5	293,6 ± 39,5	323,2 ± 25,4	360,2 ± 19,7	303,4 ± 14,6
Содержание триглицеридов, ммоль/л	< 1,7 ммоль/л	1,88 ± 0,1	1,03 ± 0,1	1,33 ± 0,22	1,90 ± 0,3	1,59 ± 0,2**	1,76 ± 0,1
Содержание ОХС, ммоль/л	< 5,0 ммоль/л	6,1 ± 0,2	4,7 ± 0,3**	4,9 ± 0,5**	5,7 ± 0,2	4,6 ± 0,2**	5,2 ± 0,1**
Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л	> 1,0 (мужчины); > 1,2 (женщины)	1,05 ± 0,05	1,08 ± 0,14	1,10 ± 0,07	1,03 ± 0,04	1,27 ± 0,08*	1,32 ± 0,04*
Содержание ХС ЛПОНП, ммоль/л	< 0,38	0,85 ± 0,05	0,40 ± 0,09**	0,60 ± 0,10**	0,97 ± 0,15	0,72 ± 0,09	0,76 ± 0,08**
Содержание ХС ЛПНП, ммоль/л	< 3,0	4,06 ± 0,3	2,87 ± 0,50**	3,15 ± 0,50**	3,47 ± 0,30	2,53 ± 0,20**	3,20 ± 0,10**
Содержание аполипопротеина А1, мг/дл	120–190 (женщины); 110–170 (мужчины)	147,5 ± 7,9	148,4 ± 8,6**	143,7 ± 7,0**	151,5 ± 5,4	152,7 ± 7,1**	159,8 ± 7,4**
Содержание аполипопротеина В, мг/дл	75–150 (женщины); 80–155 (мужчины)	141,9 ± 10,7	152,3 ± 13,3**	125,8 ± 9,5**	137,0 ± 5,6	105,0 ± 9,9**	135,9 ± 5,4**
Индекс аполипопротеинов В/А1	< 0,9	1,01 ± 0,09	1,06 ± 0,13	0,87 ± 0,09**	0,95 ± 0,04	0,66 ± 0,06*	0,95 ± 0,09*

Примечание. Отличие от величины соответствующего показателя до лечения статистически значимо: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$ (t -критерий Вилкоксона).

(см. табл. 1). Дальнейшее лечение пациентов аторвастатином (до 12 мес.) способствовало снижению уровня индивидуальных аполипопротеинов и индекса аполипопротеинов В/А1 до нормальных значений, содержание ОХС и холестерина атерогенных фракций липопротеидов сохранялось на прежнем уровне. При этом у пациентов I группы продолжительность курса лечения аторвастатином не влияла на концентрацию холестерина, содержащегося в антиатерогенной фракции липопротеидов – ХС ЛПВП.

Также не было выявлено статистически значимых изменений содержания триглицеридов крови, тем не менее уже через 6 месяцев терапии повышенный уровень триглицеридов оставался лишь у одного человека, у остальных пациентов зафиксированы нормальные значения этого показателя. Таким образом, результаты нашего исследования показали, что прием аторвастатина в дозе 20 мг/сут позволяет достоверно снизить содержание ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПОНП и апоВ. Полученные данные согласуются с

литературными. Известно, что статины, являющиеся ингибиторами 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы, оказывают выраженное гиполлипидемическое действие, уменьшая концентрацию ОХС и холестерин липопротеидов низкой плотности [2, 11].

Во II группе пациентов, получавших аторвастатин в комбинации с коэнзимом Q₁₀, к концу периода наблюдения уровни ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПОНП, аполипопротеина В достоверно снизились. В отличие от первой группы, достоверно повысилось содержание антиатерогенной фракции ХС ЛПВП, а также аполипопротеина А1, что явилось важным преимуществом комбинированной терапии аторвастатином и коэнзимом Q₁₀.

В процессе лечения у пациентов I группы отмечены статистически значимые изменения показателей углеводного обмена (см. табл. 1). Выявлена неблагоприятная тенденция к увеличению уровня глюкозы и секреции инсулина в течение первых 6 месяцев приема аторвастатина, что сопровождалось повышением индекса инсулинорезистентности. В дальнейшем содержание глюкозы крови снизилось, а уровень инсулина продолжал увеличиваться, индекс НОМА оставался высоким. При сочетанном приеме аторвастатина и коэнзима Q₁₀ (II группа) негативной динамики со стороны глюкозно-инсулинового гомеостаза, характерной для монотерапии аторвастатином, не наблюдалось. Вероятно, неблагоприятный эффект статина компенсировался действием коэнзима Q₁₀. Данный кофермент является независимым компонентом клеток, принимающим участие в синтезе АТФ и энергообеспечении организмов с аэробным метаболическим циклом, и активно участвует в процессах окисления глюкозы [13, 14].

На фоне лечения у пациентов I группы система перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты была более динамичной, чем у пациентов II группы (табл. 2). Максимальная интенсификация процессов перекисного окисления липидов наблюдалась через 6 месяцев приема аторвастатина и характеризовалась достоверным увеличением по сравнению с исходным уровнем малонового диальдегида, повышением интегрального показателя антиоксидантной активности на 34 % ($p < 0,01$) и активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы на 50 и 17 % соответственно на фоне снижения содержания восстановленного глутатиона на 24 % ($p < 0,01$). Такая динамика показателей свидетельствовала об адекватной ответной реакции системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты.

Увеличение срока приема аторвастатина пациентами I группы до 12 месяцев сопровождалось снижением содержания конечного продукта липопероксидации – малонового диальдегида ($p < 0,01$) до уровня здоровых лиц. Тем не менее его содержание у пациентов с МС через 12 месяцев лечения достоверно превышало исходный уровень до лечения. На фоне нормализации содержания малонового диальдегида происходило повышение показателя общей антиоксидантной активности на 34 % ($p < 0,01$) от исходного уровня. Уменьшение активности глутатионредуктазы при стабильно низком содержании ГЛ и снижение активности глутатионпероксидазы свидетельствовало об истощении восстановительного резерва глутатионзависимого звена антиоксидантной защиты у пациентов через 12 месяцев приема аторвастатина по сравнению с полугодовым курсом. Это связано, по-видимому, с интенсификацией механизмов антиоксидантной защиты на стадиях, предотвращающих образование гидроперекисей липидов.

В отличие от монотерапии, комбинированный прием аторвастатина и коэнзима Q₁₀ в течение 12-месячного курса у пациентов с МС (II группа) препятствовал истощению глутатионзависимого звена антиоксидантной защиты, о чем свидетельствовало статистически значимое повышение содержания ГЛ по сравнению с исходным уровнем и сохранение его количества на уровне здоровых лиц. Повышение через 6 месяцев количества ГЛ на 21 % ($p < 0,01$) на фоне снижения активности глутатионредуктазы подтверждает участие коэнзима Q₁₀ в нейтрализации липопероксидных радикалов. Индуцированное этим процессом увеличение активности глутатионпероксидазы сопряжено с необходимостью детоксикации образующихся в данной реакции гидроперекисей липидов. Через 12 месяцев комбинированного применения аторвастатина и коэнзима Q₁₀ уровень ГЛ уменьшался даже на фоне увеличения активности глутатионредуктазы, что свидетельствовало о гиперпродукции липоперекисей при действии коэнзима Q₁₀ и последующем восстановлении их глутатионом. Следовательно, применение коэнзима Q₁₀ на фоне терапии аторвастатином способствовало активации глутатионзависимого звена антиоксидантной защиты, что сопровождалось повышением интегрального показателя антиоксидантной активности через 6 и 12 месяцев на 16 и 21 % соответственно ($p < 0,01$).

Комбинированное применение аторвастатина и коэнзима Q₁₀ позволило нивелировать негативное влияние статина на состояние системы перекисного окисления липидов и антиок-

Таблица 2

Динамика показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у пациентов с метаболическим синдромом, $M \pm t$

Показатель	Здоровые лица [8]	I группа (n = 21)			II группа (n = 23)		
		До лечения	Динамика лечения		До лечения	Динамика лечения	
			через 6 месяцев	через 12 месяцев		через 6 месяцев	через 12 месяцев
Содержание малонового диальдегида, нмоль/г гемоглобина	7,62 ± 0,34	7,59 ± 0,20	*8,05 ± 0,30**	7,75 ± 0,20**/·	7,10 ± 0,20	7,50 ± 0,30**	7,50 ± 0,20**/·
Антиоксидантная активность, %	61,86 ± 3,52	53,9 ± 3,2	*72,0 ± 1,9**	*72,1 ± 3,6**	65,3 ± 3,8	**76,0 ± 2,6**	**78,9 ± 1,9**
Содержание глутатиона, мкмоль/г гемоглобина	5,59 ± 0,12	5,4 ± 0,2	**4,6 ± 0,3**	**4,7 ± 0,2**	5,2 ± 0,3	6,3 ± 1,2**	5,3 ± 0,3**/·
Активность глутатионпероксидазы, мкмоль глутатиона/(ч × г гемоглобина)	49,01 ± 4,62	**30,0 ± 1,8	45,1 ± 5,2**	**38,9 ± 2,8**	**32,3 ± 3,2	36,6 ± 5,0**	**32,9 ± 1,9**/·
Активность глутатионредуктазы, мкмоль НАДФН/(мин × г гемоглобина)	172,5 ± 1,8	153,9 ± 7,7	179,8 ± 6,3**	**144,2 ± 11,7*	155,6 ± 11,1	*148,0 ± 8,2**	168,9 ± 9,5**/·

Примечание. Звездочкой (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$) обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей: слева – здоровых лиц (критерий Стьюдента), справа – до лечения (критерий Вилкоксона), точками ($p < 0,05$) – от значений в динамике через 6 месяцев.

сидантной защиты у пациентов с МС. На фоне приема аторвастатина в качестве монотерапии (I группа) через 6 месяцев интенсивность процессов перекисного окисления липидов превышала физиологический уровень, а через 12 месяцев некоторое снижение активности липопероксидации сопровождалось истощением глутатионзависимого звена антиоксидантной защиты. Прием аторвастатина в комбинации с коэнзимом Q_{10} способствовал сохранению активности процессов перекисного окисления липидов на физиологическом уровне. Очевидно, это обусловлено механизмом антиоксидантного действия коэнзима Q_{10} , прерывающего процесс свободнорадикального окисления липидов за счет нейтрализации пероксирадикалов и превращения их в гидропероксиды ненасыщенных жирных кислот, которые в свою очередь разлагаются глутатионпероксидазой в присутствии ГЛ и, тем самым, препятствуют образованию конечных продуктов перекисного окисления липидов [14, 15]. Участие коэнзима Q_{10} в про-

цессе инактивации липопероксидных радикалов нивелирует истощение восстановительного эквивалента глутатионзависимого звена антиоксидантной защиты при длительной монотерапии аторвастатином. Полученные данные согласуются с ранее проведенными исследованиями *in vivo* [7] и у пациентов с ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью [16, 17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что у пациентов с МС аторвастатин, принимаемый в дозе 20 мг/сут в течение 12 месяцев, угнетает ферментативное звено антиоксидантной системы «глутатионпероксидаза – глутатион – глутатионредуктаза», а также способствует увеличению инсулинорезистентности. Комбинированная терапия аторвастатином и коэнзимом Q_{10} , повышая антиоксидантную защиту, нивелирует интенсификацию свободнорадикального окисления липидов, индуцированную приемом аторвастатина. Негативного влияния терапии

аторвастатином в сочетании с коэнзимом Q₁₀ на состояние глюкозно-инсулинового обмена у пациентов с МС не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности дополнительного назначения коэнзима Q₁₀ при статинотерапии пациентов с метаболическим синдромом, что позволяет минимизировать нежелательные эффекты аторвастатина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метаболический синдром / *Ред. Г.Е. Ройтенберг*. М.: МЕД-пресс-информ, 2007. 224 с.
2. Чазова И.Е., Мычка В.Б. Метаболический синдром. М.: Медиа-Медика, 2008. 324 с.
3. *Caballero A.E.* Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease // *Obes. Res.* 2003. 11. 1278–1289.
4. Диагностика и лечение метаболического синдрома: Российские рекомендации // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009. 8. (6, прил. 2). 28 с.
5. *Мкртумян А.М., Бирюкова Е.В.* Основной подход к фармакотерапии метаболического синдрома // *Cons. med.* 2006. 8. (5). 54–57.
6. *Лангсьон П.Х., Лангсьон А.М.* Медицинское применение ГМК-КоА-редуктазы и сопутствующий дефицит коэнзима Q₁₀. Обзор экспериментальных работ, выполненных на млекопитающих и человеке // *Рос. мед. журн.* 2007. 9. (15). 747–752.
7. *Ланкин В.З., Тихазе А.К., Каминная В.И. и др.* Интенсификация *in vivo* свободнорадикального окисления липопротеинов низкой плотности в плазме крови больных ИБС при терапии ингибитором НМГ-СоА-редуктазы правастатином и подавление пероксидации убихиноном Q₁₀ // *Бюл. эксперим. биол. мед.* 2000. 129. (2). 176–179.
8. *Palomaki A., Malmiemi K., Metsa-Ketela T.* Enhanced oxidizability of ubiquinol and alpha-tocopherol during lovastatin treatment // *FEBS Letter.* 1997. 410 (2-3). 254–258.
9. *Tikhaze A., Lankin V., Konovalova G. et al.* Prevention of LDL free radical oxidation during atherosclerosis by different antioxidants // 10th Biennial Meeting of the Soc. for Free Radic. Res. Intern.: Abstr. Kyoto, 2000. 010–017.
10. *Rabmouni K., Correia M.L.G., Haynes W.G. et al.* Obesity – associated hypertension. New insights into mechanisms // *Hypertension.* 2005. (4). 9–14.
11. *Сусеков А.В., Горякова Н.Б.* Доказательная база аторвастатина – международные и отечественные исследования // *Cons. med.* 2008. 10 (11). 109–115.
12. *Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И.* Руководство по методам исследования параметров системы «перекисное окисление липидов – antioxidants защита» в биологических жидкостях. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2003. 80 с.
13. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: Наука/Интерпериодика, 2001. 343 с.
14. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др.* Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
15. *Голиков А.П., Бойцов А.П., Михин В.П. и др.* Свободнорадикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антиоксидантами // *Лечащий врач.* 2003. 4. 70–73.
16. *Доценко Н.Я., Малахова С.Н.* Эффективность комбинированной гиполипидемической терапии у пациентов с ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью // *Ліки України,* 2008 (http://www.health-medix.com/articles/liki_ukr/2008-12-17/78-81_Dotsenko.pdf)
17. *Артамошина Н.Е.* Антиоксидантный статус и коррекция его нарушений при лечении статинами у больных ишемической болезнью сердца с дислипидемией: автореф. дис... канд. мед. наук. М., 2009.

COMBINED ADMINISTRATION OF THE ATORVASTATIN AND ANTIOXIDANT COENZYME Q₁₀ AT METABOLIC SYNDROME

**Natalia Sergeevna YUBITSKAYA, Marina Vladimirovna ANTONYUK,
Vera Innokent'evna YAN'KOVA**

*Vladivostok Affiliation of the Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology
of Respiration of the SB RAMS – Institute of Medical Climatology and Rehabilitation
690105, Vladivostok, Russkay str., 73g*

The dynamics of the glucose-insulin homeostasis condition and lipoperoxidation processes in patients with metabolic syndrome against the administration of the atorvastatin and its combination with coenzyme Q₁₀ have been investigated. It is found out that atorvastatin depresses antioxidant system, as well as stimulates the increase of insulin resistance at metabolic syndrome. Atorvastatin and coenzyme Q₁₀ combined therapy improves antioxidant defense that results in leveling of intensification of the free radical lipid oxidation, induced by the administration of statin, as well as exerts no negative influence on the carbohydrate metabolism condition in patients with metabolic syndrome. The aforesaid finding proves the expediency of administration of coenzyme Q₁₀ with statin therapy.

Key words: metabolic syndrome, statins, antioxidants, lipid peroxidation.

*Yubitskaya N.S. – candidate of medical sciences, researcher of laboratory of rehabilitative treatment,
e-mail: natalia.yb@mail.ru*

*Antonyuk M.V. – doctor of medical sciences, head of the laboratory of rehabilitative treatment,
e-mail: antonyukm@mail.ru*

Yan'kova V.I. – candidate of biological sciences, scientific secretary, e-mail: jankova_nch@list.ru

ОПТИМИЗАЦИЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

Татьяна Анатольевна КАНТУР¹, Юлия Константиновна КАРАМАН¹,
Наталья Владимировна ЖУКОВА²

¹ Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания
СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения
690105, г. Владивосток, ул. Русская, 73-г

² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН
690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Изучен липидный состав сыворотки и эритроцитов крови у больных артериальной гипертонией. Особенности модификации эритроцитарных жирных кислот явились обоснованием оптимизации комплекса восстановительного лечения артериальной гипертонии путем применения мембранотропной терапии. Доказано, что применение биологически активной добавки, содержащей ω 3-полиненасыщенные жирные кислоты, алкилдиацилглицериды, биоантиоксиданты (витамин Е, провитамин А), в комплексе с магнитолазеротерапией корректирует состав сывороточных липидов, оказывает мембранотропное действие, повышает клинико-метаболическую эффективность медикаментозной гипотензивной терапии.

Ключевые слова: артериальная гипертония, жирные кислоты, дислипидемия, восстановительное лечение.

Развитие артериальной гипертонии (АГ) обусловлено взаимодействием огромного количества факторов как внешней, так и внутренней среды организма. К настоящему времени получено большое количество данных, свидетельствующих о роли в патогенезе АГ нарушений нейрогенной регуляции кровообращения, повышения активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, эндотелиальной дисфункции, инсулинорезистентности [1]. Исследования ряда авторов свидетельствуют о том, что модификация жирно-кислотного состава липидного матрикса мембран, дефицит эссенциальных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) приводят к снижению отрицательного заряда мембраны, увеличению ее микровязкости, активации синтеза провоспалительных эйкозаноидов и повышению чувствительности гладкомышечных клеток стенки артерии к действию вазоконстрикторов, а следовательно – к развитию АГ [2, 3].

Несмотря на широкий спектр фармакологических средств, направленных на коррекцию различных звеньев патогенеза АГ, проблема

лечения такой категории больных имеет много сложных и нерешенных вопросов. Значительная часть пациентов с АГ нуждаются в постоянном применении комбинации гипотензивных препаратов различных групп. Длительное использование нескольких медикаментозных средств приводит к аллергизации организма, развитию фармакорезистентной зависимости, нарушениям липидного и углеводного обменов, гиперурикемии и другим нежелательным эффектам. Отмена лекарств часто вызывает обострение и прогрессирование заболевания. Все это подтверждает не только целесообразность рациональной индивидуальной фармакотерапии, но и необходимость применения восстановительного лечения, высокая эффективность, доступность, отсутствие побочных действий которого дает возможность максимально дополнить эффекты медикаментозной терапии. Особенностью методов восстановительного лечения и несомненным их преимуществом является общее саногенное действие, а не влияние на отдельные компоненты заболевания. При этом

Кантур Т.А. – к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения;

e-mail: kanturovichi@yandex.ru

Караман Ю.К. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований

Жукова Н.В. – д.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии

методы восстановительного лечения не противопоставляются медикаментозным, их включение в комплекс терапевтических мероприятий будет лишь усиливать общий лечебный эффект и предупреждать развитие тяжелых осложнений заболевания.

Учитывая вышеперечисленное, патогенетически обоснованным в восстановительном лечении АГ является применение физиотерапевтических методов и препаратов ПНЖК ω -3.

В физиотерапевтической практике лечения АГ хорошо себя зарекомендовала магнитолазеротерапия (МЛТ). Действие МЛТ при АГ носит генерализованный характер, обеспечивая синдромо-патогенетический эффект на уровне целостного организма. Эффект МЛТ связан с устранением дисбаланса нейрогуморальных систем регуляции артериального давления, улучшением реологических свойств крови, коррекцией показателей гемодинамики и сывороточных липидов [4–6]. Однако МЛТ способствует уменьшению уровня насыщенных жирных кислот в мембранах клеток, но в то же время усугубляет дефицит ПНЖК, что подчеркивает необходимость оптимизации восстановительного лечения больных АГ дополнительным включением в рацион больных источника этих кислот [9].

В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что включение в схемы лечения больных АГ препаратов ПНЖК ω -3 положительно влияет на уровень артериального давления, оказывает гиполипидемическое, гипокоагуляционное и вазодилатирующее действие [7–9].

Целью настоящего исследования явилось изучение клинко-метаболического действия комплекса восстановительного лечения у больных АГ, включающего эналаприл, алиментарные ПНЖК и магнитолазеротерапию.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 60 больных с гипертонической болезнью I–II стадии, АГ 1–2 степени в возрасте от 30 до 60 лет ($47,82 \pm 1,49$), из них 20 мужчин и 40 женщин. Диагноз АГ устанавливали на основании рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов (2007). В группы включали пациентов, давших информированное согласие на проведение обследования и лечения. Исследование проводилось в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации (2000). Критерием включения в группы был верифицированный диагноз АГ 1–2 степени, при этом исключали пациентов с АГ и ассоциированными состояниями в виде сахар-

ного диабета, заболеваниями почек, сердца, периферических артерий.

Все участники исследования получали базовую гипотензивную терапию ингибитором ангиотензинпревращающего фермента (эналаприл 10 мг/сут), которая не менялась в ходе исследования. Больные были рандомизированы на 2 сопоставимые по половозрастным, клинко-функциональным характеристикам группы. Пациенты 1-й группы ($n = 28$) получали ингибитор ангиотензинпревращающего фермента утром ежедневно, 2-й ($n = 32$) – ингибитор ангиотензинпревращающего фермента утром ежедневно, биологически активную добавку к пище «Крусмарин» по 5 капсул 3 раза в день во время еды в течение 21 дня и МЛТ в первой половине дня ежедневно, курс 10 процедур.

Методика МЛТ включала последовательное воздействие на паравerteбральные точки С4–С6, область затылочной ямки, почек и печени [10]. Данная методика имеет разрешение на применение (ФС № 2011/011 от 03.02.2011 г.)

В качестве источника ПНЖК была использована биологически активная добавка «Крусмарин» (ТУ 9281-007-00038155-05, производитель ООО «Биополимеры», г. Владивосток), представляющая собой фракцию выделенных из гепатопанкреаса камчатского краба (*Paralithodes camtschatica*) липидов, в состав которых входит по 20 % ω 3-ПНЖК и алкил-диацилглицеридов, комплекс биоантиоксидантов (альфа-токоферол, бета-каротин) [11]. Суточная доза ω 3 ПНЖК составляла 1 г.

Всем пациентам проводилось офисное измерение артериального давления, определение липидного статуса и состава жирных кислот (ЖК) липидов эритроцитов исходно и через 21 день после начала терапии.

Лабораторные методы обследования включали определение уровня общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности, триглицеридов. Данные показатели определяли на биохимическом анализаторе Фотометр ФМ 750 (Германия) с помощью наборов фирмы «Ольвекс» (Россия). По формулам рассчитывали уровни холестерина липопротеидов низкой плотности, индекс атерогенности.

Для оценки структурно-функционального состояния клеточных мембран определяли состав жирных кислот липидов эритроцитов. Экстракцию липидов из эритроцитов крови проводили методом Bligh и Dyer [12]. Метилловые эфиры ЖК получали по методу Casteau и Duback [13], анализировали на газожидкостном хроматографе Shimadzu GC-17A, снабженном пламенно-ионизационным детектором и капил-

лярной колонкой (0,25 мм × 30 м) с привитой фазой Supelcowaх 10. Метилловые эфиры ЖК идентифицировали по времени удерживания с использованием стандартов и по значениям углеродных чисел [14]. Результаты выражали в относительных процентах от общей суммы ЖК.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента (при нормальном распределении), достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика показателей артериального давления и липидного спектра сыворотки крови у обследованных больных с АГ представлена в табл. 1. У больных АГ отмечалось повышение концентрации общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности и индекса атерогенности.

Качественный состав ЖК липидов эритроцитов больных АГ представлен насыщенными, моноеновыми и полиеновыми кислотами с длинной углеродной цепи от C_{12} до C_{22} (табл. 2).

Анализ жирно-кислотного состава мембран эритроцитов у больных АГ выявил выраженные изменения в количественном составе насыщенных ЖК. Установлено накопление пентадекановой (15:0), пальмитиновой (16:0) и олеиновой

(18:1 ω 9) кислот. Обнаружено увеличение относительного уровня кислоты Мида (20:3 ω 9), компенсаторный синтез которой происходит при дефиците полиеновых кислот семейства ω 6 и ω 3. Изменения в составе ПНЖК носят выраженный характер, особенно это касается кислот ω 3-строения. Дефицит полиеновых жирных кислот семейства ω 3 подтвержден достоверным снижением доли докозапентаеновой (22:5 ω 3) и докозагексаеновой (22:6 ω 3) ПНЖК. Отмечено повышение уровня предшественника эйкозаноидов с вазоконстрикторными эффектами – арахидоновой кислоты (20:4 ω 6), что является признаком недостатка полиеновых кислот семейства ω 3.

Анализ показателей, характеризующих активность ферментов метаболизма ЖК, отразившийся в снижении соотношения 20:4 ω 6/20:3 ω 6, указывает на угнетение метаболизма эйкозатриеновой кислоты. Обнаруженные изменения соотношения 20:4 ω 6/20:5 ω 3 и 20:4 ω 6/22:6 ω 3 свидетельствуют об имеющемся дисбалансе в эйкозаноидном цикле и увеличении синтеза оксипиринов с выраженными вазоконстрикторными (тромбоксан А2) и провоспалительными (лейкотриен В4) свойствами [2, 3].

Результаты клинико-биохимического исследования показали существенные нарушения липидного обмена у больных АГ, проявляющиеся накоплением атерогенных фракций липидов в крови, патологической модификацией состава жирных кислот липидов эритроцитов, индуцирующих развитие АГ.

Таблица 1

Динамика клинико-биохимических показателей у больных АГ на фоне проводимого лечения, $M \pm m$

Показатель	1-я группа (n = 28)		2-я группа (n = 32)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Систолическое АД, мм рт. ст.	149,09 ± 1,7	138,45 ± 1,45***	140,5 ± 1,00	118,9 ± 1,3***
Диастолическое АД, мм рт. ст.	92,72 ± 1,1	79,03 ± 3,12***	88,91 ± 0,77	78,9 ± 1,5***
Содержание общего холестерина, ммоль/л	5,79 ± 0,06	5,79 ± 0,37	5,79 ± 0,06	4,66 ± 0,15***
Содержание триглицеридов, ммоль/л	1,43 ± 0,09	1,33 ± 0,14	1,44 ± 0,03	1,42 ± 0,09
Содержание холестерина липопротеидов высокой плотности, ммоль/л	1,23 ± 0,05	1,3 ± 0,06	1,14 ± 0,01	1,26 ± 0,06*
Содержание холестерина липопротеидов низкой плотности, ммоль/л	3,47 ± 0,12	3,39 ± 0,13	4,00 ± 0,06	2,95 ± 0,17***
Индекс атерогенности	3,49 ± 0,2	3,15 ± 0,18	4,35 ± 0,09	3,5 ± 0,3**

Примечание. Здесь и в табл. 2 отличие от величины соответствующего показателя до лечения статистически значимо: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$.

Динамика содержания жирных кислот липидов эритроцитов больных АГ на фоне проводимого лечения, $M \pm t$

Содержание ЖК (% от общей суммы ЖК)	1-я группа (n = 28)		2-я группа (n = 32)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
14:0	0,41 ± 0,04	0,58 ± 0,04**	0,41 ± 0,04	0,34 ± 0,02###
15:0	0,41 ± 0,05	0,45 ± 0,05	0,41 ± 0,05	0,17 ± 0,01***,###
16:0	25,90 ± 0,42	25,69 ± 0,22	25,90 ± 0,42	24,59 ± 0,43*.,##
16:1ω7	0,85 ± 0,09	0,42 ± 0,09**	0,85 ± 0,09	0,63 ± 0,05*.,#
17:0	0,42 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,31 ± 0,02***,###
18:0	17,03 ± 0,39	16,89 ± 0,29	17,03 ± 0,39	15,82 ± 0,59
18:1ω9	15,02 ± 0,32	14,36 ± 0,29	15,02 ± 0,32	15,28 ± 0,35#
18:1ω7	1,60 ± 0,06	Следы	1,60 ± 0,06	1,49 ± 0,06
18:2ω6	14,5 ± 0,2	13,9 ± 0,2*	14,5 ± 0,2	14,58 ± 0,42
18:3ω6	2,10 ± 0,54	1,89 ± 0,42	2,10 ± 0,54	0,66 ± 0,10*.,##
20:2ω6	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,23 ± 0,02
20:3ω6	1,34 ± 0,05	1,14 ± 0,05**	1,34 ± 0,05	1,43 ± 0,04###
20:3ω9	0,88 ± 0,18	0,78 ± 0,05	0,88 ± 0,18	Следы
20:4ω6	13,18 ± 0,18	11,29 ± 0,24***	13,18 ± 0,18	12,48 ± 0,51#
20:5ω3	1,32 ± 0,10	0,98 ± 0,10*	1,32 ± 0,10	1,78 ± 0,18*.,###
22:4ω6	1,89 ± 0,13	1,94 ± 0,11	1,89 ± 0,13	2,3 ± 0,1*.,#
22:5ω6	Следы	0,17 ± 0,01***	Следы	Следы
22:5ω3	1,81 ± 0,08	1,79 ± 0,07	1,81 ± 0,08	2,36 ± 0,15***,##
22:6ω3	4,18 ± 0,40	4,32 ± 0,30	4,18 ± 0,40	6,20 ± 0,14***,###
Сумма 20-22ω6	14,38 ± 0,41	14,81 ± 0,39	14,38 ± 0,41	15,34 ± 0,32
Сумма 20-22ω3	7,70 ± 0,55	7,09 ± 0,23	7,70 ± 0,55	9,9 ± 0,59***,###
20-22ω3/20-22ω6	0,50 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,65 ± 0,04*.,###
Сумма ω6	30,2 ± 0,4	30,6 ± 0,5	30,2 ± 0,4	30,53 ± 0,68
Сумма ω3	7,5 ± 0,7	7,09 ± 0,61	7,5 ± 0,7	9,71 ± 0,57***,##
ω3/ω6	0,26 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,34 ± 0,03##
22:6ω3/22:5ω3	2,26 ± 0,15	2,41 ± 0,11	2,26 ± 0,15	2,82 ± 0,16*.,#
20:4ω6/22:6ω3	2,53 ± 0,13	2,61 ± 0,18	2,53 ± 0,13	2,34 ± 0,16
20:4ω6/20:3ω6	8,54 ± 0,31	9,90 ± 0,29**	8,54 ± 0,31	9,9 ± 0,62
20:4ω6/20:5ω3	8,01 ± 0,42	11,52 ± 0,67***	8,01 ± 0,42	13,52 ± 1,65**
Индекс ненасыщенности, у. е.	157,9 ± 1,9	148,09 ± 2,1**	157,9 ± 1,9	168,36 ± 3,40***,###

Примечание. Отличие от величины соответствующего показателя 1-й группы статистически значимо: # – при $p < 0,05$, ## – при $p < 0,01$, ### – при $p < 0,001$.

В 1-й группе больных, получавших гипотензивную терапию, отмечена стабилизация артериального давления. Изменений в липидном профиле сыворотки крови не выявлено, что связано с отсутствием метаболического действия применяемого в данном исследовании гипотензивного препарата. При изучении жирно-кислотного состава мембран эритроцитов на фоне проводимого лечения в 1-й группе больных установлено увеличение уровня миристиновой

кислоты (14:0) на 29 % ($p < 0,01$). Выявленный дисбаланс в содержании эссенциальных и основных физиологически важных полиеновых кислот до лечения продолжал усугубляться и после проведенной терапии, подтверждением чего явилось снижение уровня кислот семейства ω6 – линолевой (18:2ω6, $p < 0,05$), дигомо-γ-линоленовой (20:3ω6, $p < 0,01$), арахидоновой (20:4ω6, $p < 0,001$) и эйкозапентаеновой (20:5ω3, $p < 0,05$). Закономерным следствием

эндогенного дефицита $\omega 6$ - и $\omega 3$ -ПНЖК у больных 1-й группы стало снижение интегрального показателя метаболизма ЖК – индекса ненасыщенности жирных кислот на 6 % ($p < 0,01$). Из результатов исследования следует, что лечение пациентов с АГ ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента не оказывает мембранотропного эффекта. Напротив, установлено нарушение состава липидного компонента клеточной мембраны, проявившееся в снижении ее ненасыщенности.

Анализ изменений уровня артериального давления при комплексном восстановительном лечении показал положительную динамику объективных данных у пациентов с АГ. У больных 2-й группы отмечалось снижение артериального давления (систолического – на 16 %, $p < 0,001$, диастолического – на 11,3 %, $p < 0,001$), сопоставимое с динамикой уровня АД у больных 1-й группы (см. табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют, что разработанный нами лечебный комплекс способствовал достоверному уменьшению уровня общего холестерина, содержания холестерина липопротеидов низкой плотности и сохранению нормальных значений холестерина липопротеидов высокой плотности, что привело к снижению атерогенных свойств крови.

Курсовое применение МЛТ и ПНЖК на фоне базовой гипотензивной терапии у пациентов 2-й группы способствовало снижению уровня насыщенных ЖК: пентадекановой (в 2,5 раза, $p < 0,001$), пальмитиновой (на 7 %, $p < 0,05$), маргариновой (на 26 %, $p < 0,001$) (см. табл. 2). Высокое содержание в «Крусмарине» полиеновых кислот семейства $\omega 3$ способствовало устранению дефицита эйкозапентаеновой ЖК (20:5 $\omega 3$), содержание которой повысилось на 29 % ($p < 0,05$), нормализации количества докозапентаеновой (22:5 $\omega 3$) и докозагексаеновой (22:6 $\omega 3$) ЖК (их концентрация увеличилась на 23 % ($p < 0,01$) и 35,5 % ($p < 0,001$) соответственно). Повышение доли длинноцепочечных высоконенасыщенных ЖК семейства $\omega 3$ отразилось и на возрастании суммарного содержания ЖК (сумма 20-22 $\omega 3$, сумма $\omega 3$). Индекс ненасыщенности жирных кислот превысил значения в группе больных до лечения, что свидетельствует о высокой способности лечебного комплекса эффективно модифицировать липидный состав клеточной мембраны [15].

Результаты исследования показали высокую терапевтическую эффективность комплекса восстановительного лечения МЛТ и ПНЖК у пациентов с АГ. Достижение целевых показателей артериального давления и его стабилизация у

больных 2-й группы, с одной стороны, связаны со способностью МЛТ снижать активность пресорных гуморальных систем регуляцией уровня кортизола, ренин-ангиотензина и альдостерона в плазме крови, усиливать микроциркуляцию и улучшать реологические свойства крови [8, 16], с другой – благодаря действию биологически активной добавки – устранять дефицит биологически активных ПНЖК $\omega 3$ (эйкозапентаеновая, докозапентаеновая, докозагексаеновая кислоты) в мембранах клеток [4, 11]. Повышение содержания полиеновых кислот $\omega 3$ в липидном бислое клеточных мембран способствует образованию простаглицина и снижению синтеза тромбксана А₂, повышению высвобождения эндотелийзависимого фактора расслабления, активации системы окислительного фосфорилирования и ионного транспорта, имеющих большое значение для ликвидации актомиозиновых мостиков, удаления кальция мембранным насосом и снижения миогенного тонуса артерии [5, 6].

Выявленный гипополипидемический эффект комплекса восстановительного лечения можно объяснить непосредственным действием МЛТ на область печени, что способствует улучшению ее функционирования и запуску каскада механизмов, нормализующих показатели липидного обмена [17]. Кроме того, гипополипидемическое действие, вероятно, достигается благодаря ПНЖК, содержащимся в биологически активной добавке к пище. Гипохолестеринемический эффект $\omega 3$ -ПНЖК реализуется посредством модификации холестерина липопротеидов высокой плотности, что приводит к увеличению текучести их липидов, поступлению холестерина внутрь этих частиц и удалению холестерина из клетки [2, 18].

Установлен мембранотропный эффект комплекса МЛТ и «Крусмарин», обусловленный снижением уровня насыщенных и повышением содержания ненасыщенных ЖК в липидах эритроцитов, модуляцией структурно-функционального состояния эритроцитарных мембран, увеличением жидкостности и пластичности липидного бислоя. Большое количество полиеновых кислот $\omega 3$ в биологически активной добавке к пище закономерно способствовало устранению дефицита ПНЖК $\omega 3$ липидной компоненты клеточной мембраны у больных с АГ, улучшению текучести мембраны.

Обобщая представленные данные, можно заключить, что при разработке лечебного комплекса восстановительного лечения больных АГ – МЛТ и «Крусмарин» – были учтены основные патогенетические звенья развития АГ и возможные механизмы действия каждого со-

ставляющего комплекса, наличие синергических свойств. Установлена высокая эффективность терапевтических свойств лечебного комплекса, побочные эффекты выявлены не были, что дает основание рекомендовать МЛТ и биологически активную добавку к пище «Крусмарин» в восстановительном лечении больных АГ. Использование восстановительного комплекса МЛТ и «Крусмарин» позволяет корректировать жирнокислотный состав мембран клеток, воздействовать на гемодинамические и метаболические нарушения, что является обоснованным в терапии кардиоваскулярных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кобалава Ж.Д., Котовская Ю.В., Моисев В.С. Артериальная гипертензия. Ключи к диагностике и лечению. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 868 с.
2. Титов В.Н. Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы патогенеза, диагностики, профилактики и лечения атеросклероза. М.: Алтгус, 2002. 750 с.
3. Эндакова Э.А., Новгородцева Т.П., Светашев В.И. Модификация состава жирных кислот крови при сердечно-сосудистых заболеваниях. Владивосток: Дальнаука, 2002. 296 с.
4. Разумова А.Н., Князева Т.А., Бадтиева В.А. Гипотензивное и антиангинальное действие лазерной терапии // Лазерная медицина. 2001. 5. (1). 22–25.
5. Шульц Р.Ю., Орехова Э.М., Котенко К.В. Влияние различных режимов лазерной терапии на уровень артериального давления у больных артериальной гипертензией // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2006. (6). 58–60.
6. Кантур Т.А., Антонюк М.В., Иванов Е.М. Магнитолазерная терапия в восстановительном лечении больных артериальной гипертензией // Физиотерапия, бальнеология, реабилитация. 2009. (4). 19–21.
7. Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Виткина Т.И., Касьянов С.П. Сравнительная характеристика биологической активности жиров из гепатопанкреаса камчатского краба и печени командорского кальмара // Вестн. ДВО РАН. 2007. (6). 105–110.
8. Прохорович Е.А., Владимирова Н.Н. Полиненасыщенные жирные кислоты класса ω -3 в профилактике и лечении атеросклероза // Лечащий врач. 2006. (3). 24–27.
9. Титов В.Н., Дугин С.Ф., Дмитриев В.А., Кобылов М.А. Эссенциальные полиеновые жирные кислоты и артериальное давление. Механизм физиологического влияния // Клинич. лаб. диагностика. 2006. (11). 3–12.
10. Антонюк М.В., Кантур Т.А., Рудиченко Е.В. Магнитолазерная терапия в восстановительном лечении больных артериальной гипертензией с сопутствующими метаболическими нарушениями / Медицинская технология. Разрешение Росздравнадзора ФС № 2011/011 от 03.02.2011.
11. Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Касьянов С.П. и др. Влияние липидов гепатопанкреаса камчатского краба на метаболизм эссенциальных жирных кислот в условиях экспериментальной дислипидемии // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2007. (3). 15–19.
12. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. (37). 911–917.
13. Carreau J.P., Duback J.P. Adaptation of a macroscale method to the microscale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extract // J. Chromatogr. 1978. 151. 384–390.
14. Stransky K., Jursik T., Vitek A. An improved method of characterizing fatty acids by equivalent chain length values // J. High. Res. Chromatogr. 1992. 15. 730–740.
15. Потемкин В.В., Троицкая С.Ю., Максимова А.Г. Метаболические показатели и структура мембран эритроцитов при ожирении и метаболическом синдроме у женщин // Рос. мед. журн. 2006. (1). 35–38.
16. Пономаренко Г.Н., Воробьев М.Г. Руководство по физиотерапии. СПб.: Балтика, 2005. 400 с.
17. Кантур Т.А. Клинико-биохимическое обоснование оптимизации магнитолазеротерапии у больных гипертонической болезнью. LAP, Lambert Academic Publishing, 2011. 113 с.
18. Конь И.Я., Шилина Н.М., Вольфсон С.Б. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты в профилактике и лечении болезней детей и взрослых // Лечащий врач. 2006. (4). 55–59.

OPTIMIZATION OF REHABILITATION TREATMENT OF ARTERIAL HYPERTENSION

**Tat'yana Anatolievna KANTUR¹, Yuliya Konstantinovna KARAMAN¹,
Natal'ya Vladimirovna ZHUKOVA²**

¹ *Vladivostok Affiliation of the Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology
of Respiration of the SB RAMS – Institute of Medical Climatology and Rehabilitation
690105, Vladivostok, Russkaya str., 73-g*

² *Institute of Marine Biology n.a. A.V. Zhirmunsky
690041, Vladivostok, Palchevsky str., 17*

The lipid composition of serum and red blood cells in patients with arterial hypertension has been investigated. Features of modifications of erythrocyte fatty acids were the rationale for optimization of complex restorative treatment of hypertension by the use of membrane-tropic therapy. It has been proved that the use of a dietary ω 3 fatty acids, alkyl diacyl glycerides, bioantioxidants (vitamin E, provitamin A), among with magnetolaserotherapy corrects the composition of serum lipids, has membrane-tropic effect, increases the metabolic efficiency of clinical drug antihypertensive therapy.

Key words: hypertension, fatty acids, dyslipidemia, rehabilitation treatment.

Kantur T.A. – candidate of medical sciences, junior researcher of the laboratory of rehabilitative treatment,
e-mail: kanturovichi@yandex.ru

Karaman Yu.K. – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of biomedicine researches,
e-mail: karaman@inbox.ru

Zhukova N.V. – doctor of biological sciences, senior researcher of the laboratory of comparative biochemistry

РОЛЬ СИСТЕМЫ Fas И FasL В ИММУНООПОСРЕДОВАННЫХ МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ МЕДЛЕННО ПРОГРЕССИРУЮЩЕГО АУТОИММУННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У ВЗРОСЛЫХ (LADA)

Татьяна Владимировна САПРИНА, Татьяна Сергеевна ПРОХОРОЕНКО,
Феликс Эдуардович ЛАЗАРЕНКО, Анастасия Павловна ЗИМА,
Ольга Александровна ВАСИЛЬЕВА, Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА,
Ирина Николаевна ВОРОЖЦОВА

ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

В работе приведены данные, касающиеся вопросов патогенеза аутоиммунного сахарного диабета и его варианта – LADA (медленно прогрессирующего сахарного диабета у взрослых). Установлено, что одним из возможных механизмов длительного сохранения эндогенной секреции инсулина при LADA является активация Fas/FasL-опосредованного апоптоза иммуноцитов. Поскольку Th2-клетки устойчивы к данному механизму реализации апоптоза, можно предположить более активную элиминацию аутоагрессивных Th1-лимфоцитов из циркуляции, менее выраженную клеточно-опосредованную деструкцию инсулиноцитов и более «доброкачественное» течение инсулита при LADA.

Ключевые слова: аутоиммунный сахарный диабет, Fas, FasL, sFasL, LADA.

Сахарный диабет (СД) является гетерогенным заболеванием. По современной классификации он подразделяется на 1-й тип, 2-й тип, гестационный и другие типы СД [1]. В классификации аутоиммунного сахарного диабета выделяют классический СД 1-го типа (СД1) и латентный аутоиммунный диабет взрослых (Latent Autoimmune Diabetes in Adult, LADA), между которыми существует важное различие – более медленное повреждение β -клеток и более медленное повреждение β -клеток с развитием потребности в инсулинотерапии от 1 до 4–5 лет после дебюта СД. При этом LADA имеет схожую клиническую картину с СД 2-го типа (СД2), что затрудняет первичную диагностику и выбор адекватного метода сахароснижающей терапии у данной категории больных [1]. Однако не только трудности диагностики привлекают внимание эндокринологов к LADA, но и возможность использовать данную модель развертывания иммунологических событий для разработки и испытания средств фармакологи-

ческой и/или клеточной иммуоинтервенции при аутоиммунных заболеваниях в целом и при СД1 в частности.

Предшествующими исследованиями в экспериментальных моделях аутоиммунного сахарного диабета показано, что основным механизмом гибели островковых клеток является действие аутореактивных Т-лимфоцитов. Также было доказано, что активированные Т-лимфоциты вызывают гибель β -клеток двумя различными путями – опосредованным перфорин-гранзимом В либо Fas-рецепторами. Перфорин-гранзимовый путь клеточной гибели был доказан как в естественных, так и в индуцированных моделях развития сахарного диабета. Напротив, результаты изучения Fas-опосредованного пути гибели инсулинпродуцирующей паренхимы оказались в некоторой степени противоречивыми [2].

С одной стороны, сообщалось, что аутореактивные лимфоциты от мышей NOD (non obesity diabetes) не способны вызвать диабет у мышей-реципиентов с нокаутом гена Fas. Этот

Саприна Т.В. – к.м.н., ассистент кафедры эндокринологии и диабетологии, tvsaprina@sibmail.com

Прохоренко Т.С. – аспирант кафедры патологической физиологии, tatjana_sp@sibmail.com

Лазаренко Ф.Э. – аспирант кафедры эндокринологии и диабетологии, feliksi@yandex.ru

Зима А.П. – д.м.н., проф. кафедры фундаментальных основ клинической медицины, zima.a@mail.ru

Васильева О.А. – к.м.н., ассистент кафедры фундаментальных основ клинической медицины

Рязанцева Н.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины

Ворожцова И.Н. – д.м.н., проф., зав. кафедрой эндокринологии и диабетологии, abv@mail.tomsknet.ru

факт привел к утверждению важной роли Fas-опосредованного апоптоза β -клеток в индукции аутоиммунного сахарного диабета. С другой стороны, мыши с данной мутацией не являются подходящими для адекватной оценки событий по следующим соображениям – их лимфоциты конститутивно экспрессируют огромное количество FasL на своей мембране, что позволяет им выживать даже после воздействия летальных доз радиации [3].

Вследствие этого для уточнения роли Fas-зависимого апоптоза в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета была предложена модель с введением блокирующих FasL антител, что не вызывало других параллельных иммунологических феноменов, как у мышей с нокаутом гена Fas. Введение антител к FasL не влияло на частоту развития сахарного диабета у NOD мышей после введения им аутореактивных Т-лимфоцитов. Данная модель показала отсутствие значимой роли Fas-рецептора на поверхности аутореактивных Т-лимфоцитов в индукции апоптоза островковых клеток. Чтобы подтвердить, что отсутствие Fas на поверхности островковых клеток не препятствует их аутоиммунному повреждению, был проведен эксперимент с подсаживанием Fas-негативных островков мышам NOD. Островки полностью погибли через 4 недели и в них находили выраженную лимфоидную инфильтрацию, что опять же подтвердило факт, что экспрессия Fas на поверхности β -клеток не является строго необходимой для индукции ее аутоиммунного повреждения [4].

С другой стороны, сохранялся парадокс – почему диабет не может быть перенесен мышам с нокаутом гена Fas, несмотря на то, что Fas не играет критической роли в индукции аутоиммунного инсулита? Как уже было замечено, у мышей с данной мутацией развивается параллельно другой иммунологический феномен – экспрессия огромного количества FasL на поверхности лимфоцитов. Снижение количества FasL-экспрессирующих лимфоцитов, вызванное тимусэктомией у новорожденных мышей, все-таки способствовало развитию аутоиммунного инсулита. И, наоборот, введение FasL-несущих лимфоцитов от мышей с нокаутом гена Fas полностью аннулировало развитие диабета у мышей, которым вводились аутореактивные Т-лимфоциты от NOD мышей. Это окончательно позволило заключить следующее – FasL-экспрессирующие лимфоциты способны предотвратить развитие (перенос) заболевания, и FasL не является основной эффекторной молекулой гибели β -клетки. Эти эксперименты привели к осознанию того, что FasL может быть

рассмотрен с позиции терапевтической мишени для снижения риска индукции аутоиммунного инсулита, так как может вызывать Fas-опосредованный апоптоз аутореактивных Т-лимфоцитов. Непосредственно клетки, несущие FasL, использоваться для этого не могут, так как их введение вызывает фульминантный гепатит у мышей. Другой подход с использованием метода обработки растворимым человеческим (!) FasL (sFasL) диабетогенных Т-лимфоцитов *ex vivo* оказался более эффективным и показал значительное ослабление переноса аутоиммунного сахарного диабета в эксперименте на мышах [5].

Однако нельзя однозначно экстраполировать экспериментальные данные на развитие аутоиммунного сахарного диабета у человека. В отличие от мышинных моделей, где sFasL не оказывает влияние на элиминацию аутореактивных клонов лимфоцитов, так как не обладает апоптотической активностью, в организме человека sFasL способствует элиминации Т-лимфоцитов «памяти» (CD45RB_{low}) из циркуляции, что, естественно, может изменять темпы развития и выраженность аутоиммунного инсулита. В отличие от экспериментальных моделей аутоиммунного диабета, данных об участии системы Fas/FasL/sFasL в развитии аутоиммунного сахарного диабета у человека крайне скудны, и нами не найдено источников по данной проблеме при разновидности СД1 – LADA. Сохраняющаяся неоднозначность роли sFasL в патогенезе аутоиммунных заболеваний и канцерогенеза отражена в исследовании, в котором авторы вывели две линии мышей с нокаутом либо мембранной, либо растворимой формы FasL. Исследователи пришли к выводу о том, что на апоптоз аутореактивных лимфоцитов влияет только мембраносвязанная форма FasL и, наоборот, избыток sFasL может способствовать развитию аутоиммунных реакций и канцерогенезу [6].

Таким образом, является актуальным изучение системы Fas/FasL/sFasL при различных клинических вариантах аутоиммунного сахарного диабета с целью формирования теоретических основ создания иммуноинтервенционных клеточных и молекулярных технологий для первичной профилактики сахарного диабета 1-го типа или модуляции темпов аутоиммунного инсулита с целью длительного сохранения эндогенной секреции инсулина при LADA.

Цель исследования – установить особенности системы Fas/FasL/sFasL при различных клинических вариантах аутоиммунного сахарного диабета – с классическим (манифестным) началом и латентным течением (LADA).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе приведены результаты обследования 135 пациентов (средний возраст $41,1 \pm 1,0$ года), в числе которых 72 женщины и 63 мужчины. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской Декларации (2000 г.). Диагноз сахарного диабета устанавливался на основании критериев ВОЗ (1999 г.).

Группу больных СД1 составили 37 человек, среди которых было 13 женщин и 24 мужчины (средний возраст $30,5 \pm 1,2$ года). Диагноз СД1 устанавливался на основании развития кетоацидоза в течение первых 6 месяцев от начала заболевания, персистирующей потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и достижения метаболической компенсации.

Группа пациентов СД2 после скрининга аутоиммунного диабета (исключения лиц, позитивных по аутоантителам) включала 67 человек (40 женщин и 27 мужчин), средний возраст $46,8 \pm 1,1$ года. Диагноз СД2 устанавливался на основании наличия маркеров метаболического синдрома, постепенного начала заболевания без развития кетоацидоза, отсутствия потребности в инсулинотерапии после острой метаболической декомпенсации в дебюте заболевания и достижения метаболической компенсации на фоне применения диеты, режима физических нагрузок и приема пероральных сахароснижающих препаратов как минимум в течение 6 месяцев от начала заболевания.

В группу пациентов LADA включен 31 человек, среди них было 19 женщин и 12 мужчин (средний возраст $41,4 \pm 2,1$ года). Диагноз LADA среди пациентов с первоначальным диагнозом СД2 предполагался на основании клинических критериев – острой манифестации в возрасте от 30 до 50 лет без развития кетоацидоза, отсутствия потребности в инсулинотерапии после ликвидации кетоза и достижения метаболической компенсации как минимум в течение 6 месяцев от начала заболевания. В качестве клинических критериев диагноза LADA также использовался индекс массы тела менее 25 кг/м^2 , отсутствие признаков метаболического синдрома, личный и семейный анамнез аутоиммунных заболеваний. В дальнейшем у этих пациентов проводилась верификация диагноза путем определения концентрации в сыворотке крови аутоантител к инсулину (IAA, insulin-autoantibody), к островковым клеткам (ICA, islet cell antibody), глутаматдекарбоксилазе (GAD, glutamic acid decarboxylase autoantibodies) методом ИФА.

Группы пациентов были сформированы таким образом, что стаж заболевания не превышал 6 лет, что позволило исключить уже вторичные по отношению к изучаемым параметрам эффекты микрососудистых осложнений сахарного диабета.

Контрольная группа включала 30 человек (средний возраст $45,3 \pm 5,6$ года) и была сопоставима по полу и возрасту с группами пациентов с СД, не страдавших аутоиммунными заболеваниями, с учетом аналогичных критериев исключения из программы исследования.

Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром натощак, стабилизированная гепарином.

Определение титра аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты, к клеткам островков Лангерганса и к инсулину в сыворотке проводили методом твердофазного ИФА по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Biomerica» (Германия) для GAD и ICA; «Orgentec» (Германия) для IAA). Определение содержания С-пептида в сыворотке, полученной утром натощак и на 120-й мин стандартного теста толерантности к смешанной пище (ТТСП), проводили методом твердофазного ИФА («AccuBind», США). Результаты учитывали с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 405 нм для GAD и ICA, 450 нм – для IAA и С-пептида. Концентрации GAD, IAA и С-пептида вычислялись автоматически по калибровочным кривым.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли на градиенте плотности фиколл-верографин. Для получения супернатантов выделенные клетки ресуспендировали в полной питательной среде, стандартизируя их количество до $2,0 \times 10^6/\text{мл}$. Для стимуляции мононуклеарных лейкоцитов в пробы вносили фитогемагглютинин («Difco», Германия) (10 мкг на 1 мл) с дальнейшей инкубацией клеточных суспензий в течение 24 ч.

Определение спонтанного и ФГА-стимулированного уровня растворимой формы Fas-лиганда (sFas-L) в супернатантах клеточных культур проводили с использованием твердофазного ИФА («Bender MedSystems GmbH», Австрия). Оптическую плотность измеряли с помощью планшетного фотометра «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Содержание лимфоцитов, несущих рецепторы Fas (CD95+) и FasL (CD95+L), определяли методом проточной лазерной цитометрии на цитометре BD FACS Canto^{™II} (США) с использованием фикоэритрин-меченных флуоресци-

рующих ($\lambda = 585$ нм) моноклональных антител («Beckman Coulter», США).

Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Уровень статистической значимости межгрупповых различий устанавливали при помощи вариационного анализа и критерия Ньюмена–Кейлса. При попарном сравнении независимых выборок использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили с помощью критерия Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался менее 0,05, при множественных сравнениях использовали поправку Бонферони. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$), а также в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q_1-Q_3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получены данные, касающиеся клинико-демографической характеристики изучаемых нозологий. СД1 манифестировал в среднем в возрасте $25,5 \pm 1,3$ года, причем отмечалась тенденция к «бимодальному» характеру распределения пациентов с СД1 в зависимости от возраста дебюта заболевания (с пиками в 15–20 и 30–35 лет). Дебют LADA приходился на $37,5 \pm 1,8$ года, а СД2 – $43,3 \pm 1,1$ года. В общей выборке регистрировалась прямая корреляционная зависимость между возрастом дебюта заболевания и величинами показателей, характеризующих степень абдоминально-висцерального ожирения: окружностью талии ($r = 0,36$, $p < 0,001$) и индексом массы тела ($r = 0,32$, $p < 0,001$). По уровню гликированного гемоглобина A1c пациенты с LADA не отличались достоверно как от больных с СД2, так и от пациентов с СД1.

Аутоантитела хотя бы одного типа (GAD, ICA или IAA) выявлены у 23 % пациентов с клиническим фенотипом СД2. Это согласуется с литературными данными относительно доли

LADA в структуре заболеваемости СД с клиническим фенотипом типа 2. Концентрация GAD и ICA и процент АТ-положительных пациентов были выше у пациентов с LADA, а концентрация IAA – в группе с СД1 с классическим дебютом. Одновременно два типа аутоантител присутствовало у 17,6 % пациентов с аутоиммунным СД, без статистически значимых различий между группами LADA и СД1 (табл. 1).

Антитела к GAD выявлены у 11,1 % пациентов с СД. Отмечена тенденция к более высокой их концентрации у пациентов с LADA, чем при СД1.

Антитела к поверхностному антигену β -клетки выявлены у 23 % пациентов с СД. Их концентрация была достоверно выше у пациентов с LADA, чем при СД1. Отмечена отрицательная корреляция уровня ICA с возрастом манифестации заболевания ($r = -0,36$, $p = 0,002$) и возрастом пациентов ($r = -0,32$, $p = 0,008$).

Антитела к инсулину (IAA) выявлены у 12,6 % пациентов с СД. Достоверных отличий концентраций IAA между группами пациентов с аутоиммунным СД выявлено не было. Отмечена отрицательная корреляция уровней IAA с возрастом манифестации заболевания ($r = -0,24$, $p = 0,048$).

Последние данные свидетельствуют, что дисрегуляция рецепторопосредованного апоптоза играет ключевую роль в патогенезе некоторых аутоиммунных заболеваний. В то время как дефекты апоптоза могут быть ответственны за неэффективную элиминацию аутореактивных лимфоцитов путем индуцированной активацией гибели (activation-induced cell death, AICD) в ходе терминации иммунного ответа, избыточная потеря клеток вносит свой вклад в дисфункцию ткани-мишени [7]. По существующим представлениям, в патогенез аутоиммунных заболеваний вовлечены как генетические дефекты путей реализации сигнала рецепторов смерти, так и их цитокин-опосредованная дисрегуляция [8].

Таблица 1

Частота выявления и концентрация GAD, ICA, IAA у пациентов с различным клиническим течением аутоиммунного сахарного диабета (классический и LADA)

Показатель		СД1 (n = 37)	LADA (n = 31)	Достоверность p
GAD	Частота, %	8,1	38,7	0,003
	Концентрация, Ме [Q_1-Q_3]	0,49 [0,41–0,58]	0,85 [0,53–1,38]	0,07
ICA	Частота, %	24,3	70,0	< 0,001
	Концентрация, Ме [Q_1-Q_3]	0,20 [0,14–0,36]	0,44 [0,35–0,56]	0,04
IAA	Частота, %	37,8	9,7	0,01
	Концентрация, Ме [Q_1-Q_3]	8,04 [5,33–8,83]	5,49 [5,02–6,30]	> 0,05

Активированные Т-клетки экспрессируют как CD95, так и CD95L. При завершении иммунного ответа они подвергаются CD95-опосредованному апоптозу [9]. Согласно данным ряда авторов, Th1-клетки преимущественно экспрессируют CD95L, и их AICD происходит по пути CD95, в то время как Th2-лимфоциты относительно устойчивы к опосредованной рецепторами смерти AICD и экспрессируют лишь мизерные количества CD95L. Однако они в больших количествах экспрессируют TRAIL и *in vitro* способны вызывать опосредованную им гибель Th1-клеток [9]. Делеция аутореактивных Т-клеток является CD95-опосредуемой и не нарушается при гиперэкспрессии Bcl-2. Таким образом, AICD отводят важную роль в поддержании иммунологической толерантности на периферии [10].

Согласно полученным данным, содержание лимфоцитов, экспрессирующих Fas (CD95+), в крови больных LADA составило $14,7 \pm 5,6\%$ и было статистически значимо выше, чем в группах пациентов с СД1 и СД2 (табл. 2). Данный факт свидетельствует о большей их готовности к Fas-опосредованному апоптозу и, возможно, о более эффективной AICD аутореактивных Т-лимфоцитов при LADA.

В отличие от Fas, экспрессия FasL ограничена активированными Т-лимфоцитами [11]. К настоящему времени утвердилось мнение, что помимо функции апоптоз-индуцирующего ли-

ганда FasL выполняет и рецепторные функции. Известно, что для того, чтобы Т-киллеры полностью реализовали свой пролиферативный и цитотоксический потенциал, необходим обратный сигнал от FasL. Напротив, в отношении CD4+ лимфоцитов обратный сигнал от FasL является ингибирующим и приводит к остановке клеточного цикла, предупреждающей клональную экспансию. Таким образом, «стимуляция» FasL потенциально противовоспалительна и специфична в отношении CD4+ лимфоцитов [12].

Содержание лимфоцитов, экспрессирующих FasL (CD95L+), в крови больных LADA составляло $86,7 \pm 6,8\%$, будучи достоверно выше, чем при СД1 и СД2. В то же время при LADA абсолютное содержание этих клеток было меньше, чем при СД1 (см. табл. 2). В общей выборке пациентов с СД увеличение количества лимфоцитов, несущих FasL, прямо коррелировало с повышением концентрации ICA ($r = 0,82$, $p < 0,05$), в свою очередь отметим, что максимальная концентрация данного вида аутоантител регистрировалась у пациентов с LADA (см. табл. 1). Положительная корреляционная связь данного показателя с уровнем ICA, вероятно, также отражает увеличение активности аутоиммунного процесса у пациентов с более высокой концентрацией ICA.

Растворимая форма FasL образуется путем альтернативного сплайсинга или протеолитического расщепления мембранной формы FasL

Таблица 2

Экспрессия Fas, FasL на лимфоцитах и продукция мононуклеарными лейкоцитами sFasL при сахарном диабете ($M \pm SD$)

Показатель	Контроль ($n = 30$)	Пациенты с сахарным диабетом		
		LADA ($n = 31$)	СД1 ($n = 37$)	СД2 ($n = 67$)
Fas (CD95+), %	$10,83 \pm 1,13$	$14,7 \pm 5,6^*$	$9,7 \pm 6,5$ $p_1 < 0,01$	$11,4 \pm 6,2$ $p_1 = 0,01; p_2 = 0,19$
Fas (CD95+), тыс./мл	150 ± 50	$269 \pm 120^*$	209 ± 200 $p_1 = 0,15$	218 ± 122 $p_1 = 0,06; p_2 = 0,78$
FasL (CD95L), %	$60,62 \pm 2,42$	$86,7 \pm 6,8^*$	$72,2 \pm 14,0^*$ $p_1 < 0,01$	$80,7 \pm 8,3^*$ $p_1 < 0,01; p_2 < 0,01$
FasL (CD95L), тыс./мл	1250 ± 224	$1462 \pm 326^*$	$1831 \pm 1024^*$ $p_1 = 0,06$	$1534 \pm 157^*$ $p_1 = 0,14; p_2 = 0,02$
Базальная продукция sFasL, нг/мл	Неопределяемая	$0,24 \pm 0,08^*$	$0,21 \pm 0,13^*$ $p_1 = 0,27$	$0,16 \pm 0,05^*$ $p_1 < 0,01; p_2 < 0,01$
ФГА-стимулированная продукция sFasL, нг/мл	Неопределяемая	$0,26 \pm 0,14^*$	$0,18 \pm 0,05^*$ $p_1 < 0,01$	$0,17 \pm 0,07^*$ $p_1 < 0,01; p_2 = 0,44$

Примечание. * – отличие от величины соответствующего показателя лиц контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$; p_1 – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя больных LADA, p_2 – уровень статистической значимости отличия от величины соответствующего показателя пациентов с СД1 (критерий Манна – Уитни).

(шеддинга) металлопротеиназами 3 и 7 [13, 14]. Шеддинг чаще всего является следствием активационных процессов, затрагивающих различные популяции клеток. Продемонстрировано, что шеддинг – высокоспецифическое и строго регулируемое событие, основанное на избирательной активации протеиназ. Экспрессия мембранных и растворимых форм антигенов имеет различные механизмы регуляции, а повышение экспрессии мембранного антигена не обязательно влечет за собой увеличение содержания растворимой формы антигена во внеклеточном пространстве, и наоборот [13, 14].

Хотя Fas связывается как с мембранной, так и с растворимой формой FasL, лишь первая вызывает его активацию [13, 14]. С одной стороны, sFasL конкурирует с мембранной формой за рецепторное связывание и, таким образом, выступает ее антагонистом [13, 14], с другой стороны, sFasL может выступать агонистом Fas при связывании с компонентами внеклеточного матрикса [12]. Более того, sFasL является хемоаттрактантом и привлекает нейтрофилы и макрофаги [12]. Растворимая форма FasL связывается с Fas-рецептором и запускает апоптотический сигнал в несущих на своей поверхности Fas клетках. Таким образом, изменение активности системы Fas/FasL играет важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний [7, 9].

Продукция мононуклеарными лейкоцитами sFasL также была максимальной при LADA (см. табл. 2), что не только отражает общее повышение экспрессии мембранной формы FasL, но и может косвенно указывать на ингибирование Fas-опосредованного апоптоза β -клеток при LADA.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, вышеописанные изменения в экспрессии Fas/FasL на мононуклеарных лейкоцитах крови и продукции sFasL указывают на значимый вклад данной системы в иммунопатогенез аутоиммунного сахарного диабета. Особенностью LADA является повышение экспрессии мембранных Fas/FasL, вследствие чего можно регистрировать максимальную степень активации Т-клеток у пациентов с LADA в сравнении с другими вариантами СД. Взаимосвязь системы Fas/FasL с параметрами продукции аутоантител к клеткам островков Лангерганса может указывать на продолжающуюся аутоиммунную агрессию против данной ткани, в отличие от СД1 классического течения (с фульминантно протекающим инсулитом, быстрой гибелью β -клеток и уменьшением актив-

ности аутоиммунного воспаления в островках Лангерганса вследствие потери антигена) и СД2 (отсутствие аутоиммунного процесса в патогенезе заболевания).

Вследствие устойчивости Th2-клеток к Fas-индуцированному апоптозу можно предположить, что в иммунопатогенезе LADA значимую роль играет процесс повышенной элиминации Th1-клеток из циркуляции вследствие активации апоптоза с участием Fas/FasL при LADA. В совокупности данные иммунологические изменения могут определять «доброкачественное» течение аутоиммунного инсулита и сохранение эндогенной секреции инсулина на достаточно длительный период времени при медленно прогрессирующем аутоиммунном сахарном диабете (LADA).

Исследования выполнены при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК № 16.512.11.2087); Гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ (ГК № НШ-614.2012.7)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / *Ред. И.И. Дедов, М.В. Шестакова*. Вып. 4. 2009. 103 с.
2. *Lee M.S.* Cytokine synergism in apoptosis: its role in diabetes and cancer // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2002. 35. 54–60.
3. *Mohamood A.S., Guler M.L., Xiao Z. et al.* Protection from autoimmune diabetes and T-cell lymphoproliferation induced by FasL mutation are differentially regulated and can be uncoupled pharmacologically // *Am. J. Pathol.* 2007. 171. 97–106.
4. *Kim Y.-H., Kim S., Kim K.-A. et al.* Apoptosis of pancreatic β -cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes // *Eur. J. Immunol.* 1999. 29. 455–465.
5. *Kim S., Kim K.-A., Hwang D.-Y. et al.* Inhibition of autoimmune diabetes by Fas ligand: the paradox is solved // *J. Immunol.* 2000. 164. 2931–2936.
6. *Kim S., Ki J.Y., Lee T.H. et al.* Soluble Fas ligand-susceptible «memory» cells in mice but not in human: potential role of soluble Fas ligand in deletion of auto-reactive cells // *Autoimmunity.* 2002. 35. 15–20.

7. Потаннев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. (4). 237–243.
8. Fas S.C., Fritzsching B., Suri-Payer E., Krammer P.H. Death receptor signaling and its function in the immune system // Curr. Dir. Autoimmun. 2006. 9. 1–17.
9. Krueger A., Fas S.C., Baumann S., Krammer P.H. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis // Immunol. Rev. 2003. 193. 58–69.
10. Roberts A.I., Devadas S., Zhang X. et al. The role of activation-induced cell death in the differentiation of T-helper-cell subsets // Immunol. Res. 2003. 28. 285–293.
11. Todaro M., Zeuner A., Stassi G. Role of apoptosis in autoimmunity // J. Clin. Immunol. 2004. 24. 1–11.
12. Новиков В.В., Барышников А.Ю., Карaulов А.В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. 2007. (4). 249–253.
13. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптотической смерти клеток // Гематол. трансфузиол. 2002. 47. (2). 35–40.
14. Фильченков А.А., Степанов Ю.М., Лукин В.М. и др. Участие системы Fas/Fas-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы // Аллергол. иммунол. 2002. (1). 24–25.

THE ROLE OF Fas AND FasL IN IMMUNE-MEDIATED MECHANISMS OF DEVELOPMENT OF SLOW PROGRESSING AUTOIMMUNE DIABETES MELLITUS AT ADULTS (LADA)

Tatyana Vladimirovna SAPRINA, Tatyana Sergeevna PROKHORENKO, Feliks Eduardovich LAZARENKO, Anastasiya Pavlovna ZIMA, Olga Aleksandrovna VASILEVA, Nataliya Vladimirovna RYAZANTSEVA, Irina Nikolaevna VOROZHTSOVA

*Siberian State Medical University, Minzdravsostrazvitie
634050, Tomsk, Moskovski trakt, 2*

The data on the pathogenesis of autoimmune problems of diabetes and its variants – LADA (latent autoimmune diabetes in adults) have been presented. It is established that one of the possible mechanisms of long-term preservation of endogenous insulin secretion in LADA is the activation of Fas / FasL apoptotic immune cells. Since Th2-cells are resistant to this mechanism, apoptosis, one can assume a more active elimination of autoaggressive Th1-lymphocytes from the circulation, less pronounced cell-mediated destruction β -cells and more «benign» course of insulinitis at LADA patients.

Keywords: autoimmune diabetes, Fas, FasL, sFasL, LADA.

*Saprina T.V. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for endocrinology and diabetology,
e-mail: tvsaprina@sibmail.com*

Prokhorenko T.S. – postgraduate student of the chair pathological physiology, e-mail: tatjana_sp@sibmail.com

Lazarenko F.E. – postgraduate student of the chair for endocrinology and diabetology, e-mail: feliksi@yandex.ru

*Zima A.P. – doctor of medical sciences, professor of the chair for fundamental principals of clinical medicine,
e-mail: zima.a@mail.ru*

Vasileva O.A. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for fundamental principals of clinical medicine

Ryazantseva N.V. – doctor of medical sciences, head of the chair for fundamental principals of clinical medicine

*Vorozhtsova I.N. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for endocrinology and diabetology,
e-mail: abv@mail.tomsknet.ru*

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ, ПРИШЛЫХ ЖИТЕЛЕЙ СЕВЕРА, СОЧЕТАННОЙ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

**Юрий Алексеевич НИКОЛАЕВ, Маргарита Маиловна ГЕВОРГЯН,
Татьяна Владимировна КОЗАРУК, Анна Павловна КУЗНЕЦОВА,
Владимир Яковлевич ПОЛЯКОВ**

*ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

На базе клиники ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» СО РАМН (г. Новосибирск) обследовали 88 пациентов с артериальной гипертензией (АГ) II–III стадии, I–II степени и заболеваниями гепатобилиарной системы (ГБС), из которых 67 человек постоянно проживали в умеренных широтах (г. Новосибирск), а 21 – на Севере (Республика Саха (Якутия)). Все обследованные были в возрасте от 20 до 60 лет. Изучали особенности клинико-биохимических и иммунологических показателей и их взаимосвязей со стадией болезни у больных артериальной гипертензией с заболеваниями ГБС на Севере. При сравнении величин иммунологических показателей обнаружено снижение иммунной резистентности у больных АГ с заболеваниями ГБС, проживающих на Севере, по сравнению с пациентами, находящимися в умеренных широтах. Установлена взаимосвязь ряда биохимических и иммунологических показателей со стадией АГ. Полученные данные свидетельствуют о вкладе изменения пигментного обмена и иммунологической резистентности организма в прогрессирование заболевания в случае наличия сочетанных нозологий у больных, проживающих на Севере.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, заболевания гепатобилиарной системы, Север, липиды, иммунология.

Артериальная гипертензия (АГ) является фактором, влияющим на риск осложнений сердечно-сосудистых заболеваний человека [1], а многофакторность ее патогенеза объясняет актуальность изучения связи АГ с другими соматическими заболеваниями. В нашей стране заболевания гепатобилиарной системы (ГБС) имеют широкое распространение, уступая по частоте только сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям [2]. Сочетание нескольких заболеваний у одного больного чаще является результатом единого патогенетического процесса, развивающегося под воздействием одного или нескольких патогенных факторов, которые разрушают нормальную систему функционирования органов. Для патологии гепатобилиарной

и желчевыделительной систем одним из путей развития полиморбидности является причинно-следственная трансформация болезней [3, 4].

Выявленные универсальные механизмы развития дизадаптивных реакций у пришлого населения Крайнего Севера, возникающих на всех уровнях организма, являются феноменом глобального значения и могут обуславливать более быстрое прогрессирование заболеваний, в частности заболеваний ГБС, у пришлого населения на Севере, которое характеризуется более длительными обострениями и рецидивирующим течением [5, 6]. С другой стороны, при переезде на Север организм человека попадает в необычные, контрастные по отношению к прежнему месту жительства экологические ус-

Николаев Ю.А. – д.м.н., главный научный сотрудник, и.о. зам. директора по научной и лечебной работе, руководитель лаборатории патогенеза соматических заболеваний отдела медико-экологических исследований, e-mail: nicol@soramn.ru

Геворгян М.М. – к.б.н., зав. клинико-диагностическим отделением клиники, e-mail: gevorgyanmm@ngs.ru

Козарук Т.В. – врач КЛД клинико-диагностического отделения клиники

Кузнецова А.П. – врач-терапевт третьего отделения клиники; e-mail: kuzik86@mail.ru

Поляков В.Я. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail – vpolyakov15@yandex.ru

ловия, требующие напряжения компенсаторно-приспособительных процессов [7] и адаптационной перестройки жизнедеятельности [8, 9].

Таким образом, очевидна необходимость дальнейшего изучения причин возникновения сочетанной соматической патологии, в частности АГ и заболеваний ГБС, в регионах промышленного освоения Севера. В свете этого представляется важным изучение клинических особенностей развития заболеваний ГБС, сочетанной с артериальной гипертензией, у пришлого населения на Севере.

Цель исследования – изучить особенности антропометрических, клинико-биохимических, иммунологических показателей и их взаимосвязь у больных с артериальной гипертензией, сочетанной с заболеваниями гепатобилиарной системы, в зависимости от региона проживания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

На базе ФГБУ клиники ФГБУ «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» СО РАМН (г. Новосибирск) было обследовано 88 пациентов с артериальной гипертензией II–III стадии, I–II степени, сочетанной с заболеваниями ГБС. Для верификации диагноза эссенциальной артериальной гипертензии использованы рекомендации экспертов ВОЗ (1999 г.), Всероссийского научного общества кардиологов (2008, 2010 гг.). Все пациенты были разделены на две группы: к первой отнесены 67 больных АГ с заболеваниями ГБС, постоянно проживающих в умеренных широтах (г. Новосибирск), ко второй – 21 пациент некоренных национальностей, работающие на промышленных предприятиях г. Мирного Республики Саха (Якутия) и постоянно проживающие на Севере. Все обследованные были в возрасте от 20 до 60 лет. В первой группе средний возраст составлял $45,2 \pm 1,44$ года, во второй – $45,5 \pm 2,63$ года ($p > 0,05$). Исследование соответствовало этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (2000 г.) и с Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 (2003 г.), и проводилось в соответствии с информированным согласием на участие. Обследование включало определение следующих показателей: пола, возраста, массы тела, роста, индекса массы тела (ИМТ), вычисленного как отношение массы тела (кг) к росту в квадрате (m^2). На автоматическом гематологическом анализаторе

«Sysmex KX-21» (Япония) определяли количество эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), рассчитывали цветовой показатель как соотношение содержания гемоглобина, умноженного на 3, к содержанию эритроцитов. Концентрацию общего холестерина, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) с расчетом коэффициента атерогенности ((содержание общего холестерина – содержание холестерина ЛПВП)/содержание холестерина ЛПВП), триглицеридов (ТГ), глюкозы, билирубина, С-реактивного белка (СРБ) проводили на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab 30i» (Финляндия), для определения международного нормализованного отношения (МНО) использовали автоматический коагулометр «Autoclot» (Испания). Иммунологические показатели (содержание лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ с расчетом индекса иммунной реактивности как соотношения содержания клеток CD4+ и CD8+, циркулирующих иммунных комплексов, средних молекул 1 и 2) определяли с использованием спектрофотометра «СФ-46» (Россия) и люминесцентного микроскопа «Люмам» (Россия). Также проводили тест с нитросиним тетразолием (НСТ), спонтанный и стимулированный эндотоксином [10].

Характер распределения исследуемых параметров оценивали графическим способом, а также с использованием критерия Колмогорова – Смирнова. При параметрическом распределении исследуемого признака полученные данные представляли как среднее арифметическое и ошибка среднего ($M \pm m$), оценку межгрупповых различий проводили с использованием t критерия Стьюдента. При непараметрическом распределении полученные данные представляли в виде медианы с указанием нижнего и верхнего квартилей ($Me (Q_1; Q_3)$) и сравнивали при помощи U -критерия Манна – Уитни. Для корреляционного анализа применяли соответственно критерии Пирсона и Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ клинико-биохимических показателей больных АГ с заболеваниями ГБС (табл. 1) выявил их особенности у пациентов, проживающих на Севере, по сравнению с больными, находящимися в средних широтах. У пациентов, проживающих на Севере, наблюдалось достоверное увеличение на 6,0 % количества эритроцитов по сравнению с лицами, проживающими в средних широтах. Изучение липидного обмена у таких больных выявило

Таблица 1

Клинико-биохимические показатели больных АГ с заболеваниями гепатобилиарной системы в зависимости от региона проживания

Показатель	Больные АГ с заболеваниями ГБС, проживающие в средних широтах (n = 67)	Больные АГ с заболеваниями ГБС, проживающие на Севере (n = 21)
Масса тела, кг	80,67 ± 2,32	77,81 ± 5,12
Рост, см	168,98 ± 1,12	166,53 ± 2,42
ИМТ, кг/м ²	28,22 ± 0,75	28,22 ± 1,83
Содержание эритроцитов, 10 ¹² /л	4,64 ± 0,07	4,92 ± 0,11**
Содержание гемоглобина, г/л	146,43±2,06	148,05±3,94
Цветовой показатель	0,93 ± 0,01	0,90 ± 0,01
Содержание лейкоцитов, 10 ⁹ /л	7,63 ± 0,38	7,68 ± 0,98
Содержание лимфоцитов, %	34,8 ± 1,62	38,77 ± 2,15
Содержание глюкозы, ммоль/л	4,51 ± 0,12	4,35 ± 0,12
Содержание холестерина, ммоль/л	5,4 (4,6; 6,0)	5,8 (5,3; 6,2)*
Содержание ЛПВП, ммоль/л	1,32 ± 0,06	1,3 ± 0,1
Содержание ЛПНП, ммоль/л	3,2 (2,7; 3,9)	3,8 (3,3; 4,4)**
Содержание триглицеридов, ммоль/л	1,64 ± 0,13	1,62 ± 0,24
Коэффициент атерогенности	3,66 ± 0,23	3,73 ± 0,3
СОЭ, мм/ч	15,75 ± 1,29	15,10 ± 1,85
Содержание СРБ, мг/л	5,72 ± 1,34	4,5 ± 1,33
Содержание билирубина, ммоль/л	13,35 (9,25; 17,1)	16,2 (11,5; 21,9)**
МНО	1,08 ± 0,02	1,21 ± 0,1

Примечание. Здесь и в табл. 2, на рисунке обозначены статистически значимые отличия от величины соответствующего показателя больных АГ с заболеваниями ГБС, проживающих в средних широтах: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$.

увеличение на 21,8 % концентрации в сыворотке крови общего холестерина, на 12,2 % – ЛПНП и незначительное повышение коэффициента атерогенности по сравнению с пациентами, проживающими в средних широтах, что согласуется с данными, ранее полученными другими исследователями [11–14]. Установлено достоверное увеличение на 26,6 % содержания в сыворотке крови общего билирубина у больных с сочетанными нозологиями, проживающих на Севере, по сравнению с жителями умеренных широт, что свидетельствует о напряжении пигментного обмена [4]. При сравнении величин иммунологических показателей обнаружено снижение иммунной резистентности у больных АГ с заболеваниями ГБС, проживающих на Севере, по сравнению с пациентами, находящимися в умеренных широтах (табл. 2, рисунок). Так, у первых наблюдалось увеличение на 2,3 % количества Т-клеток CD8+, выполняющих в основном супрессорную функцию [15], и снижение на 9,5 % содержания Т-клеток CD4+, что свидетельствует о снижении у них иммунной реактивности в Т-клеточном звене иммунного ответа. Соотношение содержания Т-хелперов и Т-супрессоров у больных на Севере было на 20 % больше, чем у пациентов, проживающих в сред-

них широтах ($p < 0,05$). Следует отметить, что в гуморальном звене иммунного ответа у больных АГ с заболеваниями ГБС, проживающих на Севере, наблюдалось достоверное снижение на 39,6 % содержания иммуноглобулина М, увеличение на 15,7 % концентрации иммуноглобулина А и тенденция к повышению на 9,6 % содержания иммуноглобулина G. У северян было обнаружено достоверное уменьшение на 18,1 % концентрации средних молекул 2 (показатель эндотоксикоза), что, по-видимому, свидетельствует о сниженном уровне метаболических процессов в их организме. Выявленная тенденция к снижению содержания циркулирующих иммунных комплексов, В-клеток, Т-клеток CD3+, НК-клеток CD16+, отношения спонтанного НСТ-теста к стимулированному свидетельствовала о наличии более выраженной иммуносупрессии (сниженной иммунореактивности) у пациентов с сочетанной патологией, проживающих на Севере [8, 9].

При проведении корреляционного анализа клинико-биохимических и иммунологических показателей у больных 1-й группы были выявлены достоверные отрицательные взаимосвязи между содержанием ТГ и СРБ, с одной стороны, и стадией АГ – с другой ($r = -0,24$ и $r = -0,42$

Таблица 2

Иммунологические показатели больных АГ с заболеваниями гепатобилиарной системы в зависимости от региона проживания

Показатель	Больные АГ с заболеваниями ГБС, проживающие в средних широтах (n = 67)	Больные АГ с заболеваниями ГБС, проживающие на Севере (n = 21)
Содержание Т-лимфоцитов, %	68,8 ± 0,93	65,2 ± 2,06
Абсолютное количество Т-лимфоцитов, 10 ⁹ /л	1,70 ± 0,07	1,89 ± 0,16
Содержание Т-хелперов, %	43,52 ± 0,96	39,75 ± 1,56*
Абсолютное количество Т-хелперов, 10 ⁹ /л	1,08 ± 0,05	1,14 ± 0,09
Содержание Т-супрессоров, %	22,0 (18,0; 26,0)	23,5 (19,5; 28,0)*
Абсолютное количество Т-супрессоров, 10 ⁹ /л	0,56 ± 0,03	0,67 ± 0,06
Содержание В-лимфоцитов, %	10,27 ± 0,60	9,80 ± 1,08
Содержание NK-клеток, %	13,06 ± 0,79	11,75 ± 1,25
Соотношение содержания Т-хелперов и Т-супрессоров	1,95 (1,70; 2,30)	1,62 (1,46; 2,00)*
Спонтанный НСТ-тест, %	3,50 ± 0,33	4,47 ± 1,0
Стимулированный НСТ-тест, %	49,31 ± 1,78	48,47 ± 3,44
Соотношение стимулированного НСТ-теста к спонтанному	20,71 ± 1,74	16,8 ± 2,31
Содержание циркулирующих иммунных комплексов, усл. ед.	0,0187 ± 0,0015	0,0134 ± 0,0015**
Содержание IgA, г/л	1,9 (1,49; 2,4)	2,25 (2,0; 2,7)*
Содержание IgM, г/л	1,41 ± 0,15	1,10 ± 0,07*
Содержание IgG, г/л	12,13 ± 0,38	13,29 ± 0,81
Содержание средних молекул 1, усл. ед.	191,91 ± 6,72	171,30 ± 14,1
Содержание средних молекул 2, усл. ед.	366,02 ± 11,77	310,00 ± 14,87**

соответственно), у пациентов 2-й группы – положительная взаимосвязь концентрации общего билирубина со стадией АГ ($r = 0,46, p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о сопряжении снижения пигментного обмена и прогрессирования заболевания у пациентов с сочетанной патологией, проживающих на Севере. При изучении взаимосвязи клинико-биохимических и иммунологических показателей обнаружены разли-

чия у пациентов, проживающих на Севере и в средних широтах (табл. 3). Показаны сильные прямые корреляционные зависимости между содержанием ТГ и ИМТ, между содержанием общего холестерина и ЛПНП, ТГ и глюкозы, ТГ и коэффициентом атерогенности, между содержанием лейкоцитов и глюкозы у пациентов АГ с сочетанной патологией, проживающих на Севере, при этом величины указанных коэффи-

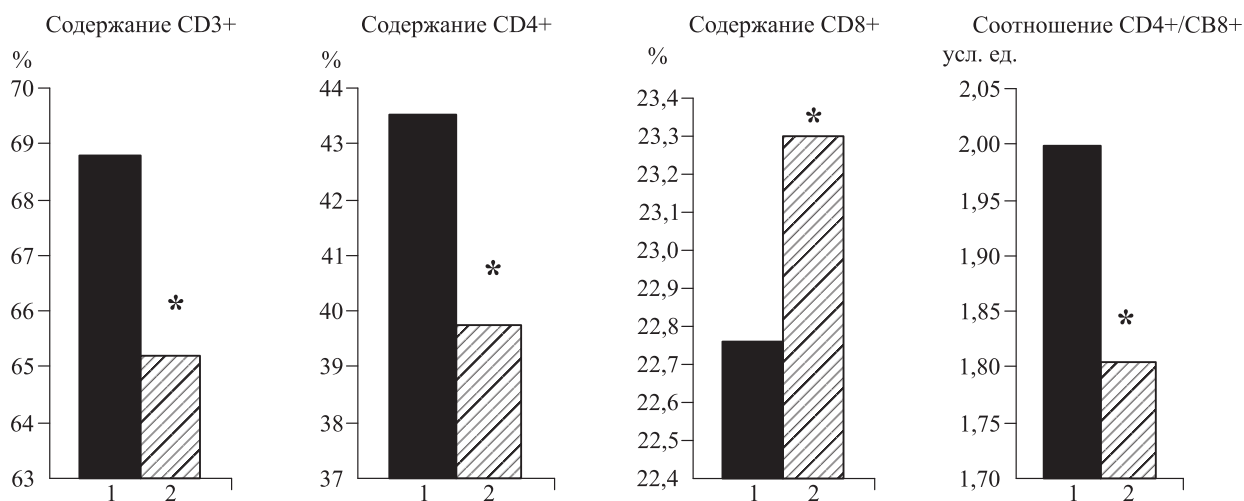


Рис. Иммунологические показатели у больных АГ, сочетанной с заболеваниями ГБС, проживающих в средних широтах (1) и на Севере (2)

Таблица 3

Взаимосвязь величин клинико-биохимических, иммунологических, антропометрических показателей больных АГ с заболеваниями ГБС в зависимости от региона проживания

Сравниваемые параметры	Больные АГ с заболеваниями ГБС, проживающие в средних широтах (n = 67)	Больные АГ с заболеваниями ГБС, проживающие на Севере (n = 21)
Содержание холестерина и ЛПНП	0,79***	0,93***
Содержание ТГ и глюкозы	0,41**	0,51**
Содержание ТГ и коэффициент атерогенности	0,63***	0,85***
Содержание лейкоцитов и глюкозы	0,29*	0,50*
Содержание ТГ и ИМТ	–	0,53*
Содержание CD3+ и IgM	–	0,60**
Содержание CD3+ и IgA	–	0,44*
Содержание CD3+ и IgG	–	0,50*
Содержание IgA и IgM	–	0,45*

Примечание. Приведены только статистически значимые величины коэффициентов корреляции: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

коэффициентов корреляции были выше, чем у пациентов группы 1. Полученные данные указывают на больший вклад показателей липидного и углеводного обмена в патогенез АГ с сочетанной патологией в условиях Севера. В отличие от больных с сочетанной патологией, проживающих в средних широтах, у пациентов на Севере были выявлены достоверные зависимости между показателями клеточного и гуморального иммунитета: содержанием CD3+ и IgM, CD3+ и IgA, CD4+ и IgG, IgA и IgM. Установленное усиление взаимосвязей между показателями иммунитета на клеточном и гуморальном уровне свидетельствует об их значимой роли в патогенезе данных нозологий.

ВЫВОДЫ

1. Величины клинико-биохимических и иммунологических показателей у больных АГ с заболеваниями ГБС зависят от региона проживания. У лиц, проживающих на Севере, по сравнению с пациентами, находящимися в средних широтах, увеличена концентрация в сыворотке крови общего холестерина, общего билирубина, холестерина липопротеидов низкой плотности, а также количество эритроцитов, при этом снижена неспецифическая иммунная резистентность организма, что проявляется увеличением абсолютного количества CD8-позитивных Т-клеток, снижением соотношения содержания Т-хелперов и Т-супрессоров, снижением содержания иммуноглобулина М, увеличением концентрации иммуноглобулина А.

2. Установлена взаимосвязь ряда биохимических и иммунологических показателей (содер-

жания билирубина, СРБ и ТГ) со стадией АГ. У пациентов с сочетанными нозологиями, проживающими на Севере, имеются более выраженные прямые взаимосвязи между концентрацией в сыворотке крови ТГ и ИМТ, содержанием общего холестерина и ЛПНП, ТГ и глюкозы, ТГ и коэффициентом атерогенности, концентрацией лейкоцитов и глюкозы по сравнению с пациентами, которые проживают в средних широтах.

3. У больных АГ с заболеваниями ГБС, проживающих на Севере, в отличие от пациентов, находящихся в средних широтах, имеются достоверные взаимосвязи между показателями иммунитета на клеточном и гуморальном уровне: содержанием CD3+ и IgM, CD3+ и IgA, CD4+ и IgG, IgA и IgM.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гогин Е.Е., Гогин Г.Е. Гипертоническая болезнь и ассоциированные болезни системы кровообращения. М.: Ньюдиамед, 2006. 254 с.
2. Вишневецкая В.В., Лоранская И.Д., Малахова Е.В. Билиарные дисфункции – принципы диагностики и лечения // Рос. мед. журн. 2009. 17. (4). 246–250.
3. Парахонский А.П. Патогенетические основы полиморбидности геронтов // Успехи соврем. естествознания. 2009. (7). 81–82.
4. Николаев Ю.А., Пальцев А.И., Кузнецова Т.В. Особенности клинического течения заболеваний органов пищеварения у пришлого населения на севере // Бюл. СО РАМН. 2006. (3). 122–126.
5. Николаев Ю.А., Митрофанов И.М., Кузнецова И.Ю. и др. Распространенность хронических неинфекционных заболеваний и факторов риска их развития у работников алмазодобывающей

промышленности Якутии // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. 2004. (3). 39–43.

6. Николаев Ю.А., Дарянина С.А., Пальцев С.А. и др. Эпидемиология, патогенез, профилактика и лечение артериальной гипертензии у пришлого населения на Севере. Новосибирск, 2005. 200 с.

7. Безпрозванная Е.А. Особенности компенсаторно-приспособительных процессов у больных артериальной гипертензией пришлых жителей Севера: дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2012.

8. Романова Ю.В., Леханова Е.Н., Буганов А.А., Голубева Н.В. Иммунный статус лиц с артериальной гипертензией и гиперхолестеринемией, занятых на производстве стройматериалов // Медицина труда и промышленная экология. 2006. (8). 19–24.

9. Николаев Ю.А., Маянская Н.Н., Митрофанов И.М. и др. Динамика гормональных изменений, функциональной активности нейтрофилов при артериальной гипертензии в зависимости от длительности проживания на Севере // Бюл. СО РАМН. 2004. (1). 76–82.

10. Gordon P.A., Stuart J., Lee T.R. et al. The cytochrome NBT test // J. Clin. Pathol. 1975. 28. (8). 674–679.

11. Кылбанова Е.С. Липидно-метаболические нарушения, социальный градиент и характер питания у пришлого населения Якутии: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Новосибирск, 2006.

12. Старцева О.Н. Особенности лабораторных показателей липидного, углеводного и белкового обмена у приезжих жителей районов Крайнего Севера: дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2008.

13. Старцева О.Н., Белоусов В.В., Фролова О.В. Особенности некоторых показателей липидного и белкового обмена у пришлого населения регионов Крайнего Севера // Клиническая диагностика. 2007. (8). 22–24, 33–34.

14. Волкова Н.И. Особенности обменных процессов у рабочих различных производств лесной промышленности Севера: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Архангельск, 1999.

15. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М., 2000. 432 с.

FEATURES OF CLINICO-BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AT PATIENTS WITH THE ARTERIAL HYPERTENSIA, INDIGENOUS POPULATION OF THE NORTH, COMORBID WITH DISEASES OF HEPATOBILIARY SYSTEM

Yury Alekseevich NIKOLAEV, Margarita Mailovna GEVORGYAN, Tatyana Vladimirovna KOZARUK, Anna Pavlovna KUZNETSOVA, Vladimir Yakovlevich POLYAKOV

Scientific Center of Clinical and Experimental Medicine SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

88 patients with arterial hypertension (AH) of II-III stage, I-II degrees and with hepatobiliary system (HBS) disorders have been surveyed in the clinic of FSBI "Scientific Center of Clinical and Experimental Medicine" of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Science" (Novosibirsk). Among them, 67 people constantly live in moderate latitudes (Novosibirsk) and 21 people constantly live in the North (Republic Saha, Yakutia). All surveyed patients were in the age from 20 till 60 years. The features of clinico-biochemical and immunological parameters and their interrelation with the stage of disease at patients with AH and HBS in the North have been investigated. The comparison of values of immunological parameters has revealed the decrease in immune resistance at the patients living in the North in comparison with the patients — residents of middle latitudes. The interrelation of some biochemical and immunological parameters with stage of AH is established. These data testify to the contribution of change of organism pigmentary metabolism and immunological resistances to progressing disease in case of comorbide nosologies presence at the patients living in the North.

Key words: arterial hypertension, diseases of hepatobiliary system, the North, lipids, immunology.

Nikolaev Yu.A. – doctor of medical sciences, chief researcher, acting deputy director on scientific and medical work, head of the laboratory of somatic diseases pathogenesis of the department of medical-ecological investigations, e-mail: nicol@soramn.ru

Gevorgyan M.M. – candidate of medical sciences, head of the clinical-diagnostic department of the clinic, e-mail: gevorgyanmm@ngs.ru

Kozaruk T.V. – physician of the clinical-diagnostic department of the clinic

Kuznetsova A.P. – physician of the clinical-diagnostic department of the clinic, e-mail: kuzik86@mail.ru

Polyakov V.Ya. – candidate of medical sciences, senior researcher, e-mail: vpolyakov15@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ ПСИХОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПОСЛЕОПЕРАЦИОННУЮ ДИНАМИКУ БОЛИ В СПИНЕ

**Александр Владимирович КРУТЬКО¹, Андрей Александрович БАЙКАЛОВ¹,
Дмитрий Валерьевич ДЬЯЧКОВ², Александр Николаевич САВОСТЬЯНОВ²**

¹ ФГБУ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии Минздрава России
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

² ФГБУ «НИИ физиологии» СО РАМН
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Влияние психологических факторов на болевую динамику в до- и послеоперационных условиях исследовалось у 155 больных, оперированных по поводу болевых синдромов остеохондроза позвоночника. Выраженность болевого синдрома оценивали по 5-балльной визуально-аналоговой шкале (ВАШ). Индивидуальные психологические особенности человека в условиях социальных коммуникаций устанавливали при помощи опросника Кеттелла. Типы реакции на заболевание изучали с помощью Ленинградского опросника Бехтеревского института (ЛОБИ). В исследовании выявлены индивидуально-личностные предпосылки, увеличивающие риск рецидива болевого синдрома после хирургического лечения. Показано, что у мужчин и женщин увеличение риска рецидива заболевания связано с разными психологическими факторами. Рецидивы остеохондроза у женщин чаще обнаруживались при сенситивном типе реагирования на заболевание, тогда как у мужчин – при паранойальном типе.

Ключевые слова: болевой синдром, остеохондроз позвоночника, психологические факторы.

Неврологические проявления остеохондроза позвоночника являются чрезвычайно распространенной патологией, которая ведет к длительной утрате трудоспособности и к социальной дезадаптации лиц трудоспособного возраста [11, 13, 22]. Наиболее серьезные последствия наблюдаются в том случае, если заболевание приобретает хронический характер. Исследования показывают, что хроническая боль очень часто связана с такими нарушениями, как тревога, депрессия, с соматоморфными расстройствами и с расстройствами личности [1]. Сильные депрессивные расстройства встречаются при хронических болях в 34–57 % случаев, тогда как в общей популяции – в 5–26 % случаев [13, 17]. На основании анализа ранее опубликованных работ можно сделать вывод о том, что психологические факторы в значительной степени связаны с успешностью выздоровления пациента и должны учитываться при планировании программы послеоперационной реабилитации.

Роль психологических факторов в послеоперационной реабилитации пациентов исследована на примере сердечно-сосудистых заболеваний [14]. В частности, показано влияние уровня ситуативной тревожности на состояние системы направленного внимания у больных, перенесших операцию на сердце [7]. В то же время в отечественных и зарубежных исследованиях практически не уделяется внимания личностным особенностям и типам реагирования на заболевания больных остеохондрозом [6, 12]. При этом такие типы реагирования на заболевание, как паранойальный, эгоцентрический, сенситивный, способны в значительной степени нарушать социальную адаптацию больных и, в частности, взаимоотношения в диаде «врач – больной» [12]. Это, в свою очередь, может оказывать значительное негативное влияние на успешность лечения [1]. Например, у больных, для которых характерны анозогностический, эргопатический, апатический типы, значительно затрудняется

Крутько А.В. – к.м.н., старший научный сотрудник, зав. отделением нейрохирургии № 2,
e-mail: AKrutko@niito.ru

Байкалов А.А. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: Baikal228@gmail.com

Дьячков Д.В. – аспирант, e-mail: ddv.68@mail.ru

Савостьянов А.Н. – к.б.н., д.филос.н., старший научный сотрудник, руководитель группы когнитивной нейрорлингвистики, e-mail: Alexander.Savostyanov@gmail.com

возможность оказания своевременной хирургической помощи.

При анализе литературы, касающейся взаимосвязи остеохондроза позвоночника и эмоционально-личностных особенностей больных, обращает на себя внимание отсутствие подхода к изучению проблемы с гендерных позиций. До последнего времени в диагностике и лечении многих заболеваний не придавалось значения фактору пола. В некоторых случаях при публикации результатов исследования пол испытуемых либо вообще не указывался, либо исследования проводились только на добровольцах-мужчинах, а затем результаты умозрительно распространялись на всю выборку [6, 8]. Однако известно, что различия (физиологические и психологические) обуславливают специфическую «чувствительность» к различным заболеваниям у мужчин и женщин. Так, Р. Девис и А. Бухвальд [18] отмечают, что один и тот же стимул может вызвать у мужчин и женщин разные физиологические сдвиги. Также известно, что функциональные показатели мозговой активности, связанные с поведенческими особенностями у здоровых людей, в существенной мере зависят от фактора пола [5]. В частности, такие личностные свойства, как тревожность и агрессивность, имеют достоверно различные связи с показателями мозговой активности у здоровых мужчин и женщин [2, 8].

Целью исследования было определить влияние психологических факторов у пациентов, оперированных по поводу болевых синдромов остеохондроза позвоночника впервые и повторно. Повторное обращение пациента на операцию обычно оценивается как показатель неудачного выздоровления после первой операции. Это говорит о том, что проведенная программа реабилитации не привела к выздоровлению больного. Наоборот, отсутствие повторных обращений в современной медицине рассматривается как показатель удачности лечения. Мы предположили, что пациенты, которые нуждаются в повторной операции, достоверно отличаются по своим базовым личностным свойствам и типу реагирования на заболевание от пациентов, у которых успешное выздоровление наступает уже после первой операции. Также мы проверяли гипотезу о том, что влияние психологических факторов на процесс реабилитации в существенной мере зависит от пола пациента. В нашем исследовании психологические особенности пациентов оценивались при помощи специальных опросников и статистически сопоставлялись между группами пациентов, что позволило проверить выдвинутые гипотезы. Кроме того, последствия

операции оценивались по шкале ВАШ и показателями дееспособности [16].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено проспективное изучение особенностей личностного реагирования на заболевание у 155 больных, оперированных в нейрохирургическом отделении Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии по поводу болевых синдромов остеохондроза позвоночника. Все больные были разделены на две группы. Первую группу составили пациенты, впервые поступившие на оперативное лечение по поводу болевого синдрома остеохондроза позвоночника (108 пациентов, 56 мужчин и 52 женщины). Во вторую группу были включены пациенты с рецидивом болевого синдрома после дискэктомии (47 пациентов, 28 мужчин и 19 женщин). Возраст больных был сопоставим в обеих группах и составлял от 21 года до 65 лет ($47,4 \pm 8,4$ года). Наличие остеохондроза диагностировалось на предоперационном этапе при помощи анатомической магнитно-резонансной томографии позвоночника, которая была сделана повторно каждому пациенту после операции для проверки качества лечения.

Всем пациентам проведено хирургическое лечение. В обеих группах выполняли декомпрессивные и декомпрессивно-стабилизирующие операции с целью устранения морфологического субстрата боли. Изучение психологического статуса и степени дееспособности всех больных проводили до операции и через 7–10 дней после операции. Выраженность болевого синдрома оценивали по 5-балльной ВАШ в эти же сроки, степень дееспособности – по шкале ODI (Oswestry Disability Index) [14].

Всем пациентам до операции предлагалось ответить на вопросы из опросника Р. Кеттелла [10], который позволяет оценить индивидуальные особенности человека в условиях социальных коммуникаций. При помощи этого метода определялись значения личностных факторов по следующим шкалам: А. «замкнутость – общительность», В. «интеллект», С. «эмоциональная нестабильность – эмоциональная стабильность», Е. «подчиненность – доминантность», F. «сдержанность – экспрессивность», G. «низкая нормативность поведения – высокая нормативность поведения», H. «робость – смелость», I. «жесткость – чувствительность», L. «доверчивость – подозрительность», M. «практичность – мечтательность», N. «прямолинейность – дипломатичность», O. «спокойствие – тревожность», Q1. «консерватизм – радикализм», Q2.

«конформизм – нонконформизм», Q3. «низкий самоконтроль – высокий самоконтроль», Q4 «расслабленность – напряженность».

Типы реакции на заболевание изучали с помощью Ленинградского опросника Бехтревского института (ЛОБИ), предназначенного для диагностики типов отношения к болезни и лечению пациентов с соматическими заболеваниями. Опросник позволяет определить типы реагирования на заболевание у больных с соматической патологией, а также у больных с психосоматическими и нервно-психическими расстройствами [3]. Опросник содержит 12 тем. Каждая тема включает от 10 до 15 утверждений, которые являются составляющей одного или нескольких из 12 паттернов – шкал отношения к болезни. В каждой теме испытуемый должен выбрать от 1 до 3-х наиболее подходящих для него утверждений. С помощью ЛОБИ могут быть диагностированы следующие типы реагирования на болезнь: гармоничный (минимальное диагностическое число МДЧ = 7), тревожный (МДЧ = 4), ипохондрический (МДЧ = 3), апатический (МДЧ = 3), неврастенический (МДЧ = 3), обсессивно-фобический (МДЧ = 4), сенситивный (МДЧ = 3), эгоцентрический (МДЧ = 3), эйфорический (МДЧ = 5), анозогнозический (МДЧ = 5), эргопатический (МДЧ = 6), паранойяльный (МДЧ = 3) [12].

Статистическую обработку количественных результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. При статистическом сравнении проводились сопоставления показателей опросников по разным шкалам у пациентов из разных групп (первичное или повторное обращение), а также у пациентов до и после операции. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении результатов оценки интенсивности болевого синдрома по визуально-аналоговой шкале перед операцией в I и II группах получены показатели, не имеющие статистически достоверных различий и составляющие $3,6 \pm 1,0$ и $3,4 \pm 0,5$ балла соответственно. После операции отмечается достоверное ($p < 0,05$) снижение показателей ВАШ в обеих группах до $1,7 \pm 0,7$ и $1,5 \pm 0,8$ балла соответственно. Индекс ODI уменьшился в первой группе с 51,3 до 19,7, во второй – с 72,2 до 20,6 ($p < 0,05$), по данному показателю две группы испытуемых

достоверно не различались между собой ни до, ни после операции (хотя индекс ODI был выше во второй группе в дооперационный период, эти различия не достигли порога статистической достоверности).

Таким образом, операционное вмешательство приводило к достоверному снижению выраженности болевого синдрома и повышению дееспособности в обеих группах испытуемых. Существенных межгрупповых различий по данным показателям не наблюдалось.

Психологические показатели, отражающие тип реакции на заболевание, оценивались при помощи методики ЛОБИ. Первоначально индексы по разным шкалам этого опросника сравнивались для пациентов из первой и второй группы без учета фактора пола, и различия между пациентами с первичной и повторной операцией оказались статистически не достоверными. Когда же сравнения между группами были сделаны отдельно для мужчин и женщин, были обнаружены значимые различия (табл. 1). Так, при межгрупповом сравнении индекс неврастенического типа реагирования был достоверно выше у мужчин, обратившихся за повторной операцией, чем у оперировавшихся в первый раз. У женщин из первой и второй группы этот показатель не различался. При клиническом наблюдении за пациентами нами было отмечено, что для мужчин в условиях хронического течения заболевания характерны вспышки раздражения, особенно при болях, при неприятных ощущениях, при неудачах лечения, а также непереносимость болевых ощущений. Такое поведение существенно реже встречается у женщин, что отражается в результатах психологических тестов.

Кроме того, при сравнении индексов по сенситивному и эргопатическому типу реагирования для пациентов из разных групп также выявили различия между мужчинами и женщинами (см. табл. 1). Женщины с рецидивом болевого синдрома, которые повторно поступили в нейрохирургическое отделение для оперативного лечения, показали достоверно большие значения индексов сенситивного и эргопатического типов по сравнению с женщинами из первой группы (см. табл. 1). У мужчин, впервые и повторно поступивших на оперативное лечение, достоверных различий по этим типам реагирования на заболевание не обнаружено.

По правилам интерпретации результатов ЛОБИ, если МДЧ достигнуто или превышено в отношении более чем 3 типов, то диагностируются только два или три типа реагирования на болезнь, в отношении которых набрано

Таблица 1

Типы реакций на заболевание ($M \pm m$)

Тип реакции на заболевание	I группа		II группа		МДЧ
	Женщины	Мужчины	Женщины	Мужчины	
Гармонический	3,6 ± 0,72	4,4 ± 0,88	4,2 ± 0,80	4,5 ± 0,78	7
Тревожный	3,1 ± 0,51	2,2 ± 0,34	3,0 ± 0,48	2,5 ± 0,37	4
Истерический	1,0 ± 0,12	1,0 ± 0,13	0,9 ± 0,10	1,1 ± 0,12	3
Апатический	0,8 ± 0,16	0,8 ± 0,14	0,5 ± 0,20	1,3 ± 0,19	3
Неврастенический	2,1 ± 0,16	1,4 ± 0,18	2,2 ± 0,23	2,5 ± 0,28*	3
Обсессивно-фобический	2,7 ± 0,68	2,1 ± 0,70	2,9 ± 0,75	2,3 ± 0,60	4
Сенситивный	1,7 ± 0,13	2,2 ± 0,32	2,4 ± 0,21*	2,0 ± 0,34	3
Эгоцентрический	0,9 ± 0,12	0,7 ± 0,09	1,1 ± 0,14	1,0 ± 0,12	3
Эйфорический	1,5 ± 0,15	1,7 ± 0,13	1,2 ± 0,17	2,1 ± 0,19	5
Анозогнозический	1,0 ± 0,34	1,5 ± 0,39	1,3 ± 0,29	1,9 ± 0,25	5
Эргопатический	2,4 ± 0,2	3,6 ± 0,31	4,3 ± 0,31*	3,6 ± 0,27	6
Паранойяльный	1,2 ± 0,24	1,5 ± 0,23	1,6 ± 0,22	1,8 ± 0,24	3

Примечание. Здесь и в табл. 3 * – отличие от величины соответствующего показателя при первичном обращении достоверно при $p < 0,05$.

наибольшее число баллов. В нашем случае в группе мужчин с хроническим течением остеохондроза МДЧ достигнуто по 4 типам реакций (неврастенический, обсессивно-фобический, сенситивный и паранойяльный). В силу того что ни один из типов не преобладал, нельзя говорить об одинаковой для всех мужчин реакции на заболевание. Для женщин, которые впервые поступили в отделение нейрохирургии в связи с выраженным болевым синдромом остеохондроза позвоночника, наиболее характерна обсессивно-фобическая реакция на заболевание (30,8%), на втором месте по распространенности находились неврастеническая (25%) и тревожная (25%) реакции. Тревожный тип реагирования на заболевание в группе женщин, впервые поступивших в отделение нейрохирургии (группа I) встречается достоверно чаще, чем у мужчин из той же группы ($p < 0,05$). У мужчин из первой группы достоверно чаще встречается сенситивный тип реагирования на заболевание, чем в первой группе (35,7%). Гармонический тип у мужчин из первой группы не диагностирован.

Два наиболее распространенных типа реагирования на заболевание во второй группе женщин – это неврастенический (31,6%) и сенситивный (31,6%). При этом сенситивный тип реагирования во второй группе женщин встречается 2,3 раза чаще, чем в группе женщин, впервые поступивших на оперативное лечение ($p < 0,05$). Паранойяльный тип реагирования во второй женской группе диагностирован нами в 1,8 раза, а эргопатический – в 5 раз чаще, чем

в первой женской группе. У мужчин, поступивших в отделение с рецидивом болевого синдрома, паранойяльный, эргопатический и неврастенический типы реагирования на заболевание встречались несколько чаще, чем у мужчин с первичным обращением, но эти различия не достигали достоверных значений. В табл. 2 показана распространенность типов реагирования на заболевание. Признак считали выраженным, если показатель меньше 4 и более 7 баллов.

Таблица 2

Распространенность типов реагирования на заболевание, %

Тип реакции на заболевание	I группа		II группа	
	Женщины	Мужчины	Женщины	Мужчины
Гармонический	3,9	0	0	3,6
Тревожный	25	8,9	26,3	17,9
Истерический	3,9	1,8	0	7,1
Апатический	3,9	3,6	0	14,3
Неврастенический	25,0	19,6	31,6	28,6
Обсессивно-фобический	30,8	21,4	26,5	7,1
Сенситивный	13,5	35,7	31,6	17,9
Эгоцентрический	5,8	1,8	5,3	3,6
Эйфорический	0	1,8	0	0
Анозогнозический	0	1,8	0	3,6
Эргопатический	3,9	14,3	21,1	25
Паранойяльный	5,8	12,5	10,5	28,6
Не диагностировано	28,8	25	26,3	14,3

Таблица 3

Показатели по 16-факторному личностному опроснику Кеттелла ($M \pm m$)

Фактор	I группа		II группа	
	Женщины	Мужчины	Женщины	Мужчины
А. замкнутость – общительность	6,0 ± 1,8	5,3 ± 1,6	5,8 ± 1,6	4,8 ± 1,5
В. интеллект	3,4 ± 0,9	3,2 ± 0,7	3 ± 0,9	3,3 ± 0,8
С. эмоциональная нестабильность – эмоциональная стабильность	6,0 ± 1,9	6,5 ± 1,7	5,8 ± 1,7	6,4 ± 2,1
Е. подчиненность – доминантность	3,4 ± 0,4	4,7 ± 1,1	4,4 ± 0,6*	4,3 ± 1,2
Ф. сдержанность – экспрессивность	4,5 ± 1,3	5,0 ± 0,8	4,4 ± 1,3	4,2 ± 0,7*
Г. низкая нормативность поведения – высокая нормативность поведения	6,5 ± 2,0	6,7 ± 1,9	6,6 ± 2,1	6,8 ± 2,0
Н. робость – смелость	4,9 ± 1,0	5,9 ± 1,2	6,0 ± 1,1*	6,2 ± 1,3
І. жесткость – чувствительность	5,1 ± 0,9	2,6 ± 0,6	4,5 ± 0,9*	3,7 ± 0,7*
Л. доверчивость – подозрительность	5,4 ± 1,3	5,2 ± 1,3	5,1 ± 1,1	5,2 ± 1,0
М. практичность – мечтательность	3,0 ± 1,2	3,0 ± 1,0	2,4 ± 0,9	2,9 ± 1,0
Н. прямолинейность – дипломатичность	6,5 ± 2,3	5,6 ± 2,0	6 ± 2,0	5,7 ± 1,9
О. спокойствие – тревожность	6,3 ± 2,5	5,7 ± 2,1	6,4 ± 2,3	5,5 ± 2,0
Q1. консерватизм – радикализм	4,3 ± 1,7	4,5 ± 1,8	4,2 ± 1,7	5,1 ± 2,1
Q2. конформизм – неконформизм	3,8 ± 1,4	4,1 ± 1,7	3,6 ± 1,5	4,2 ± 1,7
Q3. низкий самоконтроль – высокий самоконтроль	6,4 ± 2,2	6,2 ± 2,2	5,8 ± 2,4	6,6 ± 2,5
Q4. расслабленность – напряженность	5,4 ± 1,8	4,8 ± 1,5	5,8 ± 1,7	4,8 ± 1,3

Психологические особенности пациентов из разных групп также оценивались при помощи опросника Р. Кеттелла. Как и для методики ЛОБИ, межгрупповые сравнения личностных показателей по опроснику Р. Кеттелла без учета фактора пола не выявили достоверных различий. Статистически значимые различия были получены для разных психологических факторов при раздельном сравнении мужчин и женщин, относящихся к разным группам пациентов. У женщин с рецидивом болевого синдрома (табл. 3) по сравнению с женщинами, впервые обратившимися на операцию, достоверно реже встретились мягкость, зависимость, уступчивость (фактор Е), а также склонность к рефлексии, романтичность (фактор І). Достоверно чаще отмечены упорность, социабельность, стрессоустойчивость. У мужчин второй группы по сравнению с мужчинами первой группы достоверно реже встретились самоуверенность и гибкость в суждениях (фактор І), а также жизнерадостность и склонность к лидерству.

В предыдущих исследованиях показано, что к психологическим факторам, оказывающим отрицательное воздействие на результаты хирургического лечения болевых синдромов дегенеративно-дистрофических поражений позвоночника, относятся субклинический и клинический

уровень тревоги и депрессии [1, 6, 23]. Однако взаимосвязь психоневрологических расстройств (депрессия, страх, тревожность) с хронической болью не представляется однозначной. Существуют различные варианты их причинно-следственных взаимоотношений. Наличие депрессии у больных с хронической болью может объясняться общим патогенезом, основное звено которого связано с подавлением серотонинергической системы мозга, играющей важную роль как в развитии депрессии, так и в механизмах регуляции болевой чувствительности на уровне дорсальных рогов спинного мозга [13]. При этом исследованию роли устойчивых личностных характеристик в переносимости операции уделяется недостаточно внимания. Учитывая, что личностная тревожность является фактором постоянным, мало реагирующим на влияние окружающей среды, надо полагать, что больные с рецидивом болевого синдрома имеют определенные личностные особенности и предпосылки, выделяющие их из общей группы больных остеохондрозом позвоночника. Врачи смежных специальностей, терапевты, неврологи, врачи общей практики часто сталкиваются с пациентами, перенесшими операцию на структурах позвоночника, но не отмечающими улучшения [15, 19–21]. В таких случаях особенное значе-

ние приобретает полноценная диагностика пациентов с рецидивом болевого синдрома с точки зрения выявления не только морфологического субстрата боли, но и личностных особенностей пациента [17].

С помощью теста ЛОБИ в нашем исследовании показано, что для женщин с рецидивом остеохондроза характерен сенситивный тип реагирования на заболевание, он встречается в 2,3 раза чаще, чем в группе впервые поступивших пациенток. При клинических наблюдениях отмечается, что эти женщины чрезмерно озабочены возможным неблагоприятным впечатлением, которое могут произвести на окружающих сведения об их болезни. Они обнаруживают опасения, что окружающие станут их избегать, считать неполноценными, распускать сплетни о причине и природе болезни. Страшится стать обузой для близких. Также часто у женщин, поступивших с рецидивом болевого синдрома, встречаются паранойяльный и эргопатический стили. То есть, с одной стороны, женщины видят причину своей болезни в чьем-то злом умысле, с подозрением относятся к лекарствам и процедурам, с другой – обнаруживают склонность к уходу в работу. Таким образом, для женщин с рецидивом заболевания в большей степени, чем для женщин, впервые поступивших на оперативное лечение, характерны дезадаптирующие типы реагирования на заболевание. На основании изучения личностных особенностей при помощи опросника Кеттелла выявлено, что женщины с рецидивом заболевания достоверно менее мягкие, уступчивые и зависимые (фактор E) и менее склонные к романтичности и рефлексии (фактор I). Иными словами, женщины с рецидивом болевого синдрома «утрачивают» традиционно женские черты.

У мужчин с рецидивом заболевания в 2,2 раза чаще, чем у впервые поступивших мужчин, встречается паранойяльный тип реагирования на заболевание. Данный тип также является дезадаптирующим. Другими словами, для лиц обоего пола с рецидивом заболевания характерна более выраженная склонность к дезадаптирующим типам реагирования на заболевание, чем у пациентов, впервые поступивших в нейрохирургическое отделение. Это, с одной стороны, не позволяет больным вовремя обращаться за медицинской помощью и за поддержкой к близким, с другой – не позволяет выстраивать адекватные взаимоотношения с врачом, что во многом определяет успешность лечения. Также отмечено, что у пациентов, которым потребовалось повторное оперативное лечение, достоверно реже встречается жизнерадостность, склон-

ность к лидерству (фактор F) и самоуверенность и гибкость в суждениях (фактор I). Таким образом, можно предположить, что у мужчин с риском рецидива «сглаживаются» традиционно мужские черты характера.

В настоящее время мы можем констатировать наличие определенных различий по психологическим показателям у пациентов с первичным и вторичным обращением на операцию. Разумеется, пока еще остается большое количество открытых вопросов, связанных с интерпретацией полученных результатов. Одной из нерешенных проблем является оценка вероятности «плохого» исхода первой операции на основании анализа психометрических данных. Также остается неизученной взаимосвязь между психологическим состоянием пациентов и показателями функциональной активности головного мозга, оцениваемых объективными методами, такими как ЭЭГ и функциональная томограмма. И, наконец, основной задачей является применение данных психометрии при разработке индивидуальных программ реабилитации пациентов в послеоперационный период. Все перечисленные проблемы могут стать темой для более детальных исследований, которые мы планируем продолжить в дальнейших работах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет выделить ряд индивидуально-личностных предпосылок, увеличивающих риск рецидива болевого синдрома после хирургического лечения болевых синдромов остеохондроза позвоночника. В нашей работе выделены личностные особенности пациентов с рецидивом болевого синдрома и обнаружено, что для пациентов с повторным обращением на операцию характерны дезадаптирующие типы реагирования на заболевание. Мужчины и женщины с хроническим течением остеохондроза демонстрируют схожие психологические черты, которые идут в разрез с гендерными стереотипами. Мужчины «утрачивают» такие черты, как самоуверенность, склонность к лидерству, женщины – романтичность, мягкость, уступчивость. Это позволяет предположить, что риск возникновения послеоперационных осложнений максимален для пациентов, у которых сглажены традиционные гендерные черты характера.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байкалов А.А., Рогатных Е.П. Взаимосвязь динамики болевого синдрома с психологическими факторами при дегенеративных поражениях

поясничного отдела позвоночника // I Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых по вертебрологии и смежным дисциплинам. Новосибирск, 2005. 44–45.

2. Бочаров А.В., Князев Г.Г., Слободской-Плюснин Я.Ю. и др. Связанные с агрессивностью и полом различия в осцилляторных ответах на эмоциональное выражение лиц // Бюл. СО РАМН. 2010. (4). 143–148.

3. Вассерман Л.И., Щелкова О.Ю. Медицинская психодиагностика: Теория, практика и обучение. СПб.: Филологический факультет СПбГУ; М.: Академия, 2003. 73 с.

4. Вейн А.М., Данилов А.Б. Гендерная проблема в неврологии // Журн. неврол. психиатрии. 2003. (10). 4–14.

5. Вольф Н.В. Половые различия функциональной организации процессов полушарной обработки речевой информации. Ростов-на-Дону, 2000. 240 с.

6. Джулай Л.В., Симонович А.Е., Ласовская Т.Ю., Рогатных Е.П. Влияние психологических факторов на результаты хирургического лечения болевых синдромов при дегенеративных поражениях поясничного отдела позвоночника // Хирургия позвоночника. 2004. (4). 79–86.

7. Жукова О.В., Постнов В.Г., Савостьянов А.Н., Кадочникова М.Х. Методология исследования психофизиологических последствий постоперационного стресса у пациентов, перенесших кардиохирургическое вмешательство // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2008. (1). 25–29.

8. Ильин Е.П. Дифференциальная психофизиология мужчины и женщины. СПб.: Питер, 2002. 544 с.

9. Кабанов М.М., Личко А.Е., Смирнов В.М. Методы психологической диагностики и коррекции в клинике. Л.: Медицина, 1983. 102–115.

10. Капустина А.Н. Многофакторная личностная методика Р. Кеттелла. СПб.: Речь, 2007. 104 с.

11. Ласовская Т.Ю., Брост Е.П., Джулай Л.В., Байкалов А.А. Социально-демографические характеристики больных с поясничным остеохондрозом // Психотерапия, психоанализ, практическая и клиническая психология в здравоохранении, образовании, социальной работе. Проблемы взаимодействия и пути их решения. Новокузнецк, 2005. 14–15.

12. Личко А.Е. Личностный опросник Бехтеревского института (ЛОБИ) // Методы психологической диагностики и коррекции в клинике. Л.: Медицина, 1983. 312 с.

13. Павленко С.С., Фомин Г.И., Торгашев М.Н. Распространенность депрессивных симптомов у лиц, страдающих хронической болью в нижней части спины // Хирургия позвоночника. 2004. (4). 74–78.

14. Постнов В.Г., Левин Е.А. Психофизиологические исследования в кардиохирургии // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2010. (3). 45–49.

15. Фомичев Н.Г., Симонович А.Е., Байкалов А.А., Крутько А.В. Декомпрессивно-стабилизирующие и пластические операции с использованием имплантатов из пористого никелида титана при дегенеративных поражениях поясничного отдела позвоночника // Вестн. травматол. ортопедии. 2005. (2). 3–10.

16. Черепанов Е.А. Русская версия опросника Освестри: культурная адаптация и валидность // Хирургия позвоночника. 2009. (3). 93–98.

17. Bouras N., Bartlett J.R., Neil-Dwyer G. et al. Psychological aspects of patients having multiple operations for low back pain // Br. J. Med. Psychol. 1984. 57. 147–151.

18. Davis R.C., Buchwald A.M. An exploration of somatic response patterns: Stimulus and sex differences // J. Compar. Physiol. Psychol. 1957. 50. 44–52.

19. Frey M.E., Manchikanti L., Benyamin R.M. et al. Spinal cord stimulation for patients with failed back surgery syndrome: A systematic review // Pain Physician. 2009. 12. 379–397.

20. Schofferman J., Reynolds J., Herzog R. et al. Failed back surgery: etiology and diagnostic evaluation // Spine J. 2003. 3. 400–403.

21. Slipman C.W., Shin C.H., Patel R.K. et al. Etiologies of failed back surgery syndrome // Pain Med. 2002. 3. 200–214.

22. Waguespack A., Schofferman J., Slosar P. et al. Etiology of long-term failures of lumbar spine surgery // Pain Med. 2002. 3. 18–22.

23. Zigmond A.S., Snaiht R.P. The Hospital Anxiety and Depression scale // Acta Psychiatr. Scand. 1983. 67. 361–370.

THE INFLUENCE OF PSYCHOLOGICAL FACTORS ON POST-OPERATION DYNAMICS OF SPINAL PAIN

**Aleksandr Vladimirovich KRUTKO¹, Andrey Aleksandrovich BAIKALOV¹,
Dmitry Valerevich DYACHKOV², Aleksandr Nikolaevich SAVOSTYANOV²**

¹ *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

² *Research Institute of Physiology SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 4*

The influence of psychological factors on the pain dynamics within pre- and post operative conditions was studied in 155 patients, who had surgery intervention for correction of pain syndrome of vertebrate osteochondrosis. The intensity of pain syndrome was estimated by means of 5-points visual-analogue scale. The individual psychological peculiarities of people under the conditions of social communications were estimated by means of Kettell questionnaire. The types of reaction to disease were studied by means of the Leningrad questionnaire of Bechterev's Institute. The individual personality factors increasing the risk of the pain syndrome relapse after surgery therapy were revealed in the study. It was shown, that in males and females, the increase of disease relapse was related with different psychological factors. In females, the osteochondrosis relapse was often detected in people with sensitive type of reaction to disease, whereas the osteochondrosis relapse in males was more related with paranoid type of reaction to disease.

Key words: pain syndrome, vertebrate osteochondrosis, psychological factors.

*Krutko A.V. – candidate of medical sciences, head of neurosurgery department N 2, senior researcher;
e-mail: AKrutko@niito.ru*

Baikalov A.A. – candidate of medical sciences, senior researcher; e-mail: Baikal228@gmail.com

Dyachkov D.V. – post-graduated student; e-mail: ddy.68@mail.ru

*Savostyanov A.N. – candidate of medical sciences, doctor of philosophic sciences, head of neurolinguistic group,
senior researcher; e-mail: Alexander.Savostyanov@gmail.com*

ОЦЕНКА ФУНКЦИИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ НА ЭТАПАХ ГОЛОСОВОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ

Елена Александровна КРАСАВИНА, Лидия Николаевна БАЛАЦКАЯ,
Евгений Лхаматренович ЧОЙНЗОНОВ, Лилия Семеновна НАЗАРОВА

ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН
634028, г. Томск, ул. Савиных, 12/1

В исследование включены 60 человек в возрасте от 40 до 70 лет. Оценены показатели функции внешнего дыхания (ФВД) больных раком гортани после ларингэктомии и органосохраняющих операций на этапах восстановления голосовой функции в сравнении со здоровыми лицами. У всех пациентов после хирургического лечения до начала этапа голосовой реабилитации исследуемые показатели ФВД были хуже, чем у практически здоровых лиц, нарушения функции внешнего дыхания появлялись в зависимости от объема оперативного вмешательства, в группе больных после ларингэктомии они носили более выраженный характер. В результате логовосстановительной терапии у пациентов после органосохраняющего лечения показатели функции внешнего дыхания приближались к нижней границе нормы, у ларингэктомированных больных выявлены незначительные улучшения параметров функции внешнего дыхания с выраженными рестриктивными и обструктивными нарушениями II–III степени.

Ключевые слова: рак гортани, ларингэктомия, органосохраняющие операции гортани, функция внешнего дыхания, голосовая реабилитация.

Рак гортани представляет собой одну из самых сложных медико-социальных проблем современной клинической онкологии. Среди опухолей верхних дыхательных путей заболеваемость раком гортани занимает первое место (от 65 до 70 %). Распространенность данной нозологии в России в 2010 г. составила 29,2 на 100 000 населения, количество заболевших по сравнению с 2000 г. увеличилось в 1,3 раза. Основное место в лечении больных раком гортани занимает комбинированный метод, ведущим компонентом которого является хирургическое вмешательство в объеме ларингэктомии или органосохраняющей операции гортани [8, 9].

Оперативное лечение по поводу рака гортани приводит к нарушению дыхательной и голосообразующей функций. При полном удалении гортани трахея разобщается с глоткой и фиксируется на передней поверхности шеи, верхние дыхательные пути укорачиваются на 15–18 см, нарушается механизм внешнего дыхания: отсутствует носовое и ротовое дыхание. Пациенты вынуждены адаптироваться к новому типу дыхания через трахеостому. При исследо-

вании функции внешнего дыхания (ФВД) выявлено, что у пациентов после ларингэктомии дыхание дезорганизовано и весьма лабильно, нарушается соотношение длительности вдоха и выдоха. Жизненная емкость легких (ЖЕЛ) снижена, уменьшен объем форсированного выдоха, наблюдается учащение дыхания. Авторы связывают эти изменения дыхательной функции с нарушением рефлекторных связей в верхних дыхательных путях [4, 6, 10].

В настоящее время разработаны и широко используются органосохраняющие и функционально-щадящие операции гортани, которые выполняются в различных объемах: хордэктомия, горизонтальная резекция, гемиларингэктомия, переднебоковая резекция [9].

Степень нарушения голосовой и дыхательной функций после резекций гортани зависит от объема операции. После органосохраняющих операций нарушаются условия аэродинамики, уменьшается сопротивление верхних дыхательных путей. По данным многих авторов, отмечаются нарушения показателей ФВД: снижается жизненная емкость легких, уменьшается объем

Красавина Е.А. – к.б.н., логопед отделения опухолей головы и шеи,
e-mail: KrasavinaEA@mail2000.ru

Балацкая Л.Н. – д.б.н., ведущий научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи

Чойнзонов Е.Л. – д.м.н., проф., академик РАМН, директор, руководитель отделения опухолей головы и шеи

Назарова Л.С. – к.м.н., терапевт

форсированного выдоха, наблюдается учащение дыхания. Больные отмечают нарушения дыхания: нехватку воздуха при шепотной речи, одышку при ходьбе и при незначительной физической нагрузке [1, 6].

На сегодняшний день существует три метода восстановления голосовой функции больных, перенесших ларингэктомию: логопедический (формирование пищевого голоса), хирургический (трахеопищеводное шунтирование с установкой голосового протеза) и голосовые аппараты.

Восстановление голосовой функции после органосохраняющих операций гортани основывается на компенсаторных возможностях оставшейся части гортани [6, 9]. Эффективность голосовой реабилитации зависит от ФВД, так как энергетической основой голоса является воздух, который доставляется легкими, оформляется в фазе выдоха в восходящую воздушную колонну трахеи и, продвигаясь под давлением, приобретает звучность и соответствующую акустическую характеристику под влиянием препятствий и полостей надларингиального пространства. Дыхание при фонации значительно отличается от обычного спокойного дыхания, связанного с обеспечением газообмена в покое. Фаза выдоха, во время которой озвучивается воздушная струя, значительно удлиняется [5].

Проведение спирографического исследования позволило изучить изменения показателей функции внешнего дыхания на этапах восстановления звучной речи и объективно оценить влияние реабилитационных мероприятий у больных после ларингэктомии на адаптацию к новому типу дыхания через трахеостому, у пациентов после резекций гортани на восстановление физиологического и фонационного дыхания.

Цель исследования – изучить параметры функции внешнего дыхания больных после ларингэктомии и органосохраняющих операций гортани на этапах голосовой реабилитации с применением адаптивного биоуправления.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включено 60 человек в возрасте от 40 до 70 лет, которые были разделены на три группы. В первую исследуемую группу вошли 25 пациентов после хирургического этапа комбинированного лечения в объеме ларингэктомии, во вторую – 15 пациентов после органосохраняющего лечения гортани, в третью – 20 практически здоровых лиц без голосовой патологии.

В ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН разработаны методики восстановления голосовой

функции больных после ларингэктомии путем формирования пищевого голоса и больных после органосохраняющего лечения гортани с применением адаптивного биоуправления на основе математического моделирования голосообразования. Вопрос о начале голосовой реабилитации обсуждался совместно с хирургом-онкологом, логопедом, психологом, при необходимости назначалась консультация терапевта или психиатра. Индивидуально для каждого пациента составлялась программа проведения реабилитационных мероприятий в зависимости от общего состояния, возраста, объема оперативного вмешательства, нервно-психического состояния, трудовой направленности. Непременным условием являлось соблюдение основных принципов реабилитации: раннее начало логотерапии, непрерывность, преемственность, этапность, комплексный характер, переход от простого к сложному.

Для улучшения адаптации пациентов, перенесших полное удаление гортани, к новым условиям дыхания через трахеостому на этапе голосовой реабилитации выполнялся разработанный для данной категории больных комплекс лечебно-физкультурных упражнений, способствующих улучшению функции внешнего дыхания. Коррекция физиологического и фонационного дыхания пациентов после резекций гортани проводилась с помощью комплекса лечебно-физкультурных упражнений, включающего дыхательную гимнастику [3, 6].

ФВД изучалась методом спирографии. Спирография – это один из наиболее распространенных методов оценки дыхательной функции, основанный на графической регистрации изменений легочных объемов во время выполнения различных дыхательных маневров [7].

Спирографическое исследование у больных раком гортани проводилось до хирургического лечения, в начале этапа голосовой реабилитации и после окончания голосовой реабилитации. Группа здоровых лиц обследовалась однократно. Оценивали легочные объемы и емкости и показатели легочной вентиляции.

Исследование функции внешнего дыхания выполнялось с использованием спирографа «Microspiro» (Япония). Пациенты обследовались в условиях покоя, натошак или через 2–3 часа после легкого завтрака, после чего больному рекомендовалось полежать 30–40 минут. Использовался метод спирографии с регистрацией петли «поток – объем форсированного выдоха» (ПОФВ). Регистрация ПОФВ позволяет выявить начальные доклинические проявления обструкции бронхов и представляет собой метод диф-

ференциальной диагностики преимущественно поражения центральных и периферических дыхательных путей. В работе анализировались ЖЕЛ (л), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФвд, л/с), пиковая объемная скорость (ПОС, л/с), максимальная объемная скорость в момент выдоха первых 25 % ФЖЕЛ (МОС 25, л/с), в момент выдоха первых 50 % ФЖЕЛ (МОС 50, л/с), в момент выдоха первых 75 % ФЖЕЛ (МОС 75, л/с), средняя объемная скорость между 25 и 75 % объема ФЖЕЛ (СОС 25–75, л/с). Уровень бронхиальной обструкции определялся на основании результатов измерения ОФвд, максимальных и средних объемных скоростей форсированного выдоха. Нарушение бронхиальной проходимости в крупных бронхах характеризовалось снижением ОФвд (менее 80 % от должных величин), МОС 25 (менее 60 % должной величины) и нормальными величинами МОС 50, МОС 75, СОС 25–75. Уменьшение показателей МОС 50, МОС 75, СОС 25–75 ниже 60 % должной величины при нормальных значениях показателей ОФвд, ПОС и МОС 25 свидетельствовало о нарушенной проходимости бронхов малого калибра. Одновременное снижение значений параметров ОФвд, ПОС, МОС 25, МОС 50, МОС 75, СОС 25–75 являлось признаком генерализованной бронхиальной обструкции.

Статистическая обработка результатов проводилась методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента для зависимых переменных. Для каждого вариационного ряда определена средняя арифметическая величина (*M*), стандартная ошибка средней

арифметической величины (*m*). В таблицах данные представлены в виде $M \pm m$. Достоверность различий средних арифметических величин определена по абсолютному показателю точности (*P*) по таблице процентных точек распределения Стьюдента в зависимости от коэффициента достоверности (*t*) и числа степеней свободы (*n*). На основании критерия *t* по таблице Стьюдента определена вероятность различия (*p*). Различие считалось статистически значимым при $p < 0,05$, т. е. в тех случаях, когда вероятность различия составляла больше 95 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных раком гортани на дооперационном этапе наблюдались нарушения параметров функции внешнего дыхания в сравнении с группой практически здоровых лиц, кроме частоты дыхания. После хирургического этапа комбинированного лечения у больных раком гортани отмечалось ухудшение всех исследуемых параметров функции внешнего дыхания, которое выражалось в уменьшении жизненной емкости легких, объема форсированного выдоха, пиковой объемной скорости, максимальной объемной скорости в момент выдоха, а также в увеличении частоты дыхания и максимальной вентиляции легких. В группе больных после ларингэктомии указанные нарушения носили более выраженный характер ($p < 0,05$) (табл. 1).

После проведения этапа логовосстановительной терапии в группе больных с органосохраняющими операциями гортани выявлено улучшение параметров ФВД: уменьшение

Таблица 1

Параметры функции внешнего дыхания у больных раком гортани на этапах логовосстановительной терапии, % от должных величин ($M \pm m$)

Параметр ФВД	Ларингэктомия (<i>n</i> = 25)			Органосохраняющие операции гортани (<i>n</i> = 15)			Практически здоровые лица (<i>n</i> = 20)
	До операции	До голосовой реабилитации	После голосовой реабилитации	До операции	До голосовой реабилитации	После голосовой реабилитации	
ЖЕЛ	70,2 ± 2,1	50,4 ± 1,9	52,5 ± 2,0	74,3 ± 2,3	60,3 ± 2,4*	65,8 ± 2,0	86,2 ± 2,2
ОФВ1	71,6 ± 2,0	40,8 ± 1,6*	43,1 ± 1,9**	74,1 ± 2,3	56,4 ± 2,2*	64,4 ± 2,6**	84,5 ± 1,9
ПОС	69,5 ± 3,1	37,2 ± 1,8*	40,8 ± 1,9	73,5 ± 3,2	56,5 ± 2,9*	63,2 ± 2,5**	81,9 ± 1,5
СОС 25–75	62,5 ± 2,2	31,4 ± 2,4*	33,1 ± 2,5**	67,4 ± 2,1	48,4 ± 3,2*	64,5 ± 3,0**	83,4 ± 2,1
МОС 25	60,4 ± 1,1	29,4 ± 2,1*	32,4 ± 2,3**	65,6 ± 1,3	44,7 ± 3,0*	51,9 ± 3,1**	78,4 ± 2,4
МОС 50	60,1 ± 2,0	30,2 ± 2,0*	33,5 ± 2,1	65,4 ± 2,3	45,2 ± 2,9*	55,5 ± 2,5**	76,8 ± 2,6
МОС 75	57,4 ± 1,9	28,4 ± 2,6*	30,4 ± 2,5	61,9 ± 2,1	41,9 ± 2,7*	52,2 ± 2,1**	76,8 ± 2,6
МВЛ	86,2 ± 2,9	139,5 ± 2,1*	130,4 ± 2,8**	83,1 ± 2,2	118,1 ± 2,9*	109,5 ± 2,0**	70,5 ± 2,5

Примечание. Здесь и в табл. 2 обозначены достоверные ($p < 0,05$) отличия от соответствующих показателей пациентов: * – до операции, ** – до голосовой реабилитации.

Таблица 2

Количество больных раком гортани с разными степенями вентиляционной недостаточности до и после логовосстановительной терапии, абсолютное число, %

Степень ВН	Ларингэктомия			Органосохраняющие операции гортани			Практически здоровые лица
	До операции	До голосовой реабилитации	После голосовой реабилитации	До операции	До голосовой реабилитации	После голосовой реабилитации	
0	0	0	0	0	0	0	14 (70 %)
I	18 (72 %)	0	0	11 (73,3 %)	4 (26,8 %)	9 (60 %)**	6 (30 %)
II	7 (28 %)	11 (44 %)	15 (60 %)**	4 (26,7 %)	9 (60 %)	5 (33,3 %)**	0
III	0	14 (56 %)	10 (40 %)**	0	2 (13,3 %)	1 (6,7 %)**	0
Всего	25	25	25	15	15	15	20

бронхообструктивного компонента и гипервентиляционного синдрома ($p < 0,05$). У ларингэктомированных больных после окончания логопедических занятий отмечены незначительные улучшения параметров ФВД с достаточно выраженными рестриктивными и обструктивными нарушениями II–III степени. Отмечен гипервентиляционный синдром за счет учащения частоты дыхательных движений, хотя данный показатель уменьшился по сравнению с послеоперационным периодом, до начала голосовой реабилитации. Небольшая положительная динамика в улучшении вентиляционной функции легких у больных после ларингэктомии, вероятно, обусловлена слабыми компенсаторными возможностями организма. У данной категории больных наблюдалась гиперсекреция мокроты по причине нарушения кашлевого рефлекса.

У всех больных раком гортани, обследованных до операции, наблюдалась вентиляционная недостаточность (ВН) I–II степени в связи с тем, что все пациенты в анамнезе длительное время курили и имели ряд сопутствующих легочных заболеваний: хронический бронхит курильщика, пневмофиброз, эмфизему легких той или иной степени выраженности, стеноз гортани в связи с распространенностью опухолевого процесса (табл. 2). В группе здоровых лиц выявлены ВН 0–I степени (у 14 больных не отмечено нарушений ФВД, у 6 больных зарегистрирована ВН I степени). В послеоперационном периоде выраженность вентиляционных нарушений четко коррелировала с объемом операции. Так, значительно выраженные рестриктивные и обструктивные нарушения отмечены у больных после ларингэктомии по сравнению с дооперационными показателями ($p < 0,05$). Это можно объяснить тем, что в результате полного удаления гортани трахея разъединена с глоткой, верхние дыхательные пути укорочены, выключено ротовое и носовое дыхание, нарушен механизм каш-

левого рефлекса [4, 9]. После органосохраняющих операций степень ВН значительно менее выражена, чем у ларингэктомированных больных, но наблюдались рестриктивные и обструктивные нарушения, хотя достоверных различий с дооперационными параметрами отмечено не было ($p > 0,05$).

После проведения голосовой реабилитации в группе пациентов, перенесших органосохраняющие операции, отмечалось достоверное снижение количества случаев ВН III степени и, напротив, достоверное увеличение числа случаев ВН I степени – до $60 \pm 12,6$ %, что свидетельствовало об улучшении параметров ФВД в результате проведения логовосстановительной терапии (см. табл. 2). У больных после полного удаления гортани выявлено уменьшение количества случаев ВН III (с 56 ± 7 до $40 \pm 9,8$ %). Незначительная положительная динамика параметров ФВД, отмеченная у пациентов I исследуемой группы, связана как с объемом хирургического вмешательства, так и с малым периодом времени, прошедшим после операции (1,5–2 месяца), недостаточным для адаптации организма к новым условиям дыхания.

После проведения голосовой реабилитации вентиляционные нарушения у больных после ларингэктомии достоверно более выражены, чем у пациентов после органосохраняющего лечения ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нарушение функции внешнего дыхания у больных раком гортани зависит от объема оперативного вмешательства. В группе пациентов после ларингэктомии они носят более выраженный характер: степень вентиляционной недостаточности у них на всех этапах исследования выше, чем у пациентов после резекций гортани. В результате логовосстановительной терапии с применением адаптивного

биоуправления у пациентов после органосохраняющего лечения показатели функции внешнего дыхания приближаются к нижней границе нормы, у ларингэктомированных больных выявлены незначительные улучшения параметров функции внешнего дыхания с выраженными рестриктивными и обструктивными нарушениями II–III степени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балацкая Л.Н., Кицманюк З.Д., Чойнзонов Е.Л., Волкова Л.И. Показатели функции внешнего дыхания после хирургического этапа комбинированного лечения рака гортани // Сиб. мед. журн. 2003. (4). 28–30.

2. Балацкая Л.Н., Чойнзонов Е.Л., Красавина Е.А., Бондаренко В.П., Корнилов А.Ю., Коцубинский В.П. Применение биологической обратной связи в комплексной реабилитации больных после полного удаления гортани // Сиб. онколог. журн. 2004. (4). 17–20.

3. Василенко Ю.С. Реабилитация больных после экстирпации гортани // Вестник оториноларингологии. 2003.(6). 30–33.

4. Красавина Е.А. Адаптивное биоуправление в голосовой реабилитации больных раком гортани: автореф. дис. ...канд. биол. наук. Новосибирск, 2010.

5. Максимов И. Фониатрия. М., Медицина, 1987. 283 с.

6. Таптапова С.Л. Восстановление звучной речи у больных после резекций и удаления гортани. М.: Медицина, 1985. 92 с.

7. Тетенев Ф.Ф., Бодрова Т.Н., Тетенев К.Ф. Биомеханика дыхания больных с прогрессирующей мышечной дистрофией// Неврология и психиатрия. 2000. (8). 38–41.

8. Чиссов В.А., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2010 году. М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России. 2011.188 с.

9. Чойнзонов Е.Л., Балацкая Л.Н., Мухамедов М.Р. Рак гортани. Современные аспекты лечения и реабилитации. Томск: НТЛ, 2006. 277 с.

10. Ferrier M.B., Spuesens E.B., Cessie S.Le. Morbidity as a Major Risk Factor for Mortality and Complications in Head and Neck Surgery // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2005.131. 27–32.

ASSESSMENT OF EXTERNAL RESPIRATION FUNCTION IN LARYNGEAL CANCER PATIENTS AT DIFFERENT STAGES OF VOCAL REHABILITATION

Elena Aleksandrovna KRASAVINA, Lidiya Nikolaevna BALATSKAYA,
Evgeny Lkhamatserenovich CHOINZONOV, Liliya Semenovna NAZAROVA

FSBI «RI of Oncology» of SB RAMS
634028, Tomsk, Savinykh str., 12/1

The study included 60 males aged from 40 to 70 years. Parameters of external respiratory function (ERF) in laryngeal cancer patients after laryngectomy and organ-preserving surgery were assessed at different stages of vocal rehabilitation and compared with those observed in healthy subjects. All patients after surgical treatment before onset of vocal rehabilitation had impaired ERF parameters compared with healthy subjects. Impairment of the external respiratory function depended on the extent of surgery being more pronounced in laryngectomized patients. Voice rehabilitation of patients with organ-preserving surgery resulted in improvement of ERF parameters showing lower limits of normal, while laryngectomized patients had insignificant improvement of ERF parameters with expressed II–III grade restrictive and obstructive disorders.

Key words: laryngeal cancer, laryngectomy, organ preservation surgery of the larynx, external respiratory function, vocal rehabilitation.

Krasavina E.A. – candidate of biological sciences, logopedist of the Head and Neck Tumor Department

Balatskaya L.N. – doctor of biological sciences, leading researcher of the Head and Neck Tumor Department

Choinzonov E.L. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, supervisor of the Head and Neck Tumor Department

Nazarova L.S. – candidate of medical sciences, therapist

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У БЕСПЛОДНЫХ ЖЕНЩИН БУРЯТСКОЙ ЭТНИЧЕСКОЙ ГРУППЫ

Любовь Ильинична КОЛЕСНИКОВА¹, Марина Александровна ДАРЕНСКАЯ¹,
Людмила Анатольевна ГРЕБЕНКИНА¹, Наталья Викторовна СЕМЕНОВА¹,
Альбина Владимировна ЛАБЫГИНА¹, Зорикто Юрьевич ДАРЖАЕВ²,
Тумэн Будажапович ЦЫРЕНОВ³

¹ ФГБУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16

² ГУЗ Республиканский перинатальный центр
670031, г. Улан-Удэ, ул. Солнечная, 4а

³ ГУЗ Республиканская клиническая гинекологическая больница
670031, г. Улан-Удэ, пр. Победы, 6

Обследовано 50 женщин с первичным и вторичным бесплодием бурятской этногруппы, проживающих на территории Республики Бурятия. Отмечено, что у пациенток с первичным бесплодием изменения интенсивности липопероксидации носят более выраженный характер, что сопровождается снижением общей антиокислительной активности крови, активности супероксиддисмутазы и содержания α -токоферола.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, бесплодие, бурятская этногруппа.

Около 10–15 % брачных пар в современных экономически развитых странах и около 17–20 % в России являются бесплодными [9, 11, 13], столько же обладают пониженной плодовитостью. Значительно возросла доля женщин старшего репродуктивного возраста, обратившихся в лечебные учреждения по поводу лечения бесплодия [13]. Современная демографическая ситуация в Республике Бурятия характеризуется устойчивым сокращением численности населения. По данным Госкомстата, за период 1991–2009 гг. численность населения в республике снизилась на 88,5 тыс. человек, что обусловлено как миграционным оттоком, так и низким уровнем рождаемости [12]. В Республике Бурятия проведено исследование

частоты бесплодия среди городских жителей, которое составило 20,01 %, что соответствует данным проведенного эпидемиологического исследования в соседней Иркутской области, где установлена частота бесплодия $19,56 \pm 1,1$ % (у жительниц городов – $18,94 \pm 1,3$ %; в сельской местности – $21,17 \pm 0,74$ %) [8, 12]. При анализе форм бесплодия установлено, что на территории Республики Бурятия, как и в Иркутской области и в целом по России, преобладает вторичное бесплодие [12].

Многочисленные исследования подтверждают этиологическую роль свободных радикалов в генезе женского бесплодия [7, 20, 17]. Развитие окислительного стресса зачастую происходит вследствие снижения буферной емкости

Колесникова Л.И. – д.м.н., проф., член-кор. РАМН, директор, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Даренская М.А. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории патофизиологии репродукции, e-mail: tops_my@front.ru

Гребенкина Л.А. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории патофизиологии репродукции, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Семенова Н.В. – к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии репродукции, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Лабыгина А.В. – д.м.н., зав. лабораторией гинекологической эндокринологии, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Даржаев З.Ю. – к.м.н., врач-акушер-гинеколог, зав. центром планирования и репродукции человека, e-mail: rpcbur@mail.ru

Цыренов Т.Б. – врач отделения оперативной гинекологии, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

системы антиоксидантной защиты (АОЗ), нарушения ее мобилизации в ответ на повышение интенсивности продукции активных форм кислорода и процессов, связанных с окислительной деструкцией биологически активных соединений [3, 14].

В условиях многонациональности регионов России метаболические проявления многих заболеваний [5, 10], в том числе бесплодия, также могут иметь свою специфику. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояния системы АОЗ у женщин бурятской этногруппы с первичным и вторичным бесплодием.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 50 женщин бурятской этногруппы, обратившихся по поводу бесплодия в браке в Республиканский перинатальный центр г. Улан-Удэ (средний возраст $31,0 \pm 4,97$ года). Все пациентки были разделены на 2 группы: с первичной (отсутствие беременности в анамнезе, 25 женщин) и вторичной (наличие беременности в прошлом, 25 женщин) формами бесплодия. Контрольная группа состояла из 20 женщин (средний возраст $29,5 \pm 2,74$ года). Получение информированного согласия на участие в проводимом исследовании являлось обязательной процедурой при включении пациентки в одну из групп. В работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации от 1964 года, с последним пересмотром в 2000 году. Обязательным условием включения в основные группы явилось наличие бесплодия в браке, т. е. беременность не наступала при регулярной половой жизни пары (без предохранения) в течение одного года и более. В контрольную группу вошли практически здоровые женщины с реализованной репродуктивной функцией. Критериями отбора в контрольную группу являлись наличие беременности в течение последних трех лет, применение барьерной, химической или внутриматочной контрацепции. Обследование проводилось по стандартам ВОЗ и включало анкетирование и анализ медицинской документации, протоколов лапароскопических операций, общеклиническое обследование, гинекологическое бимануальное обследование, УЗИ органов малого таза, гистеросальпингографию, эндоскопические методы обследования, обследование супруга.

Материалом исследования служила сыворотка крови и гемолизаты. Забор крови проводили

из локтевой вены в соответствии с общепринятыми требованиями. Интенсивность процессов ПОЛ в сыворотке крови оценивали по содержанию его субстратов с сопряженными двойными связями (Дв. св.), а также продуктов – диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ) [1], продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) [2]. Состояние системы АОЗ оценивали по общей антиокислительной активности сыворотки крови [4], содержанию α -токоферола и ретинола в сыворотке [16], активности супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах [19]. Измерения проводили на спектрофлуорофотометре «Shimadzu RF-1501» (Япония), спектрофотометре «Shimadzu RF-1650» (Япония).

При анализе межгрупповых различий для независимых выборок использовали методы математической статистики, реализованные в лицензионном интегрированном статистическом пакете комплексной обработки данных STATISTICA 6.1 Stat-Soft Inc, США (правообладатель лицензии – ФГБУ НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН). Вычисляли среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Статистически значимых различий по частоте встречаемости причин бесплодия (эндокринные факторы: дисфункция яичников, поликистоз яичников, гиперпролактинемия, гиперандрогения надпочечникового генеза, гипергонадотропная аменорея; трубно-перитонеальный фактор, маточный фактор) в двух группах обследованных выявлено не было.

Учитывая ключевую роль процессов ПОЛ в патогенезе репродуктивных осложнений [15, 6], были обследованы женщины бурятской этногруппы с первичной и вторичной формами бесплодия. Результаты исследования процессов липопероксидации показали, что у женщин бурятской этногруппы с первичным бесплодием по сравнению с группой контроля происходило статистически значимое увеличение содержания ДК (в 1,35 раза, $p = 0,010$), КД и СТ (в 1,71 раза, $p = 0,000$) и ТБК-активных продуктов (в 2,4 раза, $p = 0,000$) (табл. 1). Состояние системы ПОЛ у пациенток с вторичным бесплодием характеризовалось значимым увеличением уровня ТБК-активных продуктов в 2,45 раза ($p = 0,000$) (см. табл. 1).

Таблица 1

Содержание субстратов и продуктов ПОЛ в сыворотке крови бесплодных женщин бурятской этногруппы ($M \pm m$)

Группа	Субстраты с двойными связями, усл.ед.	ДК, мкмоль/л	КД и СТ, усл. ед.	ТБК-активные продукты, мкмоль/л
Контроль	2,76 ± 0,15	2,10 ± 0,12	0,58 ± 0,05	0,75 ± 0,07
Первичное бесплодие	2,87 ± 0,20	2,83 ± 0,18*	0,99 ± 0,08*	1,80 ± 0,14*
Вторичное бесплодие	2,17 ± 0,27	1,88 ± 0,23	0,51 ± 0,07	1,84 ± 0,15*

Примечание. Здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя женщин контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 2

Состояние системы АОЗ в группах бесплодных женщин бурятской этногруппы

Группа	АОА, усл. ед.	Активность СОД, усл. ед.	Содержание α -токоферола, мкмоль/л	Содержание ретинола, мкмоль/л
Контроль	17,28 ± 0,95	1,87 ± 0,01	10,03 ± 0,68	0,55 ± 0,03
Первичное бесплодие	13,88 ± 1,36*	1,75 ± 0,03*	7,91 ± 0,28*	0,62 ± 0,07
Вторичное бесплодие	11,20 ± 1,48*	1,67 ± 0,08*	9,69 ± 0,87	0,74 ± 0,08*

При оценке системы АОЗ в группе женщин с первичным бесплодием было обнаружено статистически значимое снижение величины общей АОА (на 20 %, $p = 0,042$), содержания основного неферментативного антиоксиданта α -токоферола (на 21 %, $p = 0,009$) и незначительное уменьшение активности антиоксидантного фермента СОД в сравнении с контрольной группой (табл. 2). Система АОЗ у женщин с диагнозом вторичное бесплодие характеризовалась статистически значимым снижением величины общей АОА сыворотки крови (на 35 %, $p = 0,001$), активности СОД (на 11 %, $p = 0,008$) и увеличением концентрации ретинола (на 35 %, $p = 0,040$) (см. табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ интенсивности процессов ПОЛ у пациенток бурятской этногруппы показал их активацию, проявляющуюся в увеличении содержания ТБК-активных продуктов относительно контрольных значений независимо от формы бесплодия. Результаты, полученные сотрудниками Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, а также данные литературы свидетельствуют о том, что независимо от фактора бесплодия при данной патологии происходит повышение концентрации атерогенных и снижение уровня антиатерогенных липопротеидов, что указывает на формирование дислипидемии [7, 6]. Соответственно, происходит усиление процессов липопероксидации, которое приводит к

образованию и накоплению высокотоксичных соединений и, в конечном счете, к дестабилизации клеточных мембран и субклеточных структур [3].

Несмотря на то что процессы липопероксидации непрерывно происходят во всех органах и тканях, они не приводят к развитию их повреждения, поскольку для каждой биологической структуры характерно поддержание окислительных реакций на стационарном уровне. Эта стационарность в определенной степени достигается за счет функционирования согласованной системы антиоксидантной защиты [14].

Результаты исследования в группе пациенток бурятской этногруппы с первичным бесплодием показали снижение активности СОД, а также интегрального показателя – общей АОА крови. СОД является основным ферментом антиоксидантной защиты в организме и данные изменения, несомненно, могут свидетельствовать о снижении адаптационно-компенсаторных возможностей бесплодных женщин бурятской этногруппы. Кроме того, в условиях патологического процесса имеет место снижение содержания жирорастворимого витамина антиоксидантного действия – α -токоферола, что напрямую может влиять на репродуктивную функцию женщин. Известно, что витамины, как и гормоны, являются высокоактивными соединениями, причастными к работе всех звеньев регуляции гонадотропной функции гипофиза. Включаясь в патогенез заболевания, как правило, вторично, процессы липопероксидации иг-

рают важную роль в прогнозе и исходе болезни [15, 18]. К возможным причинам развития окислительного стресса также можно отнести эндокринные нарушения (гиперпролактинемия, гиперандрогения, неполноценная лютеиновая фаза), которые имеют место при бесплодии. Известно, что гиперпролактинемия, сопровождающаяся гипоестрогенией, может вызывать изменения липидного спектра в сторону ускорения процессов липосинтеза [17]. Возможно, женщины бурятской этногруппы с первичным бесплодием находятся в группе риска в отношении дальнейшего прогноза заболевания. При вторичном бесплодии у больных бурятской этногруппы при сниженной общей АОА сыворотки крови отмечается компенсаторное накопление жирорастворимого ретинола. Ретинол в настоящее время принято считать не только антиоксидантом прямого действия (ответственным совместно с токоферолом за «гашение» перекисных радикалов), но и фактором, оказывающим антиокислительный опосредованный эффект через гормональную регуляцию системного метаболизма и функционирование многих органов и систем организма [7]. В данном случае можно говорить об определенных защитных явлениях при наличии вторичного бесплодия у представительниц бурятской этногруппы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных клинико-биохимических исследований можно заключить, что у пациенток с бесплодием независимо от формы имеет место активация процессов липопероксидации в сочетании с недостаточностью АОЗ. Вместе с тем у женщин бурятской этногруппы с первичным бесплодием отмечаются более выраженные изменения, сопровождающиеся истощением антиоксидантных механизмов. Полученные данные позволяют уточнить механизмы развития различных форм бесплодия у пациенток бурятской этногруппы. Возможно использование результатов исследования для прогнозирования течения заболевания, а также при дифференцированном подходе в назначении антиоксидантной терапии у женщин, страдающих бесплодием.

Исследование проводилось при поддержке гранта Президента РФ НШ - 494.2012.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в геп-

тан-изопропанольных экстрактах крови // *Вопр. мед. химии.* 1989. (1). 127–131.

2. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль А.М. Способ определения малонового диальдегида в сыворотке крови по реакции с тиобарбитуровой кислотой // *Вопр. мед. химии.* 1987. (1). 118–121.

3. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука / Интерпериодика», 2001. 343 с.

4. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. и др. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеинов // *Лаб. дело.* 1988. (5). 59–62.

5. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Бардымова Т.П. и др. Изучение состояния процесса липопероксидации у женщин различных этнических групп с угрозой прерывания беременности // *Бюл. ВСНЦ СО РАМН.* 2010. (6). 31–33.

6. Колесникова Л.И., Семенова Н.В., Лабыгина А.В. и др. Оценка антиоксидантного статуса у женщин с эндокринным бесплодием // *Журн. акушерства и женских болезней.* 2010. (4). 57–60.

7. Корнакова Н.В. Функциональное состояние системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» у женщин с эндокринным бесплодием: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск, 2008.

8. Кузьменко Е.Т. Клинико-эпидемиологические аспекты женского бесплодия (на примере Иркутской области): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Иркутск, 2008.

9. Кулаков В.И., Лопатина Т.В. Репродуктивное здоровье населения России // *Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению* / Ред. В.И. Кулаков. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2005. 10–19.

10. Лабыгина А.В., Колесникова Л.И., Сутурина Л.В. и др. Некоторые клинические и метаболические особенности бесплодия у женщин русской и бурятской национальности // *Международный конгресс по репродуктивной медицине.* М., 2011. 105–106.

11. Овсянникова Т.В., Камилова Д.П. Эндокринное бесплодие у женщин // *Гинекологическая эндокринология.* 2-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2006. 252–283.

12. Ринчиндоржиева М.П. Женское бесплодие в промышленном городе Республики Бурятия: эпидемиология, клинические формы, факторы риска: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Иркутск, 2011.

13. Руководство по эндокринной гинекологии / Ред. Е.М. Вихляева. М.: Медицинское информационное агентство, 2002. 768 с.

14. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма // Патол. физиол. эксперим. терапия. 2007. (3). 2–18.
15. Третьякова Т.В., Кубасов Р.В., Власова О. С. и др. Взаимоотношения между содержанием в сыворотке крови токоферола, ретинола и гормонов репродуктивной системы у детей // Клин. лаб. диагностика. 2009. (12). 11–14.
16. Черняускене Р.Ч., Варишкявичене З.З., Грибаускас П.С. Одновременное определение концентраций витаминов Е и А в сыворотке крови // Лаб. дело. 1984.
17. Agarwal A., Gupta S., Sekhon L. et al. Redox considerations in reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. 10. (8). 1375–1403.
18. Brigelius-Flohé R., Galli F. Vitamin E: a vitamin still awaiting the detection of its biological function // *Mol. Nutr. Food.* 2010. 54. (5). 583–587.
19. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // *J. Biol. Chem.* 1972. 247. 3170–3175.
20. Pyari J.S., Rekha S., Singh R.K. et al. Free radicals in female infertility // *J. Obstet. Gynecol. India.* 2006. 56. (1). 64–67.

OXIDATIVE STRESS IN INFERTILE WOMEN OF BURYAT ETHNIC GROUPS

Lubov Pjijnichna KOLESNIKOVA¹, Marina Aleksandrovna DARENSKAYA¹,
Lyudmila Anatolevna GREBENKINA¹, Natalia Victorovna SEMENOVA¹,
Albina Vladimirovna LABYGINA¹, Zorikto Yurjevich DARZHAEV²,
Tumen Budazhapovich TSYRENOV³

¹ *Scientific Center of the Family Health and Human Reproduction Problems, SB RAMS*
664003, Irkutsk, Timiryazev str., 16

² *Buryat Republican Perinatal Center*
670031, Ulan-Ude, Solnechnaya str., 4a

³ *Republican Clinical Gynaecological Hospital*
670031, Ulan-Ude, Pobedy str., 6

The study involved 50 women with primary and secondary infertility of Buryat ethnic groups living in the territory of the Republic of Buryatia. It is noted that in patients with primary infertility changes in lipid peroxidation are more pronounced, which is accompanied by decrease in blood total antioxidant activity, superoxide dismutase activity and α -tocopherol level.

Key words: lipid peroxidation, antioxidant protection, infertility, Buryat ethnic groups.

Kolesnikova L.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, director,
e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Darenskaya M.A. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of pathophysiology of reproduction, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Grebenkina L.A. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of pathophysiology of reproduction, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Semenova N.V. – candidate of biological sciences, junior researcher of laboratory of pathophysiology of reproduction, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Labygina A.V. – doctor of medical sciences, head of the laboratory of gynecological endocrinology,
e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Darzhayev Z.Yu. – candidate of medical sciences, Dr. obstetrician-gynecologist, head of the center of planning and human reproduction, e-mail: rpcbun@mail.ru

Tsyrenov T.B. – Dr. of Department of Operative Gynecology, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РИСКЕ РАЗВИТИЯ ОСТРОГО ТРОМБОЗА ГЛУБОКИХ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Денис Николаевич **РОВЕНСКИХ**¹, Владимир Николаевич **МАКСИМОВ**^{2,3},
Нина Павловна **ТАТАРНИКОВА**², Станислав Александрович **УСОВ**⁴,
Михаил Иванович **ВОЕВОДА**^{2,3}

¹ МБУЗ Городская клиническая больница № 1
630075, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6

² ФГБУ НИИ терапии СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

³ ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

⁴ Новосибирский военный институт внутренних войск имени генерала армии
И.К. Яковлева МВД России
630114, г. Новосибирск, Ключ-Камышенское плато, 6/2

Острый тромбоз глубоких вен нижних конечностей (ОТГВНК) представляет собой глобальную медико-социальную проблему, по-прежнему являясь одной из причин смертности и инвалидизации в России и в индустриально развитых странах мира. Ключевое место в патогенезе развития ОТГВНК отводится феномену тромбофилии. Исследования последних лет существенно расширили наши представления о молекулярных механизмах формирования тромбофилических состояний. Весьма редкими остаются публикации по анализу «ген-генных взаимодействий» полиморфных генетических вариантов, способных влиять на развитие ОТГВНК. Материал и методы. Первую группу составили 58 пациентов с ОТГВНК (35 мужчин и 43 женщины в возрасте от 25 до 60 лет), группа контроля была отобрана из двух популяционных выборок жителей двух административных районов г. Новосибирска, обследованных в рамках популяционных программ MONICA и HAPIEE. Изучены мутации в генах протромбина (G20210A, (rs 179996), гена F5 (лейденская, A506G, (rs 6025), полиморфизм C677T (rs 1801133) в гене метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR. Заключение. Лейденская мутация выявлена у двух лиц основной группы, мутации протромбина не обнаружено. Установлено достоверное повышение частоты встречаемости генотипа аллелей TT полиморфизма C677T гена MTHFR, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла, проявляющимися гомоцистеинемией, у лиц с ОТГВНК, что может служить особенностью региона.

Ключевые слова: острый тромбоз глубоких вен нижних конечностей, тромбофилия, лейденская мутация, мутация протромбина, гомоцистеинемия.

Острый тромбоз глубоких вен нижних конечностей (ОТГВНК) с его ранним осложнением в виде тромбоэмболии легочной артерии и поздним в виде развития хронической венозной недостаточности представляет собой глобальную медико-социальную проблему, по-

прежнему являясь одной из причин смертности и инвалидизации в России и в индустриально развитых странах мира [2–4, 7]. По данным В.С. Савельева [7], в РФ частота возникновения ОТГВНК в общей популяции составляет 2 на 1000 человек ежегодно.

Ровенских Д.Н. – врач, хирург-онколог

Максимов В.Н. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

Татарникова Н.П. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и терапевтических заболеваний

Усов С.А. – д.м.н., профессор

Воевода М.И. – д.м.н., проф., член-корр. РАМН, директор, e-mail: mvoevoda@ya.ru

Ключевое место в патогенезе развития ОТГВНК отводится феномену тромбофилии [1, 4, 5]. Под термином «тромбофилия» в настоящее время подразумевают нарушения гемостаза и гемореологии, характеризующиеся повышенной склонностью к развитию тромбозов кровеносных сосудов, в основе которых лежат приобретенные и генетически обусловленные нарушения в различных звеньях гемостаза и гемореологии [3, 5, 9].

Исследования последних лет существенно расширили наши представления о молекулярных механизмах формирования тромбофилических состояний [10, 12, 13]. Во многом это объясняется успехами в изучении такой фундаментальной составляющей эндогенного риска, как генетическая предрасположенность.

Необходимость использования принципиально новых подходов при изучении генетической предрасположенности к тромбозу диктуется существующей на сегодняшний момент концепцией о полигенном характере наследственной тромбофилии [4, 8, 10–13]. В связи с этим особое внимание уделяется явлению аллельного полиморфизма, которое присуще большинству генов человека [13].

К настоящему времени выявлено несколько десятков генетических маркеров, носительство которых ассоциировано с риском развития ОТГВНК. Несмотря на интенсивные поиски новых генетических детерминант наследственной тромбофилии, данные о роли большей части полиморфизмов ДНК в формировании предрасположенности к тем или иным тромботическим проявлениям остаются весьма противоречивыми. Практически отсутствуют работы по распространенности уже известных факторов риска развития ОТГВНК. Весьма редкими остаются публикации по анализу «ген-генных взаимодействий» полиморфных генетических вариантов, способных влиять на развитие заболевания.

Цель исследования – изучить роль некоторых молекулярно-генетических факторов в риске развития ОТГВНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Первую группу составили 58 пациентов с ОТГВНК (35 мужчин и 43 женщины в возрасте от 25 до 60 лет, средний возраст $49,5 \pm 1,3$ года), последовательно поступивших в Новосибирский городской ангиохирургический центр в экстренном порядке. Критериями включения в исследование были возраст от 25 до 60 лет, установленный клинически диагноз острого тром-

боза глубоких вен нижних конечностей, верификация диагноза с помощью ультразвукового дуплексного сканирования сосудов нижних конечностей, информированное согласие пациента на включение в исследование. Критерии исключения: наличие диагностированного онкологического заболевания, регулярный прием комбинированных оральных контрацептивов, травма нижних конечностей, длительная иммобилизация ввиду наличия основного заболевания.

Группа контроля была отобрана из двух популяционных выборок (MONICA и aHAPIEE) жителей двух административных районов г. Новосибирска, типичных как для Новосибирска, так и для других крупных промышленных городов Сибири. Выборка сформирована на основе избирательных списков с использованием таблиц случайных чисел. Общий объем выборок из генеральной совокупности определялся протоколами проектов HAPIEE. В рамках проекта HAPIEE с 2003 по 2006 г. проведено обследование 9397 мужчин и женщин. Отклик составил около 70 %. Протокол получил одобрение локального этического комитета. Всеми обследуемыми предварительно подписано информированное согласие на участие в исследовании. Для сравнительного анализа сформирована группа из 580 человек (360 мужчин, 230 женщин), средний возраст $49,9 \pm 0,5$ года.

ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Полиморфизм генов тестировали по опубликованным методикам с помощью ПЦР с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В исследование были включены мутация в гене протромбина (G20210A, rs 179996), мутация в гене F5 (лейденская, A506G, rs 6025), полиморфизм C677T (rs 1801133) в гене метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR.

При выполнении статистического анализа на первом этапе определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых однонуклеотидных полиморфизмов в группе больных ОТГВНК и в контрольной группе, потом оценивали соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга в контрольной группе (по критерию χ^2). Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов с ОТГВНК проверялась с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону. В случае четырехпольных таблиц при сравнении выборок по частотам генотипов и аллелей применяли точный двусторонний критерий Фишера. Относительный риск (odds ratio, OR) заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов.

Таблица 1

Частоты генотипов лейденской мутации в гене F5 (A506G, rs6025)

Генотип	Контрольная группа		ОТГВНК	
	n	%	n	%
AG	18	3,1	2	3,4
GG	562	96,9	56	96,6

Таблица 2

Частоты генотипов полиморфизма C677T (rs1801133) в гене MTHFR

Генотип	Контрольная группа		ОТГВНК	
	n	%	n	%
CC	308	53,1	18	31,0
CT	229	39,5	26	44,8
TT	43	7,4	14	24,1

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ген V фактора свертывания находится на первой хромосоме. Механизм тромбофилии при наличии мутации Лейдена выглядит таким образом: в позиции 1691 гена, кодирующего V фактор, происходит замена аденина на гуанин, вследствие чего в 506 положении белка вместо аргинина появляется глутамин (Arg506Glu). При такой замене V фактор не расщепляется естественным физиологическим антикоагулянт-ом протеином С, как это происходит в норме, а становится устойчивым к его действию, что приводит к повышению концентрации V фактора свертывающей системы крови в сыворотке [6, 14]. В ходе исследования у 2 женщин с ОТГВНК в возрасте 39 и 33 года была выявлена мутация Лейдена (табл. 1); увеличения частоты носительства мутации Лейдена не найдено. Возможно, если сформировать большую группу женщин с ОТГВНК в возрасте до 50 лет, то вклад лейденской мутации в риск развития заболевания подтвердится.

Таблица 3

Частоты генотипов полиморфизма C677T (rs1801133) в гене MTHFR у мужчин и женщин с ОТГВНК

Генотип	Мужчины		Женщины	
	n	%	n	%
CC	8	22,9	10	43,5
CT	16	45,7	10	43,5
TT	11	31,4	3	13,0

Ген протромбина располагается на одиннадцатой хромосоме. Особенностью данной мутации является то, что замена нуклеотида располагается в 3'-нетранслируемом участке. Это означает, что нуклеотидная последовательность измененного участка гена не участвует в кодировании аминокислотной последовательности протромбина. Поэтому никаких химических изменений самого белка при наличии данной мутации не возникает, но обнаруживается увеличение его содержания в сыворотке крови, которое может быть в 1,5–2 раза выше нормы. В ходе исследования мутации гена протромбина не выявлено ни у одного исследуемого с ОТГВНК.

Ген MTHFR у человека расположен на коротком плече первой хромосомы (1p36.3). Наиболее изучен вариант, в котором нуклеотид цитозин в позиции 677, относящейся к 4-му экзону, заменен на тимидин (мутация C677T), что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина в сайте связывания фолата. У лиц, гомозиготных по аллелю Т, отмечается термолабильность MTHFR и снижение активности фермента примерно до 35 % от среднего значения, а также нарушается распределение фолатов в эритроцитах, выражающееся в накоплении формильных полиглутаматов тетраглутамата и метилированных дериватов тетрагидрофолата. Кроме того, наличие этой замены сопровождается повышением уровня гомоцистеина в крови.

Таблица 4

Частоты генотипов полиморфизма C677T (rs1801133) в гене MTHFR у мужчин и женщин с ОТГВНК в возрасте до 50 лет и 50 лет и старше

Генотип	Мужчины				Женщины			
	до 50 лет		50 лет и старше		до 50 лет		50 лет и старше	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CC	4	28,6	4	19,0	5	50,0	5	38,5
CT	8	57,1	8	38,1	4	40,0	6	46,2
TT	2	14,3	9	42,9	1	10,0	2	15,4

Исследованные группы высокодостоверно ($p < 0,0001$) различались по частотам генотипов полиморфизма С677Т (rs1801133) в гене МТНFR за счет существенного повышения доли носителей генотипа ТТ у лиц с ОТГВНК (табл. 2). Отношение шансов иметь ОТГВНК у носителей аллеля Т в 2,5 раза выше, чем у носителей генотипа СС (95 % доверительный интервал 1,4–4,5; $p = 0,001$). Несмотря на небольшой размер группы пациентов с ОТГВНК, мы разделили ее по полу для оценки частот генотипов полиморфизма С677Т (rs1801133) в гене МТНFR (табл. 3). Оказалось, что среди женщин носительство генотипа ТТ встречается значительно реже (13 %), чем среди мужчин (31 %). Конечно, настоящее исследование – по сути пилотное, и для того чтобы сделать обоснованные выводы, требуется существенное увеличение численности группы лиц с ОТГВНК. Тем не менее есть основания предположить значительный вклад нарушений фолатного обмена в риск развития ОТГВНК у мужчин.

При выделении подгрупп в зависимости от возраста (до 50 лет и 50 лет и старше) у женщин группа делится почти поровну с тенденцией к повышению доли носительниц аллеля Т среди пациенток 50 лет и старше. Мужчин с ОТГВНК в возрасте до 50 лет было в 1,5 раза меньше, чем пациентов 50 лет и старше, а доля гомозигот ТТ среди них – в 3 раза ниже (табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования изучена встречаемость лейденской мутации, мутации протромбина и частоты генотипов полиморфизма С677Т гена МТНFR. Лейденская мутация выявлена у двух пациентов с ОТГВНК, мутации протромбина не обнаружено. Установлена достоверно более высокая, чем у здоровых людей, встречаемость носительства генотипа ТТ полиморфизма С677Т гена МТНFR нарушений фолатного цикла с гомоцистеинемией у лиц с ОТГВНК, что может являться особенностью региона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баешко А.А. Факторы риска тромбоза глубоких вен нижних конечностей // *Ангиология сегодня*. 2002. (9). 9–14.
2. Балуда В.П., Балуда М.В., Гольдберг А.П., Салманов П.Л. Претромботическое состояние.

Тромбоз и его профилактика. М.: Зеркало-М, 1999. 297 с.

3. Балуда М.В., Деянов И.И. Венозные тромбозы у больных острым инфарктом миокарда и ишемическим инсультом головного мозга, их факторы риска возникновения и профилактика // *Кардиология*. 1996. (5). 63–68.

4. Баркаган З.С. Учение о тромбофилиях на современном этапе // *Консилиум*. 2000. (6). 61–65.

5. Макацария М.А., Джангидзе М.А., Бицадзе В.О. Гормональная контрацепция и тромбофлебические состояния // *Проблемы репродукции*. 2001. 9. (6). 218–221.

6. Овчаренко С.И., Сон Е.А., Окишева Е.А., Королева И.М. Тромбофилия как причина тромбоза легочных артерий // *Трудный пациент*. 2008. (2–3). http://www.t-pacient.ru/archive/tp2-3-08/tp2-3-08_430.html

7. Савельев В.С. Роль хирурга в профилактике и лечении венозного тромбоза и легочной эмболии // *50 лекций по хирургии*. М.: Медиа Медика, 2003. 92–98.

8. Шмелева В.М. Гипергомоцистеинемия и тромбоз // *Тромбоз, гемостаз, реология*. 2000. (4). 26–29.

9. Шостак Н.А., Кириенко А.И., Бабадаева Н.М. Антифосфолипидный синдром в структуре гематогенной тромбофилии у пациентов молодого и среднего возраста с венозными тромбозами // *Терапевт. арх.* 2005. 77. (5). 47–51.

10. Cattaneo M., Martinelli I., Mannucci P.M. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis // *N. Engl. J. Med.* 1996. 334. 759–762.

11. Gardner J. Factor V Leiden with deep vein thrombosis // *Clin. Lab. Sci.* 2003. (1). 6–9.

12. Labropoulos N. Diagnosis of deep venous thrombosis // *Vascular Surgery Highlights / Ed. A.H. Davies*. Oxford: Health Press Limited, 2004. 45–52.

13. Lu Y., Zhao Y., Liu G. et al. Factor V gene G1691A mutation, prothrombin gene G20210A mutation, and МТНFR gene С677Т mutation are not risk factors for pulmonary thromboembolism in Chinese population // *Thromb. Res.* 2002. (6). 7–12.

14. Price D.T., Ridker P.M. Factor V Leiden mutation and the risk for thromboembolic disease: a clinical perspective // *Ann. Intern. Med.* 1997. 127. 895–903.

THE ROLE OF MOLECULAR-GENETIC FACTORS IN THE RISK OF DEVELOPMENT OF ACUTE THROMBOSIS OF DEEP VEINS OF LOWER EXTREMITIES

**Denis Nikolaevich ROVENSKIKH³, Vladimir Nikolaevich MAKSIMOV^{1,2},
Nina Pavlovna TATARNIKOVA¹, Stanislav Alexandrovich USOV⁴,
Mikhail Ivanovich VOEVODA^{1,2,5}**

¹ *Municipal Budgetary Institution City Clinical Hospital № 1
630075, Novosibirsk, Zalesskogo str., 6*

² *FSBI “Institute of Internal Medicine” SB RAMS
630089, str. Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

³ *FSBI “Institute of Cytology and Genetics” SB RAS
630090, Novosibirsk, Lavrentiev av., 10*

⁴ *Novosibirsk Military Institute n.a.General of the Army I.K. Yakovlev
630114, Novosibirsk, Klyuch Kamyshenskoe plato, 6/2*

Acute thrombosis of deep veins of lower extremities (ATDVLE) is a global medical and social problem, in view of the fact that it is still one of the causes of morbidity and mortality in Russia and industrially developed countries of the world. The key role in the pathogenesis of the development of ATDVLE is associated with phenomenon thrombophilia. The researches of recent years have greatly expanded our understanding of the molecular mechanisms of formation of thrombophilia. The publications on the analysis of «gene-gene interaction» polymorphic genetic variants remain very rare that can influence the development of ATDVLE.

Materials and methods. The first group consisted of 58 patients in the age from 25 till 60 years, the average age of patients with ATDVLE was 49.48 ± 1.26 years (35 men and 43 women). The control group was selected from two population-based samples (MONICA and aHAPIEE) of the residents of two administrative Novosibirsk districts. The study included: a mutation in the gene prothrombin (G20210A, (rs 179996), a mutation in the gene F5 (Leiden, A506G, (rs 6025), polymorphism C677T (rs 1801133) in a gene MTHFR.

Conclusion. Leiden mutation is detected among two members of the core group, prothrombin mutation is not revealed. The significant increase in occurrence of alleles of polymorphism of C677T gene MTHFR associated with disorders of folate cycle being manifested with homocysteinaemia in patients with ATDVLE has been found that can be a feature of the region.

Key words: acute thrombosis of deep veins of lower extremities, thrombophilia, Leiden mutation, prothrombin, homocysteinatmia.

Rovenskiikh D.N. – physician, surgeon-oncologist

Maksimov V.N. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory for molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: medik11@mail.ru

Tatarnikova N.P. – junior researcher of the laboratory for molecular genetic researches and therapeutic diseases

Usov S.A. – doctor of medical sciences, professor

Voevoda M.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, director, e-mail: mvoevoda@ya.ru

УДК 616-055.5/7

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МОНОГЕННЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ОКИНСКОМ РАЙОНЕ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ**Елена Робертовна ЕРЕМИНА^{1,2}, Людмила Павловна НАЗАРЕНКО^{3,4},
Валентина Бухаевна ЦЫРЕНОВА², Лариса Ивановна МИНАЙЧЕВА³,
Ольга Александровна САЛЮКОВА^{3,4}**¹ *ФГБОУ ВПО Бурятский государственный университет
670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а*² *ГБУЗ Республиканский перинатальный центр
670031, г. Улан-Удэ, ул. Солнечная, 4а*³ *ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН
634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10*⁴ *ФГБОУ ВПО Сибирский Государственный медицинский университет
Минздравсоцразвития России
634050, г. Томск, Московский тракт, 2*

В статье представлены данные о разнообразии моногенных наследственных заболеваний у населения Окин-ского района Республики Бурятия. Высокая частота отдельных форм наследственной патологии у бурят в сравнении с ранее исследованными популяциями определяется демографическими характеристиками населения района (небольшая численность, географическая изолированность). Данные о спектре наследственной патологии позволят выявлять больных с моногенными наследственными заболеваниями, проводить их диспансеризацию, расширить проспективное медико-генетическое консультирование.

Ключевые слова: моногенные болезни, буряты, семьи с наследственной патологией.

Распространенность наследственных заболеваний зависит от ряда причин, среди которых наиболее значимыми являются факторы популяционной динамики. Такие генетико-демографические показатели, как половозрастной и национальный состав населения, особенности миграционных процессов, характер брачных отношений и уровень рождаемости, наряду с историей формирования популяции определяют структуру генофонда и, соответственно, спектр и частоту патологических вариантов генов, которые обуславливают формирование наследственных заболеваний. В связи с этим описание

популяционной структуры является важным направлением генетико-эпидемиологических исследований наследственных заболеваний различных этнотерриториальных групп населения. К настоящему времени в Республике Бурятия наиболее полно охарактеризована генетико-демографическая структура городского населения [3–5]. Исследования, посвященные оценке значимости факторов популяционной динамики в формировании генетического разнообразия и, соответственно, механизмов формирования груза наследственной патологии в сельских популяциях республики, немногочисленны, хотя на

Еремина Е.Р. – к.м.н., доцент кафедры терапии, e-mail: ereelrob@rambler.ru

Назаренко Л.П. – д.м.н., руководитель лаборатории наследственной патологии, e-mail: ludmila.nazarenko@medgenetics.ru

Цыренова В.Б. – врач-генетик медико-генетической консультации, e-mail: neoscr@mail.ru

Минайчева Л.И. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории наследственной патологии, e-mail: larisa.minaycheva@medgenetics.ru

Салюкова О.А. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории наследственной патологии, доцент кафедры медицинской генетики, e-mail: olga.salukova@medgenetics.ru

долю сельского населения в Бурятии приходится 41 % населения [13]. В то же время как данные официальной статистики [12], так и результаты изучения особенностей брачной структуры, в том числе этнического состава [2], убедительно свидетельствуют о выраженной этнической гетерогенности некоторых сельских территорий Республики Бурятия. В условиях небольшой численности ряда сельских населенных пунктов региона, их изолированности на протяжении большого числа поколений, при высоком уровне рождаемости, характерном для ряда сельских популяций [13], в генофонде популяций могут накапливаться патологические мутации. Такая ситуация может способствовать накоплению в сельских районах доминантных и рецессивных форм менделевской патологии.

Согласно предварительным результатам медико-генетического исследования сельских районов Республики Бурятия (Кяхтинского, Еравнинского, Кижингинского, Окинского, Джидинского), показано наличие некоторых особенностей распространения менделирующей наследственной патологии у коренного населения, в том числе с X-сцепленным рецессивным типом наследования [9]. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение распространности и спектра наследственной патологии в Окинском районе республики.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Окинский район Республики Бурятия располагается на Центральном плоскогорье Восточных Саян на высоте 1600–2100 метров над уровнем моря. Район граничит на севере с Иркутской областью, на западе – с Республикой Тува, на юге – с Монголией, на юго-востоке примыкает к Тункинскому району Бурятии. Административный центр Окинского района (село Орлик) расположен на расстоянии 770 км от города Улан-Удэ, связь между столицей республики и районным центром осуществляется автомобильным транспортом.

Численность населения района в период исследования составила 4591 человек [12]. На долю коренного населения (сойоты и буряты) приходится более 90 % жителей района. Поскольку сойты в 2000 году включены в перечень коренных народов России [14], и до этого времени официальная статистика не выделяла их как отдельную национальность, в настоящем исследовании сойот и бурят рассматривали как единую этническую группу, названную бурятами.

Экспедиционное исследование Окинского района проведено в 2004 году. При обследо-

вании населения использовали «обзорный» метод регистрации семей и больных с менделирующей патологией, который предусматривает учет широкого круга наследственных заболеваний в популяциях [1, 17]. Информация о больных и семьях дополнялась и уточнялась сведениями, собранными в архиве медицинских учреждений, а также с помощью врачей различных специальностей при госпитализации их в республиканские учреждения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице представлен нозологический спектр выявленной наследственной патологии. В Окинском районе зарегистрировано 17 семей, в которых было 29 больных с диагностированными наследственными болезнями. Все семьи – бурятской национальности. Наследственные заболевания у представителей других национальностей в нашем исследовании не встретились. Аутосомно-доминантные заболевания диагностированы в 8 семьях (14 больных), аутосомно-рецессивные – в 2 семьях (2 больных), рецессивные, сцепленные с X-хромосомой, – в 7 семьях (13 больных).

Частоты наследственных болезней с аутосомными типами наследования варьировали от 1:895 (несовершенный остеогенез) до 1:4476 (нижнечелюстно-лицевой дизостоз, врожденная миотония Томсена) в расчете на коренное население обоих полов, с X-сцепленным рецессивным типом наследования – от 1:325 (ихтиоз) до 1:370 (X-сцепленная умственная отсталость) (расчет проведен на численность лиц мужского пола). Спектр аутосомно-доминантных заболеваний по наиболее вовлеченным в патологический процесс органам и системам представлен следующими нозологическими формами: патология скелета и соединительной ткани (ахондроплазия, несовершенный остеогенез), наследственные синдромы (нижнечелюстно-лицевой дизостоз), дерматологическая патология (пахионихия), неврологическая патология (врожденная миотония Томсена). Из аутосомно-рецессивных заболеваний при обследовании населения Окинского района диагностирована катаракта (см. таблицу). Перечисленные формы моногенных болезней, за исключением врожденной миотонии Томсена, описаны также при проведении генетико-эпидемиологических исследований в сибирских популяциях – у пришлого русского населения Томской области [16], тувинцев [17]. Все выявленные в Окинском районе Бурятии болезни с менделевскими типами наследования

Нозологический спектр наследственных заболеваний, выявленных в Окинском районе Республики Бурятия

ОМIM	Диагноз	Количество		Частота больных *
		семей	больных	
Аутосомно-доминантный тип наследования				
184200	Ладонно-подошвенная кератодермия	1	2	1:2238
100800	Ахондроплазия	1	2	1:2238
154500	Нижнечелюстно-лицевой дизостоз (Франческетти)	1	1	1:4476
160800	Врожденная миотония Томсена	1	1	1:4476
166200	Несовершенный остеогенез	2	5	1:895
167200	Врожденная пахионихия	2	3	1:1492
Аутосомно-рецессивный тип наследования				
212500	Врожденная катаракта	2	2	1:2238
Х-сцепленный тип наследственных заболеваний				
308100	Ихтиоз	5	7	1:325
300624	Х-сцепленная умственная отсталость	2	6	1:370
	Всего:	17	29	

Примечание. ОМIM – номер менделирующей нозологической формы по каталогу V. McKusick; * – частота определена в расчете на численность коренного населения Окинского района, для Х-сцепленной патологии – исходя из численности лиц мужского пола.

зарегистрированы в сельских популяциях якутов [11].

Из представленного спектра наследственной патологии наибольшее количество семей диагностировано с Х-сцепленным рецессивно-наследуемым ихтиозом, причем 4 из 7 больных с данной патологией в Окинском районе объединяются в одну родословную из 4 поколений (см. рисунок), хотя проживают в разных селах района. Во всех случаях доказательством именно этого типа наследования заболевания является наличие больных мужчин, родственников проба́нда по материнской линии. Частота Х-сцепленного ихтиоза варьирует от 1:2000 до 1:6000 в расчете на мужское население независимо от этнической принадлежности больных [21]. Согласно данным генетико-эпидемиологических исследований, проведенных в 10 регионах на

территории европейской части России (6 этнических групп – русские из пяти регионов, башкиры, удмурты, марийцы, чуваша, адыгейцы), средняя частота Х-сцепленного ихтиоза составляет 1:14898 среди лиц мужского пола [6]. При генетико-эпидемиологическом обследовании населения коренных сибирских регионов – Якутии и Тувы, отмечено, что рецессивный Х-сцепленный ихтиоз, так же как и в нашем исследовании, имел наибольшую частоту встречаемости в группе менделирующих заболеваний с данным типом наследования [11, 17].

В нашем исследовании все больные из представленной родословной с рецессивным Х-сцепленным ихтиозом имели одинаковую клиническую картину. С первых дней жизни ребенка появляется диффузное поражение передней поверхности туловища в виде участков гиперкератоза. Затем участки гиперкератоза распространяются на лицо, шею, крупные складки и голени. Во время осмотра массивные плотные чешуйки темного цвета черепицеобразно накладываются на кожу, на волосистой части головы – очаговое облысение с рубцовой атрофией и дистрофией волос; ладони и подошвы не поражены. Течение заболевания упорное, без сезонных ремиссий с нарастанием тяжести после пубертатного периода. Лечение болезни – симптоматическое [18, 20]. Ген Х-сцепленного ихтиоза локализован в

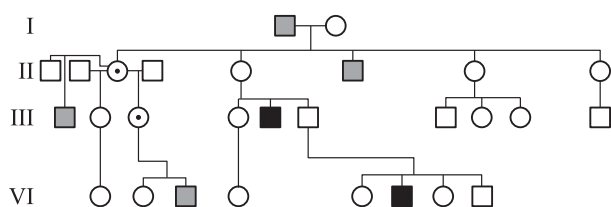


Рис. Родословная семьи, отягощенной Х-сцепленным ихтиозом (серое окрашивание) и ладонно-подошвенной кератодермией (черное окрашивание)

Хр22.32 и является геном стероидной сульфатазы, наследственная недостаточность которой является причиной развития заболевания. Для этого заболевания возможна пренатальная диагностика [19, 22].

В родословной с рецессивным X-сцепленным ихтиозом (см. рисунок) у двух детей мужского пола не выявлено клинических проявлений ихтиоза, однако имеются клинические признаки ладонно-подошвенной кератодермии, имеющей аутосомно-доминантный тип наследования, что позволяет говорить о наличии в одной семье разных нозологических форм генодерматоза; для идентификации данного состояния необходимо проведение молекулярно-генетического исследования.

В настоящем исследовании у бурят не было зарегистрировано больных с нейродегенеративной патологией, тогда как при изучении наследственных заболеваний этой группы С.Н. Иллариошкин и соавт. [8] описал бурятскую семью из пяти поколений с наследственной формой атаксии – X-сцепленной врожденной гипоплазией мозжечка. Авторы не указывают район Бурятии, в котором проводилось исследование данной формы наследственной патологии. Заболевание имеет рецессивный тип наследования и характеризуется непрогрессирующим течением и стереотипной клинической картиной (атаксия, наружная офтальмоплегия, недоразвитие коры мозжечка, пирамидный синдром). Анализ мультилокусного сцепления позволил определить локализацию мутантного гена в хромосомной области Хр 11.21-q24 (генетическое расстояние 30 сМ). Описанная форма X-сцепленной врожденной гипоплазии мозжечка занесена в каталог V. McKusick (OMIM 33025500) [8].

Анализ распространенности наследственных болезней в 10 регионах России (6 этнических групп – русские из пяти регионов, башкиры, удмурты, марийцы, чувашы, адыгейцы) показал некоторые особенности. Так, у русских реже, по сравнению с перечисленными этносами, диагностировались следующие аутосомно-доминантные болезни: ладонно-подошвенный гиперкератоз, ихтиоз, олигофрения. Между популяциями также были отмечены различия по частоте аутосомно-рецессивной фенилкетонурии и аутосомно-доминантной тапеторетинальной абнотрофии, которые чаще встретились у русского населения, чем у представителей других этнических групп [6]. Высокая частота аутосомно-рецессивного гипотрихоза описана у марийцев и чувашей [7].

Этнические особенности спектра наследственной патологии описаны при генетико-эпи-

демиологических исследованиях коренного населения Сибири. Так, у якутов к этноспецифичным наследственным заболеваниям отнесены спиноцеребеллярная атаксия I типа, окулофарингеальная мышечная дистрофия, миотоническая дистрофия, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия, синдром 3-М [15]. Среди алтайцев выявлено накопление синдрома микропии с атрезией наружных слуховых проходов с аутосомно-рецессивным типом наследования и глухоты с преаурикулярными ямками [10].

Результаты настоящего клинико-эпидемиологического исследования моногенных наследственных болезней в Окинском районе Бурятии показывают, что их распространенность у бурят имеет некоторую специфичность, обусловленную рядом демографических характеристик популяции – небольшой численностью и географической изолированностью населения. Полученные данные необходимы для планирования и организации специализированной помощи населению района, диспансеризации больных с моногенными наследственными заболеваниями, будут способствовать расширению проспективного медико-генетического консультирования с использованием возможностей пренатальной диагностики. Информация о разнообразии моногенных наследственных заболеваний и особенностях их распространения у населения Окинского района Республики Бурятия будет использована в работе региональной медико-генетической консультации для создания регистра наследственной патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гинтер Е.К., Голубцов В.Н., Петрин А.Н. и др. Медико-генетическое описание населения Адыгеи. Майкоп, 1997. 225 с.
2. Еремина Е.Р., Кучер А.Н. Динамика структуры браков в сельских популяциях Республики Бурятия: национальный состав // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2010. (3). 383–387.
3. Еремина Е.Р., Кучер А.Н. Медико-генетические аспекты формирования здоровья населения города Улан-Удэ (анализ брачных миграций) // Бюл. СО РАМН. 2009. (6). 93–99.
4. Еремина Е.Р., Кучер А.Н. Популяционно-демографическая структура г. Улан-Удэ: национальный состав, возраст вступления в брак // Генетика. 2010. 46. (2). 249–254.
5. Еремина Е.Р., Кучер А.Н. Этническая ассортативность браков в городе Улан-Удэ // Бюл. СО РАМН. 2010. 30. (6). 110–117.
6. Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Особенности медико-генетического консультирования в раз-

личных популяциях и этнических группах // Мед. генетика. 2008. (19). 20–29.

7. Зинченко Р.А., Суворова К.Н., Аbruкова А.В. и др. Эпидемиологические и клинико-генетические исследования наследственного изолированного гипотрихоза // Вестн. дерматол. венерол. 2008. (1). 43–50.

8. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. и др. Молекулярно-генетический анализ нейродегенеративных заболеваний // Генетика. 2004. 40. (6). 816–826.

9. Минайчева Л.И., Назаренко Л.П., Еремина Е.Р. и др. Медико-генетическое изучение населения в сельских районах Республики Бурятия // Бюл. сиб. медицины. 2009. (4 (2)). 77–79.

10. Назаренко Л.П. Эпидемиология наследственных болезней и особенности медико-генетического консультирования // Мед. генетика. 2004. 3. (3). 133–138.

11. Назаренко Л.П., Ноговицына А.Н., Салюкова О.А. и др. Распространенность моногенных наследственных болезней среди сельского населения Республики Саха (Якутия) // Медико-генетическое исследование населения Республики Саха (Якутия). Якутск, 2002. 92–114.

12. Национальный состав постоянного населения Республики Бурятия. Итоги Всероссийской переписи населения 2002 года. Часть 1. Улан-Удэ, 2004. 36 с.

13. Об итогах Всероссийской переписи населения 2010 года: Доклад / Ред. Л.А. Мунаев. Улан-Удэ: Бурятстат, 2012. 20 с.

14. Павлинская Л.Р. Кочевники голубых гор. СПб.: Европейский дом, 2002. 261 с.

15. Пузырев В.П., Максимова Н.Р. Наследственные болезни у якутов // Генетика. 2008. 44. (10). 1317–1324.

16. Пузырев В.П., Назаренко Л.П. Генетико-эпидемиологическое исследование наследственной патологии в Западной Сибири. Томск: STT, 2000. 192 с.

17. Пузырев В.П., Эрдыниева Л.С., Кучер А.Н., Назаренко Л.П. Генетико-эпидемиологическое исследование населения Тувы. Томск: STT, 1999. 256 с.

18. Freiberg R.A., Choate K.A., Deng H. et al. A model of corrective gene transfer in X-linked ichthyosis // Hum. Mol. Genet. 1997. 6. 927–933.

19. Jobsis A.C., van Duuren C.Y., de Vries G.P. et al. Trophoblast sulphatase deficiency associated with X-chromosomal ichthyosis // Ned. T. Geneesk. 1980. 120. 19–26.

20. Kent L., Emerton J., Bhadravathi V. et al. X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency) is associated with increased risk of attention deficit hyperactivity disorder, autism and social communication deficits // J. Med. Genet. 2008. 45. 519–524.

21. Shapiro L.J., Weiss R., Webster D., France J.T. X-linked ichthyosis due to steroid sulphatase deficiency // Lancet. 1978. I. 70–72.

22. Valdes-Flores M., Kofman-Alfaro S.H., Jimenez-Vaca A.L., Cuevas-Covarrubias S.A. Carrier identification by FISH analysis in isolated cases of X-linked ichthyosis // Am. J. Med. Genet. 2001. 102. 146–148.

CLINICAL EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF MONOGENIC HEREDITARY ILLNESSES IN OKINSKY AREA OF THE BURYAT REPUBLIC

**Elena Robertovna EREMINA^{1,2}, Lyudmila Pavlovna Nazarenko^{3,4},
Valentina Bukhaevna Tsyrenova², Larisa Ivanovna Minaycheva³,
Olga Aleksandrovna Salyukova^{3,4}**

¹ *Buryat State University
670000, Ulan-Ude, Smolin str., 24a*

² *Republican Perinatal Centre
670031, Ulan-Ude, Solnechnaya str., 4a*

³ *Institute for Medical Genetics SB RAMS
634050, Tomsk, Ushayka Embankment, 10*

⁴ *Siberian State Medical University
634050, Tomsk, Moskovsky route, 2*

Data on a variety of monogenic hereditary diseases at the population of Okinsky area of the Buryat Republic are presented in the article. The high frequency of separate forms of a hereditary pathology at the Buryats in comparison with earlier investigated populations is defined by demographic characteristics of the population of area (small number, geographical isolation). Data on the spectrum of the hereditary pathology let reveal the patients with monogenic hereditary diseases, carry out their prophylactic medical examination, and expand prospective medico-genetic consultation.

Key words: monogenic illnesses, Buryats, families with a hereditary pathology.

Eremina E.R. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for therapy,
e-mail: ereelrob@rambler.ru

Nazarenko L.P. – doctor of medical sciences, the head of the laboratories of a hereditary pathology,
e-mail: ludmila.nazarenko@medgenetics.ru

Tsyrenova V.B. – physician geneticist of medical-genetic consultation, e-mail.ru: neoscr@mail.ru

Minaycheva L.I. – candidate of medical sciences, researcher the laboratories of a hereditary pathology,
e-mail: larisa.minaycheva@medgenetics.ru

Salyukova O.A. – candidate of medical sciences, senior researcher the laboratories of a hereditary pathology, assistant professor of the chair for medical genetics e-mail: olga.salukova@medgenetics.ru