

УДК 616.12-008.331.1:616-092.9

СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ НЕФРОГЕННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У КРЫС

**Инесса Валерьевна ДЮЙЗЕН^{1,2}, Екатерина Валерьевна ЕЛИСЕЕВА¹,
Елена Филипповна РОМАНЧЕНКО¹, Ольга Владимировна ТИЩЕНКО¹,
Анна Владимировна ТЫРТЫШНИКОВА¹, Нина Евгеньевна ЛАМАШ²,
Павел Александрович МОТАВКИН¹**

*¹ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет
Минздрава России
690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2*

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

Разработана модель нефрогенной артериальной гипертензии у крыс, характеризующаяся формированием комплекса функциональных, морфологических и биохимических изменений в органах сердечно-сосудистой системы, свойственных некоторым вариантам гипертонической болезни у человека. Данная модель может быть использована при изучении механизмов формирования и развития ренопаренхиматозной артериальной гипертензии и для тестирования фармакологических препаратов с антигипертензивным эффектом.

Ключевые слова: нефрогенная артериальная гипертензия, модель, крысы.

Для изучения патофизиологии артериальной гипертензии (АГ) в настоящее время используются различные экспериментальные модели. В эксперименте на животных стойкого повышения артериального давления можно добиться, влияя на различные звенья нейрогуморальной и эндотелийзависимой систем регуляции сосудистого тонуса. При моделировании гипертензивного синдрома используют введение препаратов, влияющих на нервные, эндотелийзависимые и гуморальные механизмы регуляции кровотока – повреждение вазомоторных центров головного мозга [2], индуцированная ингибиторами NO-синтазы гипертензия [14], альдостерон-индуцированная гипертензия [15], формируют дислипидемические состояния с последующим развитием атеросклероза и нарастанием артериального давления [10], увеличивают гемодинамическую

нагрузку на сердце путем уменьшения просвета магистральных сосудов [16], а также используют генетически модифицированных животных, предрасположенных к развитию гипертензивного синдрома [17]. Отдельную группу моделей для формирования артериальной гипертензии включают методы, связанные с вмешательством в функционирование и кровоснабжение почек. Нарушение адекватных взаимодействий между прессорными (ренин-ангиотензин-альдостерон) и депрессорными (простагландины, калликреины и кинины) ренальными механизмами регуляции артериального давления (АД) создает предпосылки к изменению его уровня и к развитию артериальной гипертензии [4, 6, 12]. При этом большинство моделей ориентированы на редуцирование почечного кровотока и, таким образом, воссоздают патологическую эксперименталь-

Дюйзен И.В. – д.м.н., проф., старший научный сотрудник лаборатории фармакологии, e-mail: duval@mail.ru

Елисеева Е.В. – д.м.н., проф. кафедры общей и клинической фармакологии, e-mail: yeliseeff@rbcmail.ru

*Романченко Е.Ф. – ассистент кафедры общей и клинической фармакологии,
e-mail: e_f_romanich2005@mail.ru*

Тищенко О.В. – к.м.н., медицинский представитель

*Тыртышникова А.В. – к.м.н., ассистент кафедры общей и клинической фармакологии,
e-mail: annafarm2000@mail.ru*

Ламаш Н.Е. – д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории фармакологии, e-mail: nina@meteodvgu.ru

Мотавкин П.А. – д.м.н., проф., советник при ректорате

ную ситуацию, сходную с клиническим вариантом вазоренальной АГ. При этом многие аспекты ренопаренхиматозного типа АГ в настоящее время не имеют адекватных моделей для своего экспериментального изучения. Кроме того, большинство моделей АГ отличаются сравнительно мягким течением, при которых нарастание АД носит нестойкий характер и зачастую не приводит к морфологическим перестройкам в органах-мишенях [13].

Целью настоящего исследования явилась разработка способа моделирования ренопаренхиматозной артериальной гипертензии, при которой динамическое повышение АД сопровождается формированием стойких морфофункциональных изменений в органах-мишенях. Предварительные данные по использованию данной экспериментальной модели при проведении морфологических и фармакологических исследований были опубликованы в работах [1, 9].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 90 здоровых половозрелых нелинейных крысах-самцах массой 250–280 г. Содержание животных, кормление и все эксперименты выполнены в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» (06.04.1993 г.), приказом МЗ РФ № 163 от 10.03.1996 г., приложением 4 к приказу № 755 МЗ СССР (12.03.1977 г.).

Химическое повреждение паренхимы почек достигалось путем введения 0,1 мл 4 % параформальдегида в верхний полюс обеих почек. Операцию проводили под легким эфирным наркозом. Объем вводимого раствора точно дозировали, используя шприцы Гамильтона. Иглу погружали на глубину 0,7 см, вводя ее по нижнему краю реберной дуги, другой рукой придерживая хорошо пальпируемую и подвижную почку со стороны живота. Верификацию места инъекции проводили после эвтаназии животных макро- и микроскопически. Животных декапировали под эфирным наркозом. Определяли массу тела животного, массу сердца, вычисляли сердечный индекс.

Для подтверждения развития патоморфологических и биохимических изменений исследовали кровь, почки, сосуды, сердце. Биологический материал (сердце, аорту и почки) фиксировали в 4 % растворе параформальдегида, обрабатывали по общепринятым методикам с последующей заливкой в парафин. Гистологические срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, метиленовым синим

и азаном по Гейденгайну. Выявление индуцибельной NO-синтазы в клетках интимы сосудов осуществляли иммуногистохимически с использованием поликлональных кроличьих антител (Abcam, ab15323, 1:100).

Функциональную подвижность церебральных артерий при воздействии фармакологических стимулов оценивали с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ). Величину вазомоторной реакции рассчитывали по формулам, приведенным в работах [3, 8], с вычислением следующих параметров: эндотелийзависимая вазодилатация (ЭЗВД) на введение ацетилхолина, эндотелийнезависимая вазодилатация (ЭНЗВД) на введение нитроглицерина, эндотелийзависимая вазоконстрикция (ЭЗВК) на введение N-монометил-L-аргинина (L-NMMA), эндотелийнезависимая вазоконстрикция (ЭНЗВК) на введение норадреналина. За нормальную ЭЗВД принимали прирост диаметра артерии на 10 % и более от исходного, за нормальную ЭНЗВД – на 15 % и более. Меньшая степень вазомоторного ответа или парадоксальный ответ считается патологической реакцией [5]. МРТ головного мозга проводили на томографе «PharmaScan US 70/16» (Bruker, Германия) с напряженностью магнитного поля 7,0 Тесла, частотой 300 МГц и катушкой типа BGA 09P.

Содержание ренина и альдостерона в плазме определяли радиоиммунным методом (набор реактивов «Radioimmunoassay kit», Cis, Франция) на автоматическом гамма-счетчике «Wizard» (Финляндия), содержание основных метаболитов NO (нитрат- и нитрит-ионов) – спектрофотометрически с помощью реактива Грисса.

Мониторинг артериального давления осуществляли 1 раз в неделю неинвазивным методом в аппарате PanLab-LE501 (Испания). Для определения концентрации формалина в почке использовали метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Милихром А/02. Обработку результатов проводили с помощью программы Мультиспектр для Windows. Для фотографирования препаратов использовали компьютерную видеосистему, смонтированную на микроскопе Jenaval (Karl-Zeiss, Германия) и оснащенную программой обработки данных AxioVision Rel.4.8 Software. Цифровую обработку изображения проводили также с помощью программ Adobe Photoshop 7.0 и ImageJ.

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 оцени-

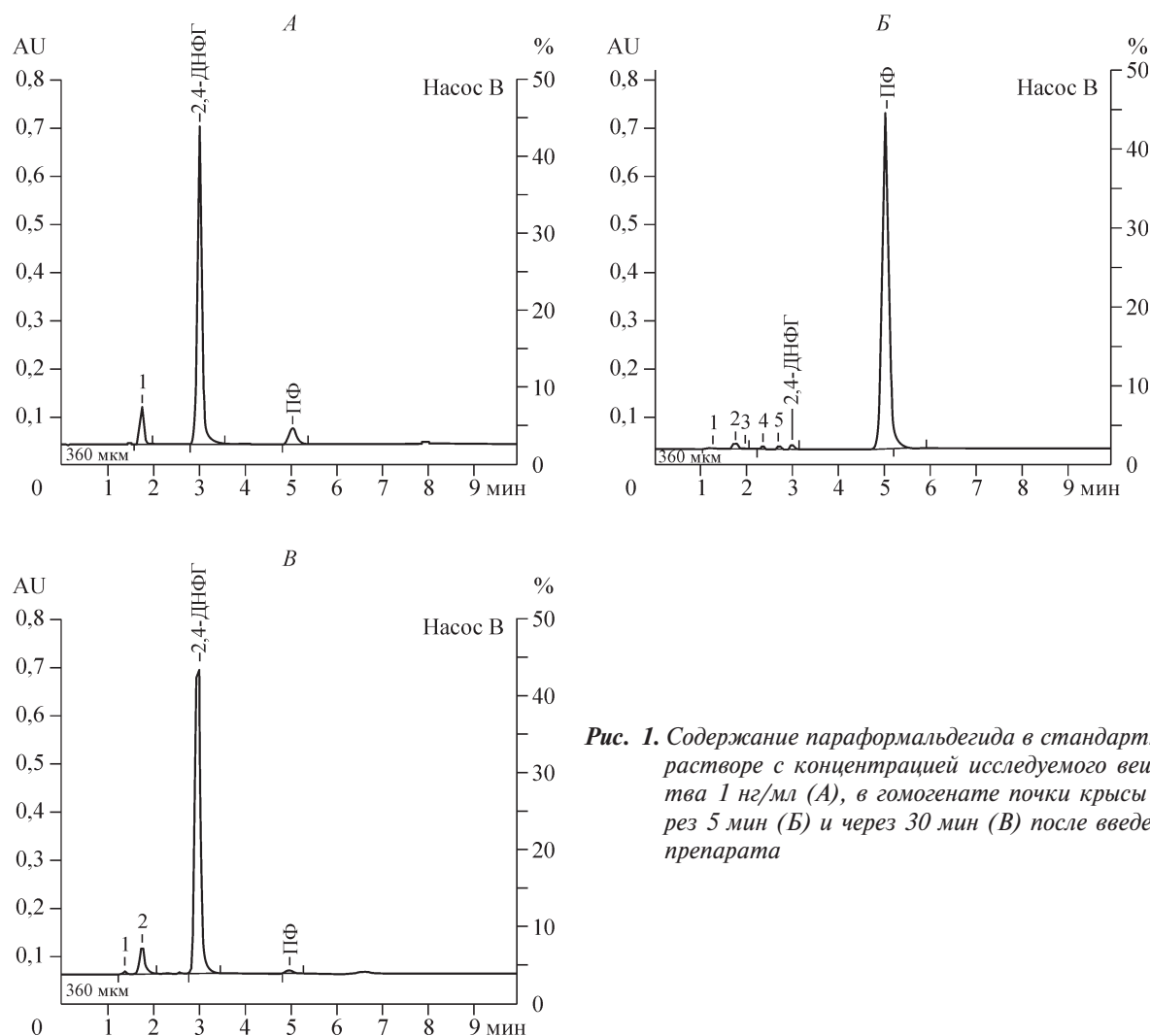


Рис. 1. Содержание параформальдегида в стандартном растворе с концентрацией исследуемого вещества 1 нг/мл (А), в гомогенате почки крысы через 5 мин (Б) и через 30 мин (В) после введения препарата

вали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика биохимических сдвигов, индуцированных введением параформальдегида. Для исключения предположения о том, что в развитии морфологических и биохимических изменений в исследуемых органах ведущим фактором являются системные токсические эффекты вводимого параформальдегида, мы анализировали содержание данного вещества в паренхиме почек через 5, 30 мин (рис. 1) и через 1 сут после инъекции. Через 5 мин после введения параформальдегида отмечается резкое возрастание его содержания в ткани почки (см. рис. 1, Б), которое спустя 30 мин после инъекции вследствие связывания вещества с белками тканей снижается до уровня, сопоставимого с концентрацией эндогенного параформальдегида. Данное состояние регистрируется в ткани почки и через 24 ч. Можно предполагать поэтому, что

использование внутривенной инъекции параформальдегида для моделирования артериальной гипертензии сопровождается исключительно локальным повреждением паренхимы почек, не вызывая системного токсического эффекта.

Динамика морфологических изменений в паренхиме почек. Через сутки после инъекции формалина в почке нарушается микроциркуляция. Капилляры расширены и переполнены эритроцитами. В течение 1–2 недель после травмы область повреждения в почках имела более темную окраску и четкие границы с интактной зоной. В этот период зона повреждения характеризовалась наличием обширных очагов кровоизлияния, многочисленных воспалительных инфильтратов и участков некроза всех слоев почечной паренхимы. В областях, прилегающих к зонам некроза, заметна пролиферация соединительной ткани. Ее созревание на 3–4 неделе эксперимента приводило к образованию рубцовых изменений в корковом и мозговом веществе, перемежающихся с мелкими островками относительно сохранной почечной паренхи-

Таблица 1

Динамика морфологических и биохимических изменений, сопутствующих развитию экспериментальной артериальной гипертензии ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	АГ			
		1 неделя	2 недели	4 недели	6 недель
Систолическое АД, мм рт. ст.	120 ± 3,7	156 ± 2,7	167 ± 4,3	174 ± 5,1*	195 ± 2,5*
Диастолическое АД, мм рт. ст.	79 ± 5,3	82 ± 9,7	95 ± 4,2	101 ± 4,6	118 ± 4,2*
Средняя мозговая артерия: толщина средней оболочки, мм	18,23 ± 0,67	13,71 ± 0,52	16,02 ± 1,70	24,87 ± 2,80*	25,82 ± 0,08*
индекс толщина/диаметр	0,096 ± 0,003	0,056 ± 0,003*	0,071 ± 0,010	0,075 ± 0,010	0,072 ± 0,003
Базиллярная артерия: толщина средней оболочки	27,88 ± 1,21	23,22 ± 0,90	25,90 ± 0,60	28,84 ± 0,60	26,53 ± 0,30
индекс толщина/диаметр	0,138 ± 0,010	0,080 ± 0,010	0,061 ± 0,005*	0,075 ± 0,003*	0,067 ± 0,003*
Масса сердца, г	0,635 ± 0,024	0,663 ± 0,022	0,678 ± 0,030	0,717 ± 0,021*	0,773 ± 0,025**
Сердечный индекс	0,0039 ± 0,0001	0,0040 ± 0,0002	0,0041 ± 0,0002	0,0044 ± 0,0001*	0,0046 ± 0,0001*
Диаметр кардиомиоцитов, мкм	16,4 ± 1,4	17,0 ± 0,7	18,6 ± 0,9	21,6 ± 0,9*	23,4 ± 1,3**
Содержание ренина, нг/мл	2,14 ± 0,34	8,73 ± 1,02*	–	8,46 ± 1,04**	–
Содержание альдостерона, пг/мл	103,5 ± 9,4	296,03 ± 23,91*	–	297,37 ± 17,75*	–
Содержание нитратов и нитритов, мкмоль/л	11,7 ± 5,8	–	–	–	21,9 ± 3,3**

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

мы. На поздних сроках (6-я неделя наблюдения) поврежденный участок выглядел сморщенным и меньшим в сравнении с интактной зоной. Микроскопически в этот период доминирующими признаками патологии были обширные очаги фиброза, характеризующиеся разрастанием соединительной ткани в мезангии клубочков, капсуле почечных телец, средней оболочке артерий и интерстициальной ткани коркового и мозгового вещества. В заднем полюсе почки умеренные склеротические изменения сочетались с наличием структурно сохраненных участков коркового и мозгового вещества.

Динамика показателей артериального давления. Из последующего наблюдения исключались животные (5%), величина АД которых через 2 недели не отличалась от контрольных значений. Морфологический анализ их почек не демонстрировал видимых изменений, что может быть объяснено погрешностями в выполнении процедуры введения параформальдегида.

У большинства экспериментальных животных (95%) формирование гипертензивного синдрома происходило постепенно в течение двух месяцев наблюдения. Систолическое и диасто-

лическое АД через 4 и 6 недель после операции соответственно статистически значимо превышало величину соответствующего показателя крыс контрольной группы и сохранялось увеличенным до конца эксперимента.

Динамика морфологических и биохимических изменений в сердце и сосудах. Развитие артериальной гипертензии сопровождается гипертрофией сердца, о чем свидетельствует достоверное увеличение его массы на 11% уже на 3-й неделе эксперимента; наибольшую абсолютную массу сердце имело в конце эксперимента (табл. 1). Колебания сердечного индекса (СИ, отношение массы сердца к массе тела, мг/г), как более точного показателя развития гипертрофии миокарда сердца, также демонстрировали стойкую тенденцию к нарастанию пропорционально увеличению массы сердца и увеличению диаметра кардиомиоцитов (см. табл. 1). В гипертрофированном миокарде экспериментальных животных к концу 6-й недели диаметр кардиомиоцитов левого желудочка увеличился на 71% по сравнению с показателем нормотензивных крыс.

Развитие гипертензивного синдрома сопровождалось утолщением стенки грудной аорты.

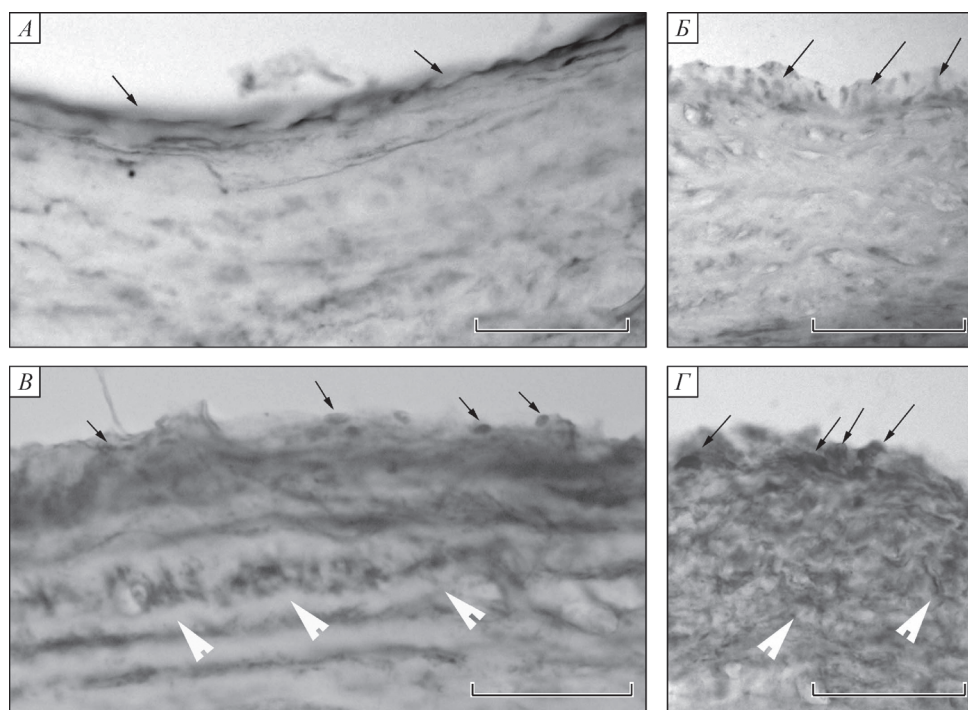


Рис. 2. Локализация индуцибельной NO-синтазы в эндотелиальных клетках аорты (А, В) и эндокарда (Б, Г) в норме (А, Б) и через 6 недель формирования ренопаренхиматозной гипертензии (В, Г). Длинными стрелками указаны эндотелиоциты, короткими – субэндотелиальные соединительнотканнные структуры. Масштаб 50 мкм

Волокна внутренней эластической мембраны имели признаки гиперплазии, они были утолщены и расщеплены, что является характерным для синдрома АГ [6, 7].

На фоне нарастающего артериального давления в сосудах головного мозга также наблюдались признаки морфологической перестройки – изменялись толщина средней оболочки, периметр внутренней поверхности и их соотношение, характеризующее морфологический тип ремоделирования сосуда. В средней мозговой артерии заметное утолщение меди начал регистрироваться к 4-й неделе эксперимента и сопровождалось снижением коэффициента толщина/диаметр (см. табл. 1). В базилярной артерии уменьшение данного коэффициента происходило за счет увеличения просвета сосуда, при этом в течение всего периода наблюдения заметного изменения толщины стенки артерии не зафиксировано. На 6-й неделе эксперимента эндотелиоциты и фибробласты аорты, эндокарда и мозговых сосудов экспрессировали высокий уровень индуцибельной NO-синтазы (рис. 2).

Изменение биохимической активности вазопрессорных систем. Экспрессия индуцибельной NO-синтазы в сосудах мышечного и эластического типа и прогрессирующее нарастание

артериального давления сопровождалось нарастанием содержания основных метаболитов NO в сыворотке крови – к 6-й неделе эксперимента концентрация нитратов и нитритов увеличивалась почти в 2 раза относительно контрольной группы (см. табл. 1).

Результаты исследования содержания вазопрессорных гормонов в плазме крови свидетельствуют об активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, проходящей параллельно с нарастанием АД (см. табл. 1). В конце первой недели у крыс исследуемой группы отмечена выраженная гиперренинемия: содержание ренина было в 4 раза больше, чем в контроле. Высокая величина показателя регистрировалась до конца наблюдения. Одновременно у всех животных происходило нарастание содержания альдостерона в крови, которое в 3 раза превышало значения контрольных животных.

Изменение функциональной активности сосудов головного мозга. Сосуды головного мозга при введении экспериментальных веществ демонстрировали патологический характер вазомоторного ответа – недостаточную вазодилатацию в ответ на введение ацетилхолина, патологическую вазоконстрикцию на введение нитроглицерина, недостаточную вазоконстрикцию на введение норадреналина и L-NMMA (табл. 2).

Таблица 2

Результаты исследования вазомоторной функции церебральных артерий ($M \pm m$)

Показатель, %	Контроль	АГ
ЭЗВД	11,89 ± 0,98	1,92 ± 0,02**
ЭНЗВД	17,84 ± 1,25	22,11 ± 1,02*
ЭЗВК	6,31 ± 0,14	8,10 ± 0,34**
ЭНЗВК	4,83 ± 0,12	8,50 ± 1,01*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами разработана модель, при которой повышение артериального давления сопровождается рядом функциональных, биохимических и морфологических изменений в органах сердечно-сосудистой системы, свойственных ренопаренхиматозному типу гипертонической болезни у человека [2, 4]. При данном типе патологии нарастание АД протекает на фоне повышенного содержания метаболитов NO в плазме крови, источником которого, очевидно, является индуцибельная NO-синтаза. Экспрессия этого фермента определяет парадоксальный тип реагирования сосудов мышечного типа на введение вазоактивных препаратов и, по-видимому, участвует в их патологическом ремоделировании. Дополнительным преимуществом данной модели мы считаем простоту выполнения – повреждение паренхимы почек не требует тяжелой полостной операции, как это предусматривается при удалении почки или перевязке аорты и почечных артерий. Кроме того, постепенное нарастание АД в эксперименте сопровождается ремоделированием органов-мишеней и характерными для ренопаренхиматозного типа АГ биохимическими изменениями прессорной системы – изменениями стенки аорты (гиперплазией и расслоением ее эластических мембран), активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, развитием гипертрофии миокарда. Структурные изменения сосудов мышечного типа (средняя мозговая артерия) происходят при данном варианте экспериментального гипертензивного синдрома по гипертрофическому типу ремоделирования мышечной оболочки. Поэтому можно считать, что разрабатываемая модель может быть использована экспериментаторами при исследовании механизмов реализации ренопаренхиматозной артериальной гипертензии и для тестирования фармакологических препаратов с антигипертензивным эффектом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН), к.б.н. Ирине Григорьевне Агафоновой за помощь в проведении функционально-томографических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта с Минобрнауки (№ 14.740.11.0186) и грантов ДВО РАН (№ 12-III-A-06-090 и 12-I-П7-02).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елисеева Е.В., Дюйзен И.В., Тыртышников А.В., Романченко Е.Ф. Изменение NO-ергической активности нейронов мозгового вещества надпочечников при экспериментальной гипертензии и ее фармакологической коррекции // Бюл. СО РАМН. 2010. 30. (5). 52–57.
2. Задюченко В.С., Адашева Т.В. Дисфункция эндотелия и артериальная гипертензия: терапевтические возможности // Рус. мед. журн. 2002. 22. (11). 13–25.
3. Затеищиков Д.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение // Кардиология. 1998. (9). 68–81.
4. Кутырина И.М. Современные аспекты патогенеза почечной артериальной гипертензии // Нефрология. 2000. 4. (1). 112–115.
5. Небиеридзе Д.В. Клиническое значение дисфункции эндотелия при артериальной гипертензии // Системные гипертензии. 2005. 7. (1). 58–61.
6. Пальцева Е.М. Экспериментальные модели хронических заболеваний почек // Клин. фармакол. 2009. (2). 37–42.
7. Раевский К.С., Баикатова В.Г., Ванин А.Ф. Роль оксида азота в глутаматергической патологии мозга // Вестн. РАМН. 2000. (4). 11–15.
8. Терезулов Ю.Г., Хусаинова Д.К. К методологии проведения пробы и оценки эндотелий-зависимой дилатации плечевой артерии // Эхография. 2004. (5). 217.
9. Тищенко О.В., Елисеева Е.В., Мотавкин П.А. Значение оксида азота в развитии гипертрофии сердца в условиях экспериментальной почечной гипертензии // Цитология. 2002. 44. (3). 263–269.
10. Шанар Ж. Гипертензия, соль и почки // Нефрология. 2000. 4. (2). 98–100.
11. Шляхто Е.В., Моисеева О.М. Клеточные аспекты ремоделирования сосудов при артериальной гипертензии // Артериальная гипертензия. 2002. 8. (2). 12–16.

12. Kataoka H., Otsuka F., Ogura T. et. al. The role of nitric oxide and the renin-angiotensin system in salt-restricted Dahl rats // *Am. J. Hypertens.* 2001. 14. (3). 276–285.
13. Maschio G., Oldrizzi L., Marcantoni C. Hypertension and progression of renal disease // *J. Nephrol.* 2000. 13. 225–227.
14. Mattel R., Viridis A., Ghiadoni L. Endothelial function in hypertension // *J. Nephrol.* 1997. 10. (4). 192–197.
15. Reckelhoff J.F., Zhang H. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats // *Hypertension.* 1998. 31. 435–439.
16. Vaziri N., Ni Z., Wang X. Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH // *Am. J. Physiol.* 1998. 274. 4. (2). S642–S649.
17. Wang D., Wei J., Hsu K. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats // *J. Biomed. Sci.* 1999. 6. (1). 28–35.

METHOD OF MODELING OF RENAL ARTERIAL HYPERTENSION IN RATS

Inessa Valeryevna DYUIZEN^{1,2}, Ekaterina Valeryevna ELISEEVA¹,
Elena Filippovna ROMANCHENKO¹, Olga Vladimirovna TISHCHENKO¹,
Anna Vladimirovna TYRTYSHNIKOVA¹, Nina Evgenevna LAMASH²,
Pavel Aleksandrovich MOTAVKIN¹

¹“Vladivostok Medical University of Minszdrav Russia”
690002, Vladivostok, Ostryakov av., 2

²Research Institute of Marine Biology n.a. A.V. Zhirmunskiy FEB RAS
600041, Vladivostok, Palchevskogo str., 17

A new model of renal arterial hypertension in rats has been developed. The increase of arterial pressure was accompanying with specific functional, morphologic and biochemical changes in the cardiovascular systems, which are typical for some variants of arterial hypertension in human. This experimental model can be used for study of the renoparenchymal arterial hypertension and testing antihypertensive drugs.

Key words: renal arterial hypertension, model, rats.

Dyizen I.V. – doctor of medical sciences, professor, senior researcher of the laboratory of pharmacology,
e-mail: duval@mail.ru

Ekaterina V.E. – doctor of medical sciences, professor of the chair for general and clinical pharmacology,
e-mail: yeliseeff@rbcmil.ru

Romanchenko E.F. – assistant professor of the chair for general and clinical pharmacology,
e-mail: e_f_romanach2005@mail.ru

Tishchenko O.V. – candidate of medical sciences, medical representative

Tyrtysnikova A.V. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for general and clinical pharmacology, e-mail: annafarm2000@mail.ru

Lamash N.E. – doctor biological sciences, senior researcher, laboratory pharmacology,
e-mail: nina@meteo.dvgu.ru

Motavkin P.A. – Doctor of medical sciences, professor, counselor of university administration

ЗАВИСИМОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОГО ДРЕНАЖА ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ КРЫСЫ ОТ ДОЗИРОВКИ, ДЛИТЕЛЬНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ И СПОСОБА ВВЕДЕНИЯ ЦЕФТРИАКСОНА

Павел Вениаминович ПОПОВ, Борис Яковлевич СЫРОПЯТОВ,

Татьяна Фёдоровна ОДЕГОВА

ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России
614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2

В работе показано, что функциональное состояние лимфатического дренажа задней конечности крыс зависит от дозировки, длительности и способа введения цефтриаксона. При внутримышечном введении антибиотика в максимальных дозах начиная с 4-х суток происходит угнетение лимфатического дренажа и формирование состояния лимфотоксичности. Лимфотоксичность препаратов необходимо учитывать при лечении больных с явлениями лимфостаза любой локализации. Лимфотропное введение цефтриаксона минимизирует его лимфотоксичность, при ней нарушения лимфооттока минимальны даже при максимальной концентрации препарата и длительных курсах введения.

Ключевые слова: лимфотоксичность, лимфостаз, лимфотропная терапия, цефтриаксон.

Большое значение в патогенезе любого воспаления принадлежит лимфатической системе, особенно это важно учитывать на практике при локализации патологического очага на нижних конечностях или на фоне уже имеющейся у больных лимфопатической недостаточности любого генеза. Еще большую роль данное явление имеет при хронических формах воспаления у пожилых людей. В настоящее время далеко не все фармакологические препараты тестируются на влияние лимфодренажной функции лимфатической системы человека или экспериментальных животных. Известно, что лекарственные средства могут изменять лимфоотток, например, некоторые антибиотики его увеличивают (лимфостимуляторы), другие угнетают (лимфосупрессоры), третьи не изменяют [2]. Однако практически отсутствуют данные о влиянии препаратов на лимфодренаж в зависимости от их концентрации, длительности и способа введения [3, 5]. В настоящее время длительность антибиотикотерапии варьируется в большом диапазоне (от 1–3 сут при антибиотикопрофилактике и до классических сроков терапии [6]), поэтому в данной работе авторы хотят показать зависимость лимфодренажа от длительности введения противобактериального препарата,

тем самым доказав еще один механизм положительного действия антибиотикопрофилактики, помимо прямого антибактериального эффекта.

Целью исследования явилась оценка функционального состояния лимфатического дренажа задних конечностей у крыс и возможных признаков проявления лимфотоксичности цефтриаксона при различных дозировке, длительности и способе введения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были крысы линии Вистар массой 200 г в возрасте 2 мес. Животные содержались в условиях вивария, регламентируемых приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Опыты проводили в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.09.77 г. и № 701 от 27.07.1978 г. об обеспечении принципов гуманного обращения с животными.

Животные были разделены на VI серий по 5 групп, в каждой группе по 6 крыс. Номер группы соответствовал длительности введения препарата в сут. Крысы I и II серий являлись контрольными, в I серии животным ежедневно (от 1 до 5 сут) внутримышечно, а в II серии лимфотропно [3, 5] в правую стопу вводили по 0,2 мл изотонического раствора натрия хлори-

Попов П.В. – к.м.н., подполковник полиции, специалист профессиональной подготовки,
e-mail: popov.pv@list.ru

Сыропятов Б.Я. – д.м.н., проф., зав. кафедрой физиологии и патологии

Одегова Т.Ф. – д.м.н., проф., ректор

да. Животным III и IV серий ежедневно (от 1 до 5 сут) внутримышечно в правое бедро вводили цефтриаксон, растворенный в 0,2 мл изотонического раствора натрия хлорида, в дозах соответственно 50 и 5 мг/кг в сутки. Крысы V и VI серий получали антибиотик по аналогичной схеме лимфотропно в правую стопу [2]. Цефтриаксон удобен в экспериментальном применении, так как его можно вводить один раз в сутки, более того, нами не найдены в научной литературе данные о влиянии его на дренажную функцию лимфатической системы.

По истечении срока эксперимента у животных каждой группы, сразу после последней инъекции, определяли функциональное состояние лимфатической системы [1]. Оценку лимфатического дренажа задней конечности крысы производили методом хромолимфоскопии, позволяющим оценивать состояние лимфодинамики. Для этого определяли время от момента интерстициальной инъекции в левую стопу до появления маркера-красителя в аортоподвздошном лимфатическом узле брюшной полости, для чего использовался 1%-й раствор метиленового синего [4].

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с помощью лицензионного пакета прикладных программ Statistica 6.0. (Stat Soft Inc, США). Применялись методы вариационной статистики: определение среднего арифметического, среднего квадратичного отклонения, стандартной ошибки среднего арифметического. Статистическая значимость различий сравниваемых признаков в группах оценивалась с помощью непараметрического U-теста Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$, что соответствует 95 % вероятности безошибочного прогноза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблице.

Во I серии во всех группах экспериментальных животных функциональное состояние лимфатического дренажа задней левой конечности сохранялось на одинаковом уровне. Отмечалась некоторая тенденция незначительного снижения лимфодренажа ($p > 0,05$), что может быть реакцией лимфатической системы на альтеративное воспаление от инъекций, которые своим количеством могли приводить к стрессу и прямому нарушению иглами анатомической целостности микроциркуляторного русла, возникновению гематом и реакции региональных лимфатических узлов. Необходимо также учитывать влияние многочисленных наркозов на функциональное состояние лимфатической системы.

Во II серии по сравнению с первой лимфоток при нарастании сроков введения угнетался в меньшей степени ($p < 0,05$), что косвенно говорит о преимуществе лимфотропного введения лекарств, даже простого физиологического раствора, вследствие развития менее выраженной воспалительной реакции со стороны региональных лимфатических узлов и сохранением их дренажной функции.

Результаты III серии эксперимента демонстрируют, что цефтриаксон, который вводили в максимальной дозировке внутримышечно, достоверно ускоряет лимфодинамику в 1–3-и сутки после инъекции ($p < 0,05$), но начиная с 4-х сут происходит значительное замедление лимфоотока ($p < 0,05$) по сравнению с показателями I серии. Это свидетельствует о смене влияния препарата на лимфодренаж в зависимости от сроков введения при максимальных дозах, когда в тканях накапливается токсическая концен-

Таблица

Время (мин) появления метилового синего, введенного лимфотропно в левую стопу крыс, в левом аортоподвздошном лимфоузле при антибиотикотерапии цефтриаксоном ($M \pm m$)

№ серии	№ группы, длительность введения цефтриаксона, сут				
	1	2	3	4	5
I	9,1 ± 0,8	9,2 ± 0,7	9,4 ± 0,9	10,9 ± 0,8	12,1 ± 0,9
II	8,8 ± 0,7	8,9 ± 0,6	9,1 ± 0,9	9,1 ± 0,8	9,4 ± 0,8
III	7,1 ± 0,5 [#]	7,7 ± 0,6 [#]	8,9 ± 0,7	12,9 ± 1,1 ^{*.#}	16,2 ± 1,4 ^{*.#}
IV	7,6 ± 0,5 [#]	7,7 ± 0,6 [#]	7,9 ± 0,6	8,2 ± 0,7 ^{#.^}	8,4 ± 0,7 ^{#.^}
V	7,2 ± 0,4 [#]	7,4 ± 0,5 [#]	7,5 ± 0,5 ^{#.•}	8,7 ± 0,7 [•]	9,9 ± 0,8 [•]
VI	7,2 ± 0,3 [#]	7,3 ± 0,5 [#]	7,2 ± 0,6 [#]	7,4 ± 0,6 [#]	7,5 ± 0,5 ^{#.^}

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величины соответствующего показателя: * – предшествующего срока внутри одной серии, # – контрольной серии, ^ – при введении максимальной (50 мг/кг в сутки) дозы в аналогичной группе, • – при внутримышечном способе введения в аналогичной группе.

трация лекарства и продуктов его метаболизма. Это можно расценить как проявление лимфотоксичности, по подобию патогенеза проявления гепатотоксичности.

В IV серии благодаря малым дозам явления лимфотоксичности практически не обнаруживались во все сроки эксперимента по сравнению с III серией ($p < 0,05$), но лимфодинамика была достоверно ускорена по сравнению с результатами первой контрольной серии ($p < 0,05$). Это косвенно подтверждает лимфостимулирующий эффект цефтриаксона, но при таких низких концентрациях его терапевтическое антимикробное действие может быть недостаточным, ведь при классических способах введения лекарств они равномерно распределяются по всему организму согласно фармакодинамике. Данный недостаток легко исправим посредством региональной лимфотропной антибиотикотерапии, при которой фармпрепарат в необходимом лимфатическом регионе сохраняется намного дольше и в большей концентрации относительно классических способов введения лекарств.

В V серии эксперимента во всех группах животных благодаря региональному лимфотропному введению антибиотика даже при максимальных дозах лимфотоксичность минимальна, т. е. лимфодренаж задней конечности крыс не нарушался даже в 5-й группе. В данной серии лимфодинамика задней конечности крыс была достоверно ускорена по сравнению со второй контрольной серией ($p < 0,05$), и даже относительно III серии эксперимента наблюдалась тенденция к усилению лимфодренажа. Это объясняется тем, что при лимфотропной терапии saniруются непосредственно региональные лимфатические узлы, и лимфодренаж усиливается [2]. Данное явление благоприятно влияет на инволюцию любого воспалительного очага [4].

Функциональное состояние лимфатической системы животных VI серии не изменялось во всех группах наблюдения и было достоверно лучше, чем во II серии. Это доказывает, что при данной схеме и способе химиотерапии не происходит угнетение лимфодинамики во всех сроках эксперимента и возможна экономия препарата при сохранении высокого терапевтического эффекта.

ВЫВОДЫ

1. Функциональное состояние лимфатического дренажа задней конечности крыс, которое оценивали методом хромолимфоскопии, зависит от дозы, длительности и способа введения цефтриаксона.

2. При внутримышечном введении цефтриаксона в максимальной дозе начиная с 4-х суток происходит угнетение лимфатического дренажа, т. е. формирование и проявление лимфотоксичности препарата, что необходимо учитывать при лечении больных с явлениями лимфастаза любой локализации [5].

3. Лимфотропный метод введения цефтриаксона в заданный лимфатический регион минимизирует лимфотоксичность антибиотика, т. е. предотвращает и компенсирует нарушения лимфооттока даже при максимальных концентрациях и на всех сроках эксперимента, что говорит о явном преимуществе данного способа химиотерапии.

4. В эффективности антибиотикопрофилактики в периоперационном периоде послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений определённую роль играет лимфостимулирующее действие антибиотиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горчаков В.Н. Морфологические методы исследования сосудистого русла. Новосибирск, 1997. 20–23.
2. Ефименко Н.А., Черняховская Н.Е., Выренков Ю.Е. Руководство по клинической лимфологии. М., 2001. 160 с.
3. Панченков Р.Т., Ярема И.В., Сильманович Н.Н. Лимфостимуляция. М., 1986. 242 с.
4. Попов П.В., Сыропятов Б.Я. Влияние лимфостимуляции на лимфатический дренаж задней конечности крысы на фоне центрального лимфастаза // Патологич. физиол. эксперим. терапия. 2008. (1). 12–14.
5. Поташов Л.В., Бубнова Н.А., Орлов Р.С. и др. Хирургическая лимфология. СПб.: СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2002. 272 с.
6. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. М., 2002. 393–397.

**THE DEPENDENCE OF THE FUNCTIONAL STATUS
OF THE LYMPHATIC DRAINAGE IN THE RAT HIND LIMB
ON THE DOSAGE AND MODE OF CEFTRIAZONE ADMINISTRATION
AND THE DURATION OF CHEMOTHERAPY**

**Pavel Veniaminovich POPOV, Boris Yakovlevich SYROPYATOV,
Tatyana Fedorovna ODEGOVA**

*Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare
and Social Development of the Russian Federation
614990, Perm, Polevaya str., 2*

The dependence of the functional status of the lymphatic drainage in the rat hind limb on the dosage and duration of chemotherapy and the mode of ceftriazone administration has been studied. It has been proved that the functional status of the lymphatic drainage in the hind limbs of rats really depends on the dosage and duration of chemotherapy and mode of administration of ceftriazone. If ceftriazone was administered intramuscularly to the maximum dose, then the suppression of the lymphatic drainage begins after 4 days of treatment, i.e. the lymphatic toxicity comes about. The drugs' lymphatic toxicity should be considered when treating patients with the lymphostasis symptoms of any location. The lymphotropic introduction of ceftriazone minimizes the lymphatic toxicity of this drug; moreover violation of the lymph drainage is minimal even at the highest concentrations and prolonged courses of antibiotic therapy.

Key words: lymphatic toxicity, lymphostasis, lymphotropic therapy, ceftriazone.

*Popov P.V. – candidate of medical sciences, police lieutenant colonel, specialist of professional training,
e-mail: popov.pv@list.ru*

Syropyatov B.Ya. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair of general physiology and pathology

Odegova T.F. – doctor of medical sciences, professor, rector

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ПРООКСИДАНТНОГО ЭФФЕКТА АКРИЛАМИДА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ *IN VITRO* И В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Михаил Михайлович ТАРСКИХ, Сергей Иванович КОЛЕСНИКОВ

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

Прямое воздействие акриламида на антиокислительные ферменты клетки (каталазу, супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу) в субклеточных препаратах различных органов крыс приводило сначала к ингибированию, а затем к увеличению активности каталазы и супероксиддисмутазы к концу периода инкубации, что может быть причиной отсутствия прооксидантного эффекта при добавлении различных концентраций мономера к постмитохондриальной надосадочной жидкости печени опытных животных. Прооксидантный эффект был отмечен лишь вследствие острой интоксикации ядом в исследуемых органах.

Ключевые слова: акриламид, каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза.

Использование изолированных тест-систем *in vitro* в настоящее время широко практикуется для определения чувствительности различных типов клеток в разных органах к токсическому действию химических веществ, а также для определения обратимости вредного действия токсикантов на данные органы и клетки [5]. Они помогают установить механизмы токсичности ксенобиотиков в отношении органов-мишеней и выявить зависимость эффекта от дозы и времени воздействия. Данный подход был использован и для изучения механизмов токсичности акриламида, промышленного яда, широко используемого в различных отраслях промышленности. Контакт с ним имеют сотни тысяч людей во всем мире на производстве и в быту [10].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 160 белых беспородных крысах-самцах массой 150–200 г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755). Фракционирование субклеточных препаратов производили методом дифференциального центрифугирования [7].

Печень промывали при 0–4 °С через нижнюю полую вену холодным 1,15 % раствором КСl, содержащим 100 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), измельчали, гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса. Аналогичным образом готовились гомогенаты почек и головного мозга. Гемолиз эритроцитов достигался путем гипотонического лизиса суспензии клеток дистиллированной водой; перед этим, после удаления плазмы и клеток белой крови, эритроциты трижды отмывали смесью равных объемов 0,154 М раствора NaCl и 0,07 М фосфатного буфера (рН 7,4) с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. При изучении спонтанного, ферментативного и аскорбатзависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) *in vitro* и на экспериментальной модели острой интоксикации его активность определялась по скорости образования малонового диальдегида (МДА) [8]. Содержание белка в биологических препаратах измеряли биуретовым методом [3]. Активность каталазы определялась по уменьшению оптической плотности инкубационной смеси при длине волны 230 нм в результате разложения перекиси водорода ферментом [6], супероксиддисмутазы (СОД) – по уменьшению скорости восстановления нитросинего тетразолия до формазана, регистрируемой при длине волны 450 нм [2], глутатионпероксидазы – по максимуму поглощения окисленного глутатио-

Тарских М.М. – к.м.н., врач-невролог высшей категории, e-mail: mtarskih@mail.ru
Колесников С.И. – советник Президиума РАМН, академик РАМН

на при длине волны 275 нм [6, 11]. Динамика активности ферментов выражалась в процентном отношении по сравнению с исходной активностью, принятой за 100 %. Для создания экспериментальной модели острого отравления акриламид вводился однократно внутривенно в дозе 4/5 от LD₅₀ (1,4 ммоль/кг) [4, 9].

Полученные результаты обрабатывались статистически с помощью вычисления средней арифметической (M) и стандартной ошибки средней арифметической (m). Достоверность различий сравниваемых параметров рассчитывали с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая исключительную роль печени в метаболизме чужеродных соединений, а также мембран эндоплазматического ретикула в метаболических превращениях ядов [1], в том числе акриламида [9], нами исследовалась возможность развития проокислительного эффекта акриламида при инкубации *in vitro* в течение 30 мин различных его концентраций с постмитохондриальной надосадочной жидкостью печени крыс, содержащей микросомы и цитозоль (табл. 1). Опыты продемонстрировали отсутствие проокислительного эффекта при добавлении различных концентраций ксенобиотика при изучении как ферментативного (в присутствии НАДФН), так и неферментативного ПОЛ (в присутствии ас-

корбата) – скорость образования МДА, вторичного продукта ПОЛ, в инкубационной смеси за 30 мин не увеличивалась (табл. 1). Аналогичная картина имела место при инкубации 1 mM акриламида – в течение 30 и 60 мин (зависимость «время – эффект») как в присутствии 2 mM НАДФН, так и в присутствии 1,6 mM аскорбата (табл. 2).

Для объяснения причин этого явления, а также с целью определения индивидуальной чувствительности органов и тканей к повреждающему действию акрилата в следующей серии экспериментов изучалась активность ферментов антиоксидантной защиты клетки в результате прямого его воздействия – СОД, каталазы и глутатионпероксидазы.

Эксперименты продемонстрировали снижение активности каталазы в гомогенате печени, почек, головного мозга и в гемолизате эритроцитов крыс на 40, 45, 48 и 50 % соответственно при прямом воздействии 10 mM акриламида *in vitro* уже через 5 минут после его добавления в инкубационную среду (рис. 1). Активность фермента была пониженной и через 15 минут после начала опыта, но имела тенденцию к повышению, которая сохранялась до 30-й минуты опыта. Характерно, что после 30-й минуты эксперимента активность каталазы в печени превышала контрольный уровень на 29 %, а в почках – на 12 % (см. рис. 1). Активность фермента в го-

Таблица 1

Влияние акриламида на аскорбат- и НАДФН-зависимую скорость образования МДА при инкубации с постмитохондриальной надосадочной жидкостью печени крыс (зависимость «доза – эффект»)

Стимулятор ПОЛ	Концентрация акриламида, mM	Скорость образования МДА, нмоль/мг белка за 30 мин
Аскорбат	0	1,42 ± 0,16
	1	1,70 ± 0,33
	3	1,67 ± 0,37
	10	1,49 ± 0,32
НАДФН	0	0,58 ± 0,12
	1	0,62 ± 0,22
	3	0,35 ± 0,17
	10	0,53 ± 0,28

Примечание. Инкубационная смесь, термостатируемая при 37 °С в 2,1 мл объема, содержала 100 mM трис-НСI буфер (pH 7,4), 1 mM аскорбата или 1 mM НАДФН, постмитохондриальную надосадочную жидкость (1 мг/мл белка – в опытах с аскорбатом, 2 мг/мл белка – в опытах с НАДФН).

Таблица 2

Влияние акриламида на аскорбат- и НАДФН-зависимую скорость образования МДА при инкубации с постмитохондриальной надосадочной жидкостью печени крыс (зависимость «время – эффект»)

Серия эксперимента	Время инкубации, мин	Контроль	Акриламид, 1 mM
Постмитохондриальная надосадочная жидкость	30	0,74 ± 0,06	0,69 ± 0,08
	60	1,02 ± 0,30	1,01 ± 0,21
Постмитохондриальная надосадочная жидкость + аскорбат	30	1,42 ± 0,06	2,36 ± 0,40
	60	2,51 ± 0,16	4,48 ± 0,67
Постмитохондриальная надосадочная жидкость + НАДФН	30	1,05 ± 0,07	1,04 ± 0,10
	60	1,39 ± 0,17	1,41 ± 0,08

Примечание. Инкубационная смесь, термостатируемая при 37 °С в 2,1 мл объема, содержала 100 mM трис-НСI буфер (pH 7,4), 1,6 mM аскорбата или 2 mM НАДФН, 4 мг/мл белка постмитохондриальной надосадочной жидкости.

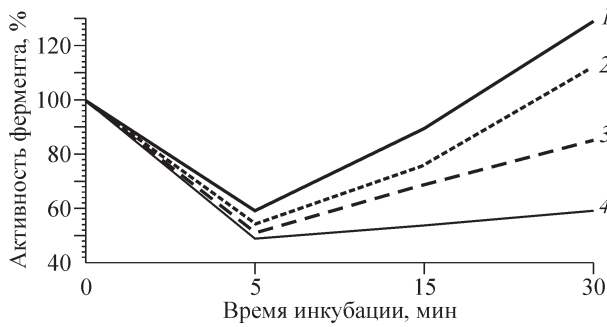


Рис. 1. Влияние акриламида на активность каталазы в постмитохондриальной надосадочной жидкости печени (1), почек (2), головного мозга (3) и в гемолизате эритроцитов (4) крысы

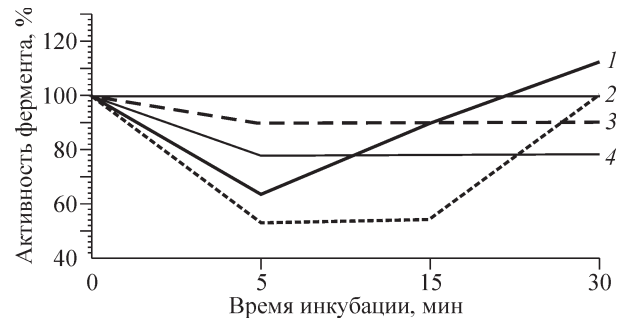


Рис. 2. Влияние акриламида на активность супероксиддисмутазы в постмитохондриальной надосадочной жидкости печени (1), почек (2), головного мозга (3) и в гемолизате эритроцитов (4) крысы

ловном мозге и гемолизате эритроцитов хотя и возрастала, но к 30-й минуте эксперимента не превышала контрольного уровня, оставаясь более низкой в эритроцитах (см. рис. 1).

Несколько иная картина наблюдалась при изучении активности СОД при воздействии акриламида: отмечалось падение активности фермента на 5-й минуте инкубации на 37, 47, 10 и 20 % в печени, почках, головном мозге и в эритроцитах соответственно (рис. 2). Далее имела место тенденция к возрастанию активности СОД в печени к 15-й минуте инкубации, а через 30 мин с начала эксперимента в печени активность фермента повышалась на 12 %, а в почках – до контрольного уровня (см. рис. 2). Активность СОД в головном мозге и в эритроцитах оставалась стойко сниженной до окончания опыта (см. рис. 2). Вышеуказанные результаты могут объяснить отсутствие прооксидантного эффекта акриламида при инкубации его с постмитохондриальной надосадочной жидкостью печени крысы: через 30 мин с начала опыта активность ферментов антиоксидантной защиты клетки каталазы и СОД превышает контрольный уровень, что и может быть причиной отсутствия стимуляции образования малонового диальдегида при воздействии акриламида в предыдущей серии экспериментов (см. табл. 1, 2). Следует отметить, что активность глутатионпероксидазы в исследуемых субклеточных препаратах при воздействии акриламида не изменялась ни в одном из органов.

В экспериментальных исследованиях следующего раздела работы для лучшего понимания патогенетического механизма токсичности акриламида создавалась экспериментальная модель острой интоксикации опытных крыс.

Из рис. 3, где дана временная развертка прооксидантного эффекта акриламида в различных органах и тканях, видно, что острое отравле-

ние акриламидом вызывало стимуляцию ПОЛ в плазме крови опытных животных уже через 1 ч после его введения ($p < 0,05$). Эффект сохранялся и через 3 ч с начала опыта, причем он сопровождался усилением накопления МДА в эритроцитах ($p < 0,001$) и стимуляцией образования этого продукта в печени затравленных крыс. Максимальный эффект приходился на 12 ч с начала затравки, о чем свидетельствует наибольшая скорость образования МДА в этом органе в

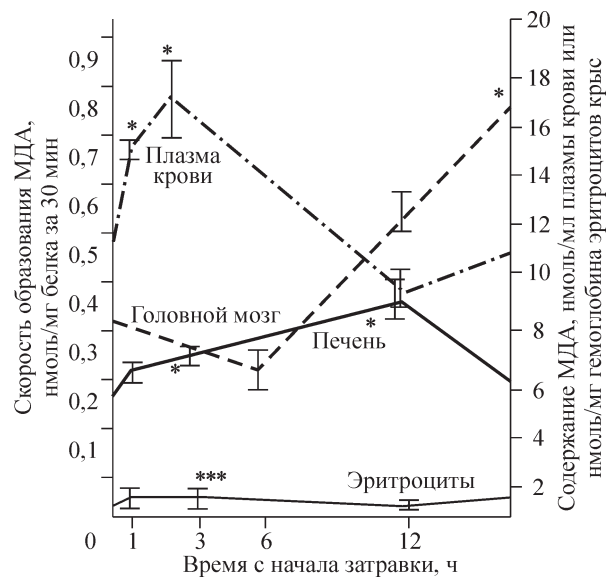


Рис. 3. Динамика скорости образования МДА в органах и содержания МДА в крови крысы при остром отравлении акриламидом. Инкубационная смесь, термостатируемая при 37 °С в 2,1 мл объема, содержала 100 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), 4 мг/мл белка гомогената печени или 1 мг/мл белка гомогената головного мозга контрольных и отравленных животных; 0,1 мл упакованных эритроцитов (1000 г в течение 10 мин) и 0,5 мл плазмы разводились равными объемами физиологического раствора, после чего без инкубации определялось содержание МДА

данный период времени ($p < 0,05$). Увеличение скорости образования МДА в гомогенате головного мозга крыс отмечалось лишь через 24 ч после введения мономера ($p < 0,05$). Полученные результаты указывают на роль ПОЛ в патогенезе токсического действия акриламида.

Затем, учитывая существующие в литературе данные о развитии поражений почек при острой интоксикации акриламидом [10], была предпринята попытка оценить роль ПОЛ в патогенезе нефротоксического действия мономера. Следует отметить, что острое отравление акриламидом не вызвало стимуляции ПОЛ в почках опытных животных ни на одном из временных этапов острой интоксикации, что оставляет спорной возможность участия данного механизма в патогенезе вызываемого ксенобиотиком поражения почек.

Таким образом, совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что острое отравление акриламидом ведет к повышению активности процессов ПОЛ в ряде органов (печени, крови, головном мозге животных). Это, в принципе, находится в соответствии с имеющимися литературными данными о динамике распределения меченого акриламида в органах отравленных крыс [10] и, кроме того, подтверждается ранее полученными результатами на уровне целого организма – увеличением содержания этана в выдыхаемом воздухе крыс, отравленных акриламидом, по сравнению с интактными животными [4], что является серьезнейшим аргументом в пользу прооксидантного действия последнего. Вышеуказанный показатель интенсивности процессов ПОЛ вместе с результатами острой затравки акриламидом доказательно подтверждает реальность участия окислительного метаболизма в развитии его мембрано-повреждающего эффекта, что важно также и с методической точки зрения, учитывая одинаковую (в сторону повышения) направленность изменения содержания МДА, промежуточного продукта ПОЛ, а также этана – короткоцепочечного углеводорода, являющегося конечным продуктом ПОЛ.

ВЫВОДЫ

1. Акриламид при инкубации с постмитохондриальной надосадочной жидкостью органов и гемолизатом эритроцитов крыс вызывает сначала уменьшение, а затем увеличение активности каталазы и супероксиддисмутазы к концу периода инкубации, что может быть причиной отсутствия прооксидантного эффекта при добавлении различных его концентраций к постмитохондриальной надосадочной жидкости

печени опытных животных в исследуемые периоды времени.

2. Острое отравление акриламидом приводит к развитию прооксидантного эффекта ранее всего в плазме крови экспериментальных животных, вызывая затем повреждение биомембран эритроцитов и гепатоцитов; позднее всего развивается прооксидантное действие ксенобиотика в головном мозге опытных крыс. Эффект обусловлен, по всей видимости, действием метаболитов акриламида, учитывая факт стимуляции ПОЛ в органах опытных животных лишь вследствие острой интоксикации акриламидом и отсутствие его в опытах *in vitro*.

3. Акриламид при остром отравлении животных не оказывает прооксидантного действия в почках, что дает основание считать маловероятным данный механизм в патогенезе его нефротоксичности.

4. Прооксидантное действие акриламида играет значительную роль в патогенезе его нейротоксичности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. М., 1975.
2. Гевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. 1985. (11). 678–681.
3. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1976. 69.
4. Иванов В.В., Тарских М.М., Яманова М.В. Этан выдыхаемого воздуха в оценке стабилизации мембран клеток печени при интоксикации акрилатами // Реконструкция, стабилизация и репарация биомембран. Благовещенск, 1989. 126.
5. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант, 2004. 720 с.
6. Медицинские лабораторные технологии / Ред. А.И. Карпищенко. Т. 2. СПб.: Интермедика, 1999.
7. Мэдди Э. Биохимическое исследование мембран. М., 1979. 5–57.
8. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. М., 1977. 63–64.
9. Тарских М.М. Промышленный мономер акриламид: взаимосвязь окислительного метаболизма, гепатотоксических эффектов и механизмов развития // Сиб. мед. журн. 2004. (4). 35–40.
10. Acrylamide. Environmental Health criteria 49. Geneva: WHO, 1989. 120 p.
11. Bartosr G., Bartkowiak A. Aging of the erythrocyte. II. Activities of peroxide-detoxifying enzymes // Experientia. 1981. 37. (7). 722–723.

**A STUDY OF THE DYNAMICS OF THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT
FERMENTS AND LIPIDS PEROXIDATION EFFECT OF ACRYLAMIDE
IN THE ISOLATED TEST- SYSTEMS *IN VITRO* AND IN THE PATHOGENESIS
OF THE ACUTE INTOXICATION**

Mikhail Mikhaylovich TARSKIKH, Sergey Ivanovich KOLESNIKOV

*Scientific Centre for Problem of Family Health and Human Reproduction SB RAMS
664003, Irkutsk, Timirazev str., 16*

The direct action of acrylamide on the antioxidant ferments cell - catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase in the subcellular preparations of different organs of rats leads first to the inhibition, and then to the increase in the activity of catalase and superoxide dismutase toward the end of the period of incubation, that can be the reason for the absence of lipids peroxidation effect during the addition of different concentrations of monomer to the postmitochondrial supernatant liquid of the liver of experimental animals. Stimulation of the lipids peroxidation effect was noted only as a result of the acute intoxication by poison in investigated organs.

Keywords: acrylamide, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase.

*Tarskikh M.M. – candidate of medical sciences, neurologist of the highest category, e-mail: mtarskih@mail.ru
Kolesnikov S.I. – counselor of the Presidium of SB RAMS, academician of RAMS*

УЧАСТИЕ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ Keap1/Nrf2/ARE В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Антон Владимирович ЧЕЧУШКОВ, Виктор Олегович ТКАЧЕВ,

Николай Константинович ЗЕНКОВ, Елена Брониславовна МЕНЬЩИКОВА

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

Исследована активация протективной внутриклеточной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE при развитии Th1-опосредованного иммунного ответа, индуцированного переносом аллогенных Т-лимфоцитов от мышей-доноров линии C57Bl6/J гибридам первого поколения (C57Bl6/J × DBA/2)F1. Активация Т-клеток донора МНС-антигенами, экспрессированными на антиген-презентирующих клетках реципиента, их клональная экспансия и дифференцировка в эффекторные клетки приводят к развитию острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Показано, что для активно пролиферирующих аллореактивных Т-лимфоцитов донора при острой РТПХ характерно усиление продукции активных форм кислорода, наиболее вероятно – за счет активации супероксид-генерирующих систем клетки. Отмеченное увеличение синтеза активных форм кислорода приводит к стабилизации транскрипционного фактора Nrf2, в результате чего его содержание в Т-лимфоцитах возрастает. Данный процесс (увеличение времени полужизни $T_{1/2}$ фактора Nrf2) является одним из ключевых в активации сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и вместе с транслокацией молекул транскрипционного фактора в клеточное ядро определяет экспрессию генов-мишеней. В соответствии с полученными данными о стабилизации Nrf2 также показано усиление синтеза белковых продуктов генов *gsta*, *nqo1* и *gclm*, регулируемых ARE. Кроме того, обнаружено, что при активации Т-лимфоцитов мыши митогеном *in vitro* в условиях индукции Nrf2 фенольными антиоксидантами продукция ключевого Th1-зависимого цитокина IFN- γ не изменяется, хотя синтез другого провоспалительного медиатора IL-17A, напротив, усиливается. В целом полученные данные позволяют сделать вывод о вовлечении сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в процессы активации и дифференцировки лимфоцитов в модельных системах *in vitro* и *in vivo*, хотя эффекты индукции данного сигнального пути требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE, Th1-опосредованный иммунный ответ, острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), активация Т-лимфоцитов, фенольный антиоксидант ТС-13.

Сигнальная система Nrf2/Keap1/ARE играет ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза при различных стрессорных воздействиях. Генетический дефицит транскрипционного фактора Nrf2 приводит к усилению воспалительных процессов, что свидетельствует о важной противовоспалительной роли данной сигнальной системы *in vivo*. При этом главной клеточной мишенью флоголитического действия Nrf2 обоснованно считались клетки моноцитарно-макрофагального звена иммунной системы, в которых активация Nrf2 сопровождалась подавлением «классического» провоспалительного сигнального пути, опосредованного транскрипционным фактором NF- κ B. В то же

время известно, что система Nrf2/Keap1/ARE активно функционирует и участвует в поддержании внутриклеточного гомеостаза и жизнеспособности лимфоцитов [3]. Процессы антигенной стимуляции Т-лимфоцитов и их дифференцировки в клетки-эффекторы иммунного ответа закономерно сопровождаются увеличением продукции активных форм кислорода (АФК) [9]. Поэтому весьма вероятно, что данный процесс сопровождается АФК-зависимой активацией Nrf2, хотя изучение результатов стимуляции данного транскрипционного фактора и его биологической роли является актуальной задачей современной иммунологии.

Чечушков А.В. – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов физиологии и патологии клетки, e-mail: achechushkov@gmail.com

Ткачев В.О. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов физиологии и патологии клетки, e-mail: tkachev_victor@mail.ru

Зенков Н.К. – д.б.н., ведущий научный сотрудник группы свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@soramn.ru

Меньщикова Е.Б. – д.м.н., рук. группы свободнорадикальных процессов, e-mail: lemen@soramn.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для индукции острой РТПХ использовали перенос 5×10^6 нефракционированных клеток костного мозга, полученных из бедренных и берцовых костей, в сочетании с 3×10^6 Т-лимфоцитами, полученными методом магнитной сепарации, используя позитивную селекцию клеток CD90.2+ (Thy1.2+), от доноров мышей C57Bl6 летально облученным в дозе 12,5 Гр реципиентам мышам-гибридам первого поколения (C57Bl6 \times DBA/2)F1 (BDF1) [13]. В качестве группы сравнения помимо лимфоцитов интактных мышей были использованы лимфоциты, выделенные аналогичным образом от мышей C57Bl6/J, облученных дозой 10 Гр с последующей трансплантацией костного мозга и сингенных Т-лимфоцитов [13].

Для получения клеточных экстрактов лимфоциты выделяли из селезенок реципиентов, используя двухстадийную селекцию (первоначально выделяя общий пул Т-лимфоцитов за счет негативной селекции клеток Ter119+, Gr-1+, B220+ и NK1.1+ и затем проводя позитивную селекцию клеток CD4+ на магнитных колонках MACS Miltenyi (Германия) на 12 день после трансплантации). Последующий анализ иммунофенотипа полученных магнитной сепарацией клеток показал, что выделенные лимфоциты являются TCRbeta+CD4+H-2K^b+H-2K^d-, что подтверждает их происхождение от трансплантированных лимфоцитов донора и принадлежность к Th-звену иммунной системы.

Полученные при помощи магнитной сепарации клетки лизировали 5%-м раствором трихлоруксусной кислоты, белковый преципитат осаждали центрифугированием при 12000 г в течение 10 мин, очищали двукратной отмывкой ледяным ацетоном и после высушивания на воздухе ресуспендировали в 9М растворе мочевины с добавлением 1 % дитиотреитола и 2 % Triton-X100, добавляли денатурирующий SDS-содержащий NuPage LDS 4x Sample buffer (Invitrogen, США) и нагревали пробы в течение 10 мин при +70 °С. В последующем проводили электрофорез приготовленных таким образом образцов в градиентном 4–12 % полиакриламидном геле и переносили белки на поливинилидендифторидные мембраны. Детекцию специфических белковых продуктов проводили методом усиленной хемилюминесценции, инкубируя мембраны последовательно с первичными немечеными антителами (Abcam, США), специфичными к выявляемому белку, вторичными антителами к иммуноглобулинам, конъюгированными с пероксидазой хрена, и

стабилизированным раствором люминола с перекисью водорода [19].

Для исследования продукции АФК лимфоцитами выделяли селезенки от реципиентов на 12 день после трансплантации и получали одноклеточную суспензию, протирая органы через 40 мкм нейлоновую сетку. Полученную суспензию окрашивали антителами к TCR-beta и CD4 и инкубировали с диацетатом дихлородигидрофлуоресцеина, реагирующим с широким спектром АФК с образованием интенсивно флуоресцирующего продукта (DCF), или с дигидроэтидием, специфично взаимодействующим с супероксидным анион-радикалом (O_2^-) с образованием гидроксизетидия (E-OH) [19]. Интенсивность флуоресценции DCF и E-OH в Th-лимфоцитах (TCR-beta+CD4+) определяли методом проточной цитометрии, используя цитометр FACSCalibur (Becton-Dickinson, США) и программное обеспечение CellQuest.

Для анализа продукции цитокинов (IL-17A, интерферона γ) лимфоцитами мышей линии C57Bl6 при их стимуляции митогеном спленоциты инкубировали с 25 нг/мл форбол-12-миристрат-13-ацетата (PMA) и 1 мкМ иономицина в течение 48 часов, также добавляя в культуру синтезированный нами водорастворимый фенольный антиоксидант TC-13 (3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил) пропилиосульфонат натрия) в качестве индуктора сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE [1]. Для определения концентрации цитокинов в супернатантах клеточных культур использовали технологию CBA (cytometric bead array) [10]. Измерения проводили на проточном цитометре FACSCalibur с последующей обработкой в программе FCAP Array (Becton-Dickinson, США).

При исследовании влияния индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE на количество IL-17A-продуцирующих клеток спленоциты мыши культивировали в течение 24 часов в присутствии 20 мкМ сульфорафана, 25 мкМ трет-бутилгидрохинона tBHQ (прототипические индукторы Nrf2, действующие за счет прямой модификации молекул репрессора Keap1) и 20 или 100 мкМ TC-13, за 4 часа до измерения в культуры клеток добавляли брефелдин А, тормозящий везикулярный транспорт и вызывающий накопление синтезированных белков в комплексе Гольджи, и стимуляторы продукции цитокинов (25 нг/мл PMA и 1 мкМ иономицина), после чего клетки отмывали от культуральной среды, фиксировали, пермеабилizировали клеточные мембраны и окрашивали флуорохром-мечеными антителами к IL-17A [10]. Измерения про-

водили на проточном цитометре FACSCalibur, пользуясь программой CellQuest.

Поскольку распределение величин параметров в выборках отличалось от нормального, данные на рис. 2–4 представлены в виде медианы (Me; столбики), указаны также нижний (Q_1) и верхний (Q_3) квартили (разбросы). Различия между группами оценивали с помощью критерия Манна – Уитни и считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения особенностей участия сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в процессе активации и дифференцировки Т-лимфоцитов была выбрана модель Th1-зависимого иммунного воспаления *in vivo*, вызванного клетками, реагирующими на антигены главного комплекса гистосовместимости (МНС) после аллогенной трансплантации костного мозга от доноров мышей C57Bl6 реципиентам мышам BDF1. Как было показано, трансплантация аллогенных Т-лимфоцитов донора приводит к их стимуляции МНС-антигенами антиген-презентирующими клетками реципиента, клональной экспансии и дифференцировке в эффекторные клетки, вызывающие деструкцию тканей хозяина [5]. Известно также, что в данной системе (данной комбинации донора и реципиента) РТПХ в равной степени вызывается как CD4-, так и CD8-позитивными Т-клетками донора, и в случае трансплантации только Th-лимфоцитов определяется интенсивной продукцией провоспалительных цитокинов [18] и Fas-зависимым апоптозом клеток-мишеней [15].

Обнаружено, что при индукции острой РТПХ она развивается стереотипно у всех реципиентов аллогенных клеток, о чем свидетельствует уменьшение массы тела и развитие клинических признаков (снижение двигательной активности, изменение позы тела, нарушение шерсти и кожного покрова) (рис. 1).

В качестве группы сравнения помимо лимфоцитов интактных мышей были использованы лимфоциты, выделенные от мышей C57Bl6/J, облученных дозой 10 Гр (что помимо повреждения собственных клеток костного мозга также приводит к истощению Т-лимфоцитов) с последующей трансплантацией костного мозга и сингенных Т-лимфоцитов. Показано, что после летального облучения донорские клетки также интенсивно делятся, восполняя недостаток лимфоцитов в организме реципиентов, за счет активации механизмов гомеостатической пролиферации, которые не приводят, в отличие

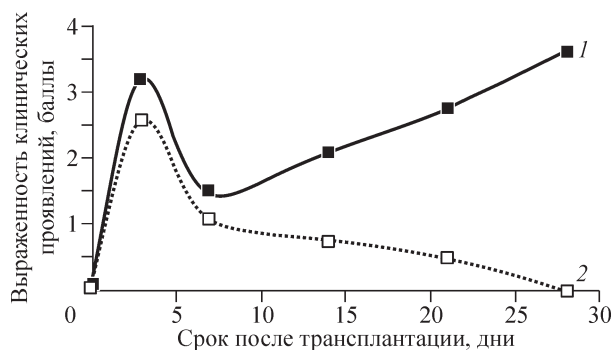


Рис. 1. Развитие клинических проявлений острой РТПХ после трансплантации сингенных (1) и аллогенных (2) Th1-лимфоцитов

от аллогенной трансплантации, к их антиген-зависимой дифференцировке в эффекторные клетки, хотя часть клеток приобретает фенотип клеток памяти [16]. Данный подход позволяет различить эффекты, связанные непосредственно с активацией и дифференцировкой Т-лимфоцитов и определяемые их интенсивной пролиферацией.

В наивных, сингенных и аллогенных лимфоцитах исследовано содержание белков, кодируемых ARE-зависимыми генами: глутатион-S-трансфераз класса А (продукт гена *gsta*), NAD(P)H:хиноноксидоредуктазы 1 (*nqo1*) и модифицирующей субъединицы гамма-глутамилцистеинлигазы (*gclm*), а также содержание самого транскрипционного фактора Nrf2, накапливающегося в клетках в условиях окислительного и электрофильного стресса за счет активации трансляции собственной мРНК и ингибирования процессов протеасомной деградации белка, связанного с изменением характера взаимодействия с репрессорным белком Keap1.

Установлено, что *in vivo* активированные аллоантигенами при острой РТПХ Th1-лимфоциты характеризуются увеличением внутриклеточного содержания белковых продуктов ARE-зависимых генов (рис. 2, A–B), а также накоплением молекул Nrf2 (рис. 2, Г).

Эти изменения свидетельствуют об активации сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в клетках-эффекторах Th1-направленного иммунного воспаления. Важно отметить, что данный процесс непосредственно не связан с интенсивной пролиферацией лимфоцитов в условиях лимфопении, поскольку в лимфоцитах, выделенных от мышей после переноса им сингенных Т-клеток, увеличения содержания указанных белков не обнаружено.

Также интересно, что содержание репрессорного белка Keap1 в активированных Th1-

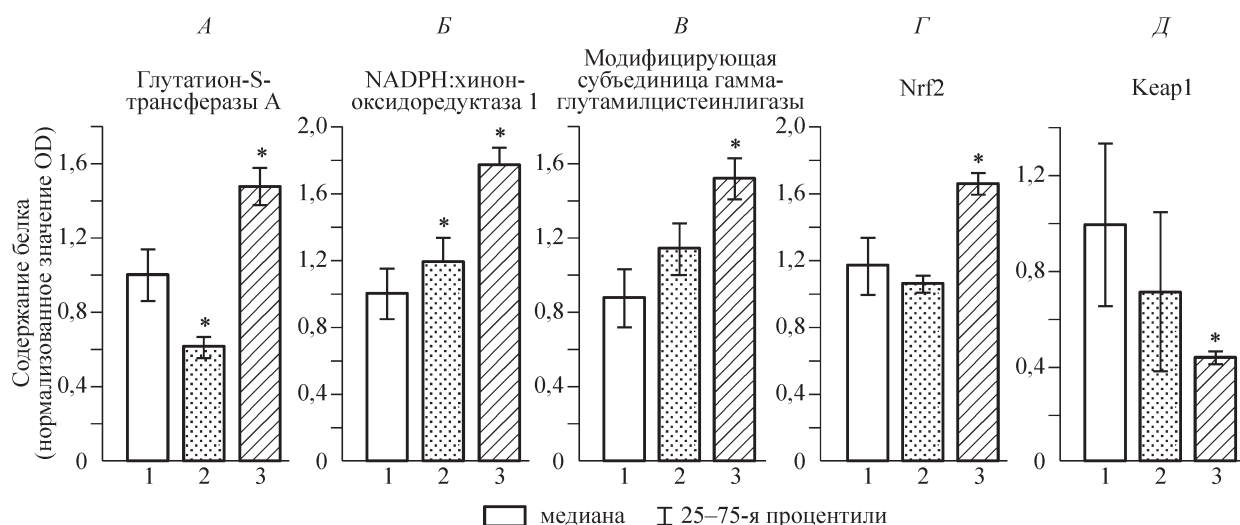


Рис. 2. Изменение содержания ARE-зависимых ферментов и компонентов сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в Th1-лимфоцитах при острой РТПХ. Здесь и на рис. 3: 1 – наивные лимфоциты, 2 – сингенные лимфоциты, 3 – аллогенные лимфоциты; звёздочкой обозначены статистически значимые отличия от величины соответствующего показателя наивных лимфоцитов

лимфоцитах снижается (рис. 2, Д), что подтверждает участие механизма его усиленной протеасомной деградации, амплифицирующей активацию Nrf2 в стрессовых условиях [8].

Поскольку нами была отмечена активация сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в Th1-клетках при иммунном воспалении *in vivo*, представляло интерес исследовать продукцию активных форм кислорода лимфоцитами. Обнаружено, что активированные Th-лимфоциты после аллогенной трансплантации характеризуются увеличением продукции АФК, что сопровождается возрастанием скорости окисления диацетата дихлородигидрофлуоресцеина и, соответственно, усилением интенсивности флуоресценции DCF в аллогенных Т-лимфоцитах по

сравнению с сингенными и наивными клетками (рис. 3, А).

При этом наиболее вероятно, что увеличение суммарной продукции АФК обусловлено активацией супероксид-генерирующих клеточных систем (таких как функционально активные в Т-лимфоцитах NAD(P)H-оксидазы Nox-семейства [9] и/или дыхательная цепь митохондрий [6]), поскольку в активированных *in vivo* клетках также увеличивалась флуоресценция E-OH (рис. 3, Б).

Полученные данные свидетельствуют в пользу возможной активации Keap1/Nrf2/ARE в Th1-лимфоцитах за счет окислительной модификации SH-групп остатков цистеина репрессорного белка Keap1, приводящих к изменению характера его взаимодействия с Nrf2 и торможению деградации последнего [4]. Также предложен непрямой механизм активации Nrf2 при окислительном стрессе за счет высвобождения ионов Zn^{2+} из внутриклеточных депо [12].

Недавно установлено, что стимуляция фактора транскрипции Nrf2 в Th2-лимфоцитах *in vitro* *mpe*-бутилгидрохиноном усиливает их антиген-зависимую дифференцировку в Th2-клетки с соответствующим спектром секретлируемых цитокинов и, напротив, тормозит дифференцировку в клетки Th1-типа [14]. Данная работа, первая в своей области, позволяет предполагать, наряду с общеизвестным противовоспалительным эффектом, наличие у сигнальной системы Nrf2/Keap1/ARE непосредственных иммуномодулирующих свойств. В соответствии с данным предположением нами было проведено

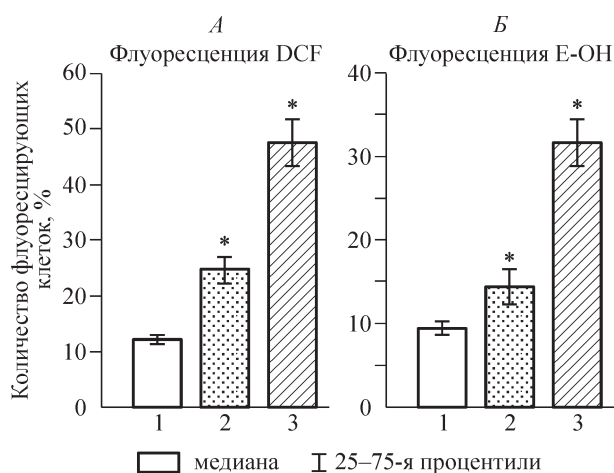


Рис. 3. Продукция АФК, определяемая по флуоресценции DCF (А) и E-OH (Б) Th1-лимфоцитами при острой РТПХ

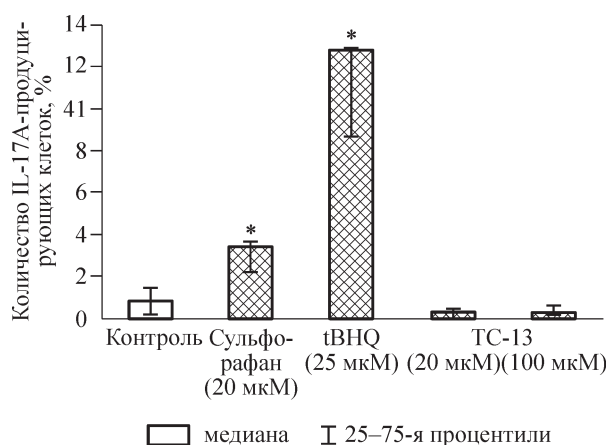


Рис. 4. Влияние индукторов Nrf2 на количество лимфоцитов, секретирующих IL-17A. Звёздочкой обозначены статистически значимые отличия от величины соответствующего показателя в контроле

исследование влияния различных индукторов Nrf2 на процессы активации и дифференцировки Th-лимфоцитов в культуре *in vitro*.

Показано, что инкубация лимфоцитов селезенки с форбол-12-мирикат-13-ацетатом и кальциевым ионофором иономицином приводит к усилению их пролиферации, сопровождаемой появлением колоний, и бласттрансформации клеток с последующей дифференцировкой в эффекторные клетки. Поскольку форбол-12-мирикат-13-ацетат и иономицин активируют протеинкиназу C, опосредующую проведение сигнала с T-клеточного рецептора, данная стимуляция, в целом, схожа с антиген-зависимой активацией лимфоцитов.

Ранее нами было показано, что синтетический водорастворимый фенольный антиоксидант ТС-13 обладает выраженной противовоспалительной активностью [2], связанной с его способностью индуцировать Nrf2 [1]. Обнаружено, что ТС-13 в концентрации 20 мкМ не изменяет продукцию Th1-ассоциированного цитокина интерферона- γ (данные не приведены), но статистически значимо (Me 110 %, Q_1 – Q_3 108–128 %, $p = 0,0369$) увеличивает содержание в культуральной среде другого важного провоспалительного медиатора, связанного с Th17-звеном иммунной системы, – IL-17A.

При исследовании влияния индукторов сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE на количество IL-17A-продуцирующих клеток установлено, что среди нестимулированных T-лимфоцитов практически отсутствуют продуценты IL-17A, при этом индукторы Nrf2 сульфорафан и tBHQ (но не ТС-13) увеличивают количество секретирующего данный цитокин лимфоцитов (рис. 4).

Интересно, что генетически обусловленный дефицит генерации фагоцитами активных форм кислорода в эксперименте [17] и у больных хроническим гранулематозом [7] сопровождается гипервоспалительным фенотипом, который характеризуется, в частности, снижением активации Nrf2 и экспансией Th17-лимфоцитов, продуцирующих повышенные количества эффекторных цитокинов (IL-17, IL-21, IL-22).

Таким образом, индукция Nrf2 в условиях митогенной стимуляции T-лимфоцитов *in vitro* приводит к изменению цитокинового профиля активированных клеток. При этом изменения носят разноплановый характер, свидетельствуя об иммуномодулирующем характере влияния активации сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE на иммунный ответ. На основании полученных собственных данных можно предположить, что активация Nrf2 способствует преимущественной дифференцировке наивных T-лимфоцитов в Th17-клетки за счет ингибирования Th1-дифференцировки, хотя мы не можем исключить, что эффекты индукторов Nrf2 в большей степени определяются условиями проведения эксперимента, чем и объясняются различия в полученных нами и другими группами исследователей результатах. В частности, эффекты индукторов Nrf2 на Th1/Th2-баланс *in vivo* могут быть в первую очередь обусловлены изменением функционального состояния антиген-презентирующих клеток [11, 20], дирижирующих дифференцировку T-лимфоцитов при развитии иммунного ответа. В то же время наблюдаемая нами стимуляция Nrf2 в Th1-лимфоцитах при острой РТПХ, вероятно, является инструментом торможения чрезмерной активации лимфоцитарного звена иммунной системы и поддержания таким образом некоторого иммунного гомеостаза в условиях развития патологического процесса *in vivo*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 11-04-00640а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В. и др. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Биохимия. 2007. 72. (6). 790–798.
2. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. Структурно-функциональ-

ные особенности противовоспалительного действия новых водорастворимых серосодержащих фенольных антиоксидантов // Бюл. эксперим. биол. мед. 2009. (5). 521–524.

3. Bertolotti M., Yim S.H., Garcia-Manteiga J.M. B- to plasma-cell terminal differentiation entails oxidative stress and profound reshaping of the antioxidant responses // *Antioxid. Redox. Signal.* 2010. 13. 1133–1144.

4. Chapple S.J., Siowand R.C., Mann G.E. Cross-talk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.021>.

5. Ferrara J.L., Levine J.E., Reddy P., Holler E. Graft-versus-host disease // *Lancet.* 2009. 373. 1550–1561.

6. Gatza E., Wahl D.R., Pipari A.W. et al. Manipulating the bioenergetics of alloreactive T cells causes their selective apoptosis and arrests graft-versus-host disease // *Sci. Transl. Med.* 2011. 3. 67ra8.

7. Horvath R., Rozkova D., Lastovicka J. et al. Expansion of T helper type 17 lymphocytes in patients with chronic granulomatous disease // *Clin. Exp. Immunol.* 2011. 166. 26–33.

8. Itoh K., Mimura J., Yamamoto M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. 13. 1665–1678.

9. Jackson S.H., Devadas S., Kwon J. et al. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation // *Nat. Immunol.* 2004. 5. 818–827.

10. Kappel L.W., Goldberg G.L., King C.G. et al. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease // *Blood.* 2009. 113. 945–952.

11. Kim H.J., Barajas B., Wang M., Nel A.E. Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of T(H)1 immunity: role of dendritic cells // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. 121. 1255–1261.

12. McMahon M., Lamont D.J., Beattie K.A., Hayes J.D. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. 107. 18838–18843.

13. Reddy P., Ferrara J.L.M. Mouse models of graft-versus-host disease // *StemBook*. Ed. Edited by D. Mathis, J. Ritz. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute, 2008. doi/10.3824/stembook.1.36.1.

14. Rockwell C.E., Zhang M., Fields P.E., Klaassen C.D. Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4⁺ T cells // *J. Immunol.* 2012. 188. 1630–1637.

15. Schmaltz C., Alpdogan O., Horndasch K.J. et al. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect // *Blood.* 2001. 97. 2886–2895.

16. Surh C.D., Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells // *Immunity.* 2008. 29. 848–862.

17. Segal B.H., Han W., Bushey J.J. et al. NADPH oxidase limits innate immune responses in the lungs in mice // *PLoS One.* 2010. 5. e9631.

18. Teshima T., Ordemann R., Reddy P. et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium // *Nat. Med.* 2002. 8. 575–581.

19. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. 43. 995–1022.

20. Williams M.A., Rangasamy T., Bauer S.M. et al. Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter // *J. Immunol.* 2008. 181. 4545–4559.

REDOX-SENSITIVE SIGNALING SYSTEM Keap1/Nrf2/ARE IN DIFFERENTIATION AND ACTIVATION OF T LYMPHOCYTES

Anton Vladimirovich CHECHUSHKOV, Viktor Olegovich TKACHEV,
Nikolay Konstantinovich ZENKOV, Elena Bronislavovna MENSCHHIKOVA

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

Activation of the protective intracellular signaling system Keap1/Nrf2/ARE has been studied during Th1 immune response induced by transfer of allogeneic T lymphocytes from donor mice strain C57Bl6/J to F1 hybrid mice (C57Bl6/J × DBA/2)F1. Activation of donor T cells by MHC antigens expressed on antigen-presenting recipient cells, its clonal expansion and differentiation into effector cells induce acute graft-versus-host reaction (GVHR). Alloreactive T lymphocytes have been shown to enhance generation of reactive oxygen species in acute GVHR, most likely – due to activation of the cell superoxide-generating systems. The observed increase in the synthesis of reactive oxygen species leads to the stabilization of transcription factor Nrf2, resulting in elevation of its concentration in T lymphocytes. Increased Nrf2 half-life $T_{1/2}$ is a key event in activation of the signaling system Keap1/Nrf2/ARE and with translocation of transcription factor molecules into the cell nucleus determines the expression of target genes. In accordance with the findings of Nrf2 stabilization the synthesis of protein products of ARE-regulated genes *gsta*, *nqo1* and *gclm* has also been shown to increase. In addition, it was found that when mice T lymphocytes are activated *in vitro* by mitogen following Nrf2 induction by phenolic antioxidants, the production of key Th1-dependent cytokine IFN- γ does not change, although the synthesis of other pro-inflammatory mediator IL-17A, on the contrary, increases. Overall, the data suggest the involvement of the signaling system Keap1/Nrf2/ARE in the lymphocyte activation and differentiation in model systems *in vitro* and *in vivo*, although the effects of induction of this signaling pathway require further investigation.

Key words: signaling system Keap1/Nrf2/ARE, Th-1 biased immune response, acute graft versus host acute reaction (GVHR), T lymphocyte activation, phenol antioxidant TS-13.

Chechushkov A.V. – researcher of laboratory of cell physiology and pathology molecular mechanisms,
e-mail: achechushkov@gmail.com

Tkachev V.O. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of cell physiology and pathology molecular mechanisms, e-mail: tkachev_victor@mail.ru

Zenkov N.K. – doctor of biological sciences, leading researcher of group for free-radical processes,
e-mail: lemen@soramn.ru

Menschchikova E.B. – doctor of medical sciences, head of group for free-radical processes,
e-mail: lemen@soramn.ru

УДК 616.223-002-018.23:577.112.6:577.322

РОЛЬ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА β_1 В СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ БРОНХИАЛЬНОЙ СТЕНКИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ ВОСПАЛЕНИЯ В БРОНХАХ**Елена Андреевна ГЕРЕНГ, Ирина Владимировна СУХОДОЛО, Раиса Ивановна ПЛЕШКО, Людмила Михайловна ОГОРОДОВА, Иван Васильевич МИЛЬТО, Екатерина Борисовна БУКРЕЕВА, Ольга Сергеевна КОБЯКОВА, Полина Александровна СЕЛИВАНОВА, Иван Сергеевич КРЕМИС***ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России 634050, г. Томск, Московский тракт, 2*

Целью исследования явилась оценка влияния трансформирующего фактора роста β_1 на развитие структурных изменений в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких. С помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования установлено, что у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой бронхиальной астмы фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» определяется повышение содержания трансформирующего фактора роста β_1 в клетках бронхиального эпителия с субэпителиальным фиброзом, утолщение базальной мембраны, а при хронической обструктивной болезни легких наблюдается повышенная плотность макрофагов, экспрессирующих рецепторы к трансформирующему фактору роста β_1 , что сочетается с выраженным периваскулярным фиброзом, плоскоклеточной метаплазией бронхиального эпителия.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста β_1 , фиброз бронхиальной стенки, воспаление в органах дыхательной системы.

Трансформирующий фактор роста β_1 (TGF- β_1), продуцируемый эпителиоцитами слизистой оболочки бронхов (СОБ), клетками воспалительного инфильтрата обладает выраженным иммунорегуляторным, антипролиферативным и регенерирующим действием [1]. Предпосылкой для проведения настоящего исследования послужили противоречивые данные о роли этого ростового фактора в реализации воспаления и структурных изменениях бронхиальной стенки при тяжелой форме бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

Цель исследования – оценить роль TGF- β_1 в развитии структурных изменений в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме БА и ХОБЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено одномоментное сравнительное исследование 10 пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимая) (9 женщин и 1 мужчина) в возрасте от 36 до 62 лет (средний

Геренг Е.А. – к.м.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры морфологии, e-gereng@mail.ru

Суходоло И.В. – д.м.н. проф., зав. кафедрой морфологии, e-mail: suhodolo@sibmail.com

Плешко Р.И. – д.м.н., проф. кафедры морфологии

Огородова Л.М. – д.м.н., проф., член-кор. РАМН, заслуженный деятель науки, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета, e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Мильто И.В. – к.б.н., доцент кафедры морфологии, e-mail: milto_bio@mail.ru

Букреева Е.Б. – д.м.н., проф. кафедры внутренних болезней педиатрического факультета, e-bukreeva@mail.ru

Кобякова О.С. – д.м.н., зав. кафедрой общей и врачебной практики (семейной медицины), e-mail: olga_kobyakova@rambler.ru

Селиванова П.А. – к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины, e-mail: p_selivanova@mail.ru

Кремис И.С. – врач пульмонологического отделения, e-mail: kremanton@yandex.ru

возраст $49,09 \pm 1,52$ года) и 15 пациентов с тяжелым течением ХОБЛ (13 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 54 до 65 лет (средний возраст $54,8 \pm 11,6$ года). Обязательным условием участия в исследовании было наличие письменного информированного согласия больного, одобренное локальным комитетом по этике ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России г. Томска № 2833/1 от 31.11.2011 г. Диагностика болезней проведена согласно критериям глобальной стратегии лечения и профилактики БА и ХОБЛ (GINA, GOLD, 2006). Общий стаж болезни при БА составил $14,8 \pm 1,0$ года, при ХОБЛ – $18,6 \pm 2,6$ года.

Контрольной группой выступали лица без патологии органов дыхания ($n = 10$), сопоставимые по полу и возрасту с исследуемыми больными.

Биоптаты (2–3 фрагмента) забирали во время бронхоскопии из устья среднедолевого бронха правого легкого. Материал фиксировали в 10 % забуференном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по стандартной методике [2, 4].

Гистологические препараты окрашивали гематоксилином-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону [2].

При обзорной световой микроскопии оценивали воспалительные, дисрегенераторные (пролиферацию базальных клеток, наличие плоскоклеточной метаплазии и бокаловидно-клеточной гиперплазии), фиброзные процессы.

На цифровой фотокамере Canon Power Shot A 630 (Япония) проводили съемку гистологических препаратов (7–10 случайных полей зрения для каждого среза). Цифровые фотографии подвергали морфометрическому исследованию с использованием компьютерной программы ImageJ 1.43 (режим доступа <http://www.rsb.info.nih.gov/ij/>). За единичный объем принимали 1 мм^2 ткани бронхов. С помощью метода точечного счета Автандилова с использованием Plugins «Grid» в бронхиоптатах подсчитывали объемные плотности ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$) покровного эпителия и отдельных клеточных форм, удельный объем соединительной ткани, желез, микрососудов. Используя окуляр-микрометр, определяли высоту эпителиального пласта, а также ширину базальной мембраны (мкм).

При помощи Plugins «Cell» программы ImageJ в 1 мм^2 собственной пластинки СОБ подсчитывали плотность воспалительного инфильтрата и различных клеточных популяций (макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов, полиморфоядерных лейкоцитов).

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных антител и системы визуализации фирмы «Dako» (Дания) LSAB2 System – HRP. Срезы докрашивали гематоксилином, заключали в бальзам.

Экспрессию $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ клеток воспалительного инфильтрата оценивали на 1 мм^2 ткани собственной пластинки СОБ.

Экспрессию рецепторов к $\text{TGF-}\beta_1$ в эпителиоцитах бронхов оценивали по интенсивности окраски срезов с помощью люминесцентного микроскопа «Люам И-3» с фотометрической насадкой ФМЭЛ-2. Фотометрирование проводили в 50 клетках реснитчатого эпителия слизистой оболочки бронхов при длине волны монохроматического света 548 нм (зеленый).

Данные представляли в виде медианы (Me), меру рассеяния в виде квартильного интервала ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$). В связи с тем, что небольшой объем выборки не позволил отнести данное распределение к нормальному закону, статистический анализ осуществляли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей в трех несвязанных группах проводили дисперсионным анализом Краскела–Уоллиса. Сопряженность между полученными данными определяли посредством оценки коэффициентов корреляции рангов Спирмена. Критическим уровнем значимости считали значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимая) в СОБ выявлено увеличение плотности воспалительного инфильтрата преимущественно за счет лимфоцитов, которые принадлежали к субпопуляции CD4^+ -клеток (Т-хелперы) (табл. 1). Этот факт указывает на развитие аллергического воспаления в СОБ у пациентов с исследуемым фенотипом астмы, что подтверждается статистически значимой положительной ассоциацией между плотностью CD4^+ -клеток в бронхиальной стенке, с одной стороны, и концентрацией сывороточного IgE ($r = 0,72$; $p = 0,004$) и суточной лабильностью бронхов ($r = 0,85$; $p = 0,025$) – с другой. Отмеченное нами повышение плотности эозинофилов в СОБ, а также связь эозинофильного инфильтрата с ремоделированием бронхиальной стенки нашло отражение в обратных корреляциях между эозинофилией СОБ и стажем болезни ($r = -0,95$; $p = 0,005$), а также объемом форсированного выдоха за 1 с (ОФВ_1) ($r = -0,75$;

Таблица 1

Морфометрические показатели состава клеточного инфильтрата и количества $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клеток в слизистой оболочке бронхов у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» и ХОБЛ, Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Исследуемый параметр	Контрольная группа (n = 10)	Пациенты с бронхиальной астмой (n = 10)	Пациенты с ХОБЛ (n = 10)
Суммарная плотность инфильтрата	267,94 (106,93–478,98)	1636,63 (1486,66–1854,71)*	1164,03 (999,05–1593,82)*.#
Макрофаги	83,44 (26,43–125,22)	256,24 (234,32–282,44)*	183,23 (123,62–225,62)*.#
Полиморфно-ядерные лейкоциты	18,24 (5,86–24,43)	498,31 (365,21–533,42)*	528,62 (485,34–688,42)*.#
Эозинофилы	–	26,43 (18,25–32,42)*	13,82 (12,27–24,52)*.#
Лимфоциты	166,22 (74,64–329,33)	855,72 (665,32–1006,43)*	438,36 (377,82–655,24)*.#
$CD4^+$ -лимфоциты	66,39 (29,85–131,82)	525,63 (185,24–635,47)*	102,35 (98,43–285,42)*.#
$CD8^+$ -лимфоциты	55,33 (24,88–109,77)	285,43 (136,43–342,23)*	336,01 (279,36–369,82)*.#

Примечание. Здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя лиц контрольной группы статистически значимо при $p < 0,05$, # – отличие от величины соответствующего показателя пациентов с бронхиальной астмой фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» статистически значимо при $p < 0,05$.

$p = 0,001$). Среди эозинофильных гранулоцитов преобладали клетки с признаками дегрануляции, что свидетельствует о высвобождении ими катионных белков, обладающих выраженным цитотоксическим действием на эпителий бронхов [3, 4]. Возможно, этим можно объяснить снижение высоты эпителиального пласта у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимая). Доказательством обнаруженного нами факта может служить корреляция между данным морфометрическим параметром и плотностью эозинофильных гранулоцитов в собственной пластинке СОБ ($r = -0,91$; $p = 0,009$).

В последние годы эозинофилам отводится ключевая роль в генерации оксида азота, образующегося вследствие высокой функциональной активности индуцибельной NO-синтазы. В условиях окислительного стресса, наблюдаемого при воспалении в СОБ у пациентов с данной формой астмы, оксид азота метаболизируется преимущественно с образованием пероксинитрита, который стимулирует выработку $TGF-\beta_1$ в бронхиальной стенке [5].

Действительно, у пациентов с фенотипом «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» определяется статистически значимое ($p = 0,002$) повышение содержания данного ростового фактора в клетках бронхиального эпителия (0,526 (0,437–0,688) усл. ед.; 0,415 (0,305–

0,586) усл. ед. при тяжелой форме ХОБЛ, 0,223 (0,098–0,395) усл. ед. – в контроле). Интересно, что у исследуемой группы пациентов с тяжелой формой астмы высокие показатели экспрессии рецепторов к $TGF-\beta_1$ в бронхиальном эпителии СОБ сочетаются с большей плотностью клеток фибробластического ряда и утолщением базальной мембраны (табл. 2).

Вероятно, все эти изменения взаимосвязаны: усиление высвобождения $TGF-\beta_1$ из клеток бронхиального эпителия приводит к увеличению толщины базальной мембраны за счет повышения продукции коллагена I, III, VIII типов и компонентов основного вещества (фибронектина, тенасцина), синтезируемых лаброцитами [4]. Утолщение базальной мембраны можно рассматривать, с одной стороны, как защитно-приспособительную реакцию, с другой – как морфологический маркер бронхиальной гиперреактивности, наблюдаемой у пациентов с тяжелой формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимой).

У пациентов с тяжелой формой ХОБЛ по сравнению с лицами всех сравниваемых групп в СОБ определяется самая высокая плотность макрофагов, экспрессирующих рецепторы к $TGF-\beta_1$ и локализованных преимущественно периваскулярно. Известно, что $TGF-\beta_1$ активизирует функционирование фибробластов, стимулируя развитие периваскулярного фиброза

Таблица 2

Морфометрические показатели слизистой оболочки бронхов у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой БА фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» и ХОБЛ, Me ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$)

Исследуемый параметр	Контрольная группа (n = 10)	Пациенты с бронхиальной астмой (n = 10)	Пациенты с ХОБЛ (n = 10)
Объемная плотность покровного эпителия, мм ³ /мм ³	0,201 (0,132–0,344)	0,155 (0,044–0,241)*	0,274 (0,162–0,551)*, #
Объемная плотность реснитчатых эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,141 (0,102–0,203)	0,081 (0,022–0,101)*	0,156 (0,121–0,255)*, #
Объемная плотность бокаловидных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,042 (0,031–0,092)	0,021 (0,012–0,061)*	0,023 (0,011–0,081)*
Объемная плотность базальных эпителиоцитов, мм ³ /мм ³	0,028 (0,012–0,043)	0,053 (0,014–0,085)*	0,107 (0,031–0,223)*, #
Относительный объем желез, мм ³ /мм ³	0,271 (0,141–0,622)	0,191 (0,134–0,324)*	0,132 (0,054–0,266)*, #
Относительный объем микрососудов, мм ³ /мм ³	0,047 (0,032–0,075)	0,065 (0,022–0,091)*	0,032 (0,014–0,135)*, #
Относительный объем соединительной ткани, мм ³ /мм ³	0,661 (0,364–0,845)	0,751 (0,632–0,851)*	0,836 (0,602–0,891)*, #
Высота эпителиального пласта, мкм	38,13 (21,82–73,54)	19,32 (17,81–28,91)*	83,92 (65,62–94,84)*, #
Ширина базальной мембраны, мкм	–	16,72 (8,15–29,12)*	6,48 (2,09–9,35)*, #

в собственной пластинке СОБ и сужение просвета сосудов [6]. Это приводит к уменьшению объемной плотности сосудов микроциркуляторного русла, утяжеляет течение ХОБЛ и клинически проявляется в снижении индекса Тиффно (отношение ОФВ₁ к форсированной жизненной емкости легких ФЖЕЛ), что подтверждается в обнаруженной нами отрицательной ассоциации между индексом Тиффно и плотностью макрофагов, экспрессирующих рецепторы к TGF- β_1 ($r = -0,75$; $p = 0,004$).

Согласно данным S. Isajevs, иммунорегуляторное влияние TGF- β_1 осуществляется активацией пула Т-лимфоцитов и возрастанием числа CD8⁺-клеток [7]. У пациентов с тяжелой формой ХОБЛ в бронхиальной стенке нами обнаружено повышение плотности CD8⁺-клеток, локализующихся суб- и интраэпителиально (см. табл. 1). У пациентов с тяжелой формой ХОБЛ цитотоксический эффект проявляется деструктивными процессами в бронхиальной стенке, что в дальнейшем может приводить к развитию плоскоклеточной метаплазии (см. табл. 2). Метаплазия реснитчатого эпителия в многослойный плоский, наблюдаемая нами более чем в 50 % случаев у пациентов с тяжелой формой ХОБЛ, расценивается как пролиферативно-клеточный вариант реорганизации бронхиального эпителия, связанный с истощением структурно-

метаболических резервов клетки и снижением их белок-синтетической функции [4, 7].

Помимо непосредственного цитотоксического действия на клетки бронхиального эпителия, CD8⁺-лимфоциты вырабатывают TNF- α , который усиливает высвобождение IL-8 из макрофагов. Под влиянием данного интерлейкина происходит активация нейтрофильных лейкоцитов, плотность которых была повышена в СОБ у пациентов с тяжелой формой ХОБЛ (см. табл. 1). При тяжелой форме ХОБЛ нейтрофилы участвуют в развитии окислительного стресса, формируют дисбаланс в протеиназно-антипротеиназной системе с последующей структурной перестройкой бронхиальной стенки [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, аллергический тип воспаления, развивающийся в слизистой оболочке бронхов у пациентов с тяжелой терапевтически резистентной формой бронхиальной астмы фенотипа «астма с фиксированной бронхиальной обструкцией», приводит к повышению содержания трансформирующего фактора роста β_1 в клетках бронхиального эпителия с развитием субэпителиального фиброза, утолщения базальной мембраны с более высокими показателями бронхиальной гиперреактивности. В бронхиальной стенке у пациентов с тяжелой формой

ХОБЛ наблюдается повышенная плотность макрофагов, экспрессирующих рецепторы к трансформирующему фактору роста β_1 , что сочетается с выраженным периваскулярным фиброзом, плоскоклеточной метаплазией бронхиального эпителия с более низкими показателями индекса Тиффно (ОФВ₁/ФЖЕЛ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boxall C., Holgate S.T., Davies D.E. et al.* The contribution of transforming growth factor- β_1 and epidermal growth factor signaling to airway remodeling in chronic asthma // *Eur. Respir. J.* 2006. 27. 208–229.

2. *Автандилов Г.Г.* Основы количественной патологической анатомии. М., 2002. 240 с.

3. *Непомнящих Г.И.* Биопсия бронхов: морфогенез общепатологических процессов в легких. М., 2005. 405 с.

4. *Jeffery P.K.* Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004. 1. 176–183.

5. *Козина О.В., Огородова Л.М., Андрушкевич В.В. и др.* Метаболиты оксида азота и их значение в патогенезе бронхиальной астмы // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2008. (6). 34–37.

6. *Wilson J.W., Hii S.* The importance of the airway microvasculature in asthma // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2006. 6. 51–55.

7. *Isajevs S., Taivans I., Strazda G. et al.* Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD // *Eur. Respir. J.* 2009. 33. 61–67.

8. *Gernez Y., Tirouvanziam R., Chanez P. et al.* Neutrophils in chronic inflammatory airway diseases: can we target them and how? // *Eur. Respir. J.* 2010. 35. 467–469.

ROLE OF THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β_1 IN STRUCTURAL CHANGES OF A BRONCHIAL WALL AT DIFFERENT VARIANTS OF INFLAMMATION IN BRONCHIA

Elena Andreevna GERENG, Irina Vladimirovna SUKHODOLO, Raisa Ivanovna PLESHKO, Lyudmila Mikhailovna OGORODOVA, Ivan Vasilevich MILTO, Ekaterina Borisovna BUKREEVA, Olga Sergeevna KOPYAKOVA, Polina Aleksandrovna SELIVANOVA, Ivan Sergeevich KREMIS

Siberian State Medical University, 634050, Tomsk, Moskovsky tract, 2

The research aim was the evaluation of transforming factor of growth β_1 influence on development of structural changes in mucous membrane of bronchial tubes at severe form of bronchial asthma and chronic obstructive lung disease. It has been determined by means of histological, immunohistological and morphometric methods, that the increase of level of the transforming factor of growth β_1 in cells of bronchial epithelium with subepithelial fibrosis and thickening of basilar membranes were revealed at patients with severe therapeutecally resistant form of bronchial asthma of the phenotype «the asthma with the fixed bronchial obstruction», while the raised density of macrophages exposing receptors to the transforming growth factor β_1 was found at patients with chronic obstructive lung disease, that is combined with expressed perivascular fibrosis, squamous metaplasia of bronchial epithelium.

Keywords: transforming growth factor β_1 , bronchial wall fibrosis, inflammation of the respiratory system.

Gereng E.A. – candidate of medical sciences, senior researcher, assistant professor of the chair for morphology, e-mail: e-gereng@mail.ru

Sukhodolo I.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for morphology, e-mail: suhodolo@sibmail.com

Pleshko R.I. – doctor of medical sciences, professor of the chair for morphology, e-mail: raisaP57@mail.ru

Ogorodova L.M. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, honored worker of science, head of the chair of faculty pediatrics with the course of children diseases, e-mail: lm-ogorodova@mail.ru

Milto I.V. – candidate of biological sciences, assistant professor of the chair for morphology, e-mail: milto_bio@mail.ru

Bukreeva E.B. – doctor of medical sciences, professor of the chair for internal diseases of pediatric faculty, e-mail: e-bukreeva@mail.ru

Kobyakova O.S. – doctor of medical sciences, head of the chair for general and medical practice (family medicine), e-mail: olga_kobyakova@rambler.ru

Selivanova P.A. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for hospital therapy with the course of physical rehabilitation and sports medicine, e-mail: p_selivanova@mail.ru

Kremis I.S. – doctor of pulmonological department, e-mail: kremanton@yandex.ru

АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У КОРЕННЫХ ЖИТЕЛЕЙ ЧУКОТКИ

Лариса Александровна ГЫРГОЛЬКАУ, Юрий Петрович НИКИТИН,

Лилия Валерьевна ЩЕРБАКОВА

ФГБУ НИИ терапии СО РАМН

630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

В экспедиционных условиях проведено одномоментное эпидемиологическое (кросс-секционное) обследование коренных жителей Чукотки (675 человек) в возрасте 25–64 лет. Средние антропометрические показатели составили: индекс массы тела – 25 кг/м², окружность талии – 84 см, избыточная масса тела – 26 %, ожирение: I ст. – 8,7 %, II ст. – 3 %, III ст. – 1,5 %. Выявлена прямая связь антропометрических данных с частотой повышения артериального давления, дислипидемии и обратная – с частотой табакокурения.

Ключевые слова: индекс массы тела, объем талии, объем бедер, отношение объема талии к объему бедер, ожирение, коренные жители Чукотки.

Глобальные изменения индекса массы тела (ИМТ) во всем мире начались с 1980 г. В период с 1980 по 2008 г. он увеличился на 0,4 кг/м²; у женщин ИМТ самым низким был в Бангладеш (20,5 кг/м²), у мужчин – в Республике Конго (19,9 кг/м²). Наиболее высокий индекс массы тела отмечен в США, что связано с высоким уровнем дохода жителей страны [1]. На Севере у финнов возрастание ИМТ было небольшим (+1,2 %), средняя окружность талии у мужчин увеличилась на 2,7 см, у женщин – на 4,3 см [2]. По данным Nuxley R. et al. [3], общее ожирение (по ИМТ) и абдоминальное ожирение (по объему талии, отношению объема талии к объему бедер) связано с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета. Такие показатели, как ОТ и ОТ/ОБ, в большей степени коррелируют с кардиальной патологией даже у женщин с нормальной массой тела [4].

Частота абдоминального ожирения и индекса массы тела варьируют у разных этносов и групп населения. Предложены оптимальные пороговые величины, которые могут применяться во всем мире [5]. В приполярном регионе произошли существенные изменения в образе жизни, произошедшие с 1950-х годов [6]. Среди коренных народов снижаются зависимость от охоты и рыболовства и физическая активность, происходит переход на вестернизацию от традиционной диеты. Таким образом, взаимодействие генетических факторов с образом жизни оказы-

вает существенное влияние на распространенность ожирения, сахарного диабета, сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска.

Целью настоящего исследования явилось изучение средних антропометрических показателей и распространенности избыточной массы тела и ожирения у коренных жителей Чукотки обоего пола в возрасте 25–64 лет и их ассоциации с основными неконвенционными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспедиционных условиях нами было проведено одномоментное эпидемиологическое исследование (кросс-секционное) коренных жителей Чукотского автономного округа по оценке распространенности факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Всего обследовано 675 человек (279 мужчин и 396 женщин) в возрасте от 25 до 64 лет, средний возраст составил 41,0 ± 0,59 года – у мужчин и 41,8 ± 0,50 года – у женщин.

Рост измеряли с помощью вертикального ростомера в положении стоя без обуви с точностью до 0,5 см. Для определения массы тела использовали выверенные рычажные медицинские весы, прошедшие метрологический контроль. Вес регистрировали с точностью до 100 граммов. Для дальнейшего анализа рассчитыва-

Гырголькау Л.А. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: l.gyrgolkay@iimed.ru

Никитин Ю.П. – д.м.н., проф., академик РАМН, зав. лабораторией этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний, e-mail: yu.p.nikitin@gmail.com

Щербакова Л.В. – старший научный сотрудник, e-mail: sherbakova@iimed.ru

ли индекс массы тела (ИМТ) по формуле: масса тела (кг) / рост (м²).

Окружность талии (ОТ) измеряли ниже грудной клетки над пупком, где ее величина минимальна; окружность бедер (ОБ) – на уровне ягодиц, учитывая наибольшие значения. Характер распределения жировой ткани оценивали по отношению (индексу) ОТ к ОБ. Категории индекса массы тела выделяли по критериям ВОЗ (1998) [7]: пониженная масса тела – $\leq 18,5$ кг/м², нормальная масса тела – $18,5–24,9$ кг/м², избыточная масса тела (И₃₆МТ) – $25,0–29,9$ кг/м², ожирение I ст. – $30,0–34,9$ кг/м², ожирение II ст. – $35,0–39,9$ кг/м² и выраженное ожирение – $> 40,0$ кг/м²; отдельно выявляли ожирение: по ИМТ по критериям ВОЗ 1998 г. (ИМТ_{WHO}: ИМТ $\geq 30,0$ кг/м²), по окружности талии по критериям NCEP АТР III 2005 г. [8] (ОТ_{NCEP}: у мужчин ОТ $\geq 90,0$ см, у женщин ОТ $\geq 80,0$ см), по индексу ОТ/ОБ по критериям ВОЗ 1998 г. (ОТ/ОБ_{WHO}: у мужчин $\geq 0,90$ см, у женщин $\geq 0,85$).

Факторы риска определяли следующие: артериальная гипертензия (АД $\geq 140/90$ мм рт. ст.), дислипотеидемии (по NCEP АТР III 2001 г.): гиперхолестеринемия (содержание общего холестерина $> 6,2$ ммоль/л), гиперхолестеринемия липопротеидов низкой плотности (гипер-ХС-ЛПНП: содержание ХС-ЛПНП $> 4,9$ ммоль/л), гипохолестеринемия липопротеидов высокой плотности (гипо-ХС-ЛПВП: содержание ХС-ЛПВП $< 1,0$ ммоль/л).

При выполнении статистического анализа проводили проверку распределения признаков на нормальность (тест Колмогорова–Смирнова), в зависимости от результата различия между группами оценивали параметрическими (критерий Стьюдента) и непараметрическими (тест Манна–Уитни) методами, долевое различие определяли с помощью критерия χ^2 . При межгрупповом сравнении антропометрических показателей использовали стандартизованные по возрасту (GLM-модель) показатели.

Обследованные коренные жители Чукотки были подразделены на четыре десятилетние возрастные группы (25–34, 35–44, 45–54, 55–64 лет).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У коренных жителей Чукотки выявлены следующие средние значения изучаемых антропометрических показателей (данные стандартизованы по возрасту): ИМТ $24,9 \pm 0,2$ кг/м² (95 % доверительный интервал ДИ $24,5–25,3$); ОТ $83,7 \pm 0,5$ см (ДИ $82,7–84,7$); ОБ $99,9 \pm 0,4$ см (ДИ $99,2–100,7$); индекс ОТ/ОБ $0,84 \pm 0,01$ см

(ДИ $0,83–0,84$). Обнаружены гендерные различия по ИМТ, ОБ и индексу ОТ/ОБ ($p < 0,001$) (рис. 1).

Полученные величины ИМТ у коренных жителей Чукотки не отличаются от обнаруженных при ранее выполненных на Чукотке исследованиях: у эскимосов и чукчей она составляла в среднем $23,8$ кг/м² [9], в популяционных исследованиях, выполненных Т.И. Астаховой [10] на мужчинах в возрасте 30–59 лет, ИМТ составил в среднем $22,3$ кг/м². Наши антропометрические данные у коренных жителей Чукотки по гендерным различиям такие же, как у инуитов Канады, Аляски и Гренландии [11–13] и жителей г. Новосибирска [14].

Распространенность критериев ИМТ [15] у коренных жителей Чукотки получена нами следующей: пониженная масса тела – 2,2 % случаев, у мужчин реже, чем у женщин (0,7 и 3,3 % соответственно, $p < 0,05$), нормальная масса тела – 59 %, у мужчин чаще, чем у женщин (71 и 50 % соответственно, $p < 0,0001$), избыточная масса тела – 26 % (23 % мужчин и 28 % женщин соответственно, $p > 0,05$), ожирение I ст. – 8,7 %, у мужчин реже, чем у женщин (4 и 13 % соответственно, $p < 0,001$); ожирение II ст. – 3 %, у мужчин реже, чем у женщин (1,4 и 4 % соответственно, $p < 0,05$), и выраженное ожирение – 1,5 % (0 % – у мужчин, 2,5 % – у женщин).

По критериям ИМТ жителей Чукотки можно сравнить с перуанцами, среди которых пониженная масса тела у мужчин встречается в 0,8 % случаев, у женщин – 1,8 %, нормальная – в 42,2 и 38,7 %, избыточная – в 35,6 и 43,6 %, ожирение – в 21,3 и 15,9 % соответственно [16]. У малазийских жителей (оба пола) соответствующие показатели следующие: 1,7, 35,7, 43,5 и 19,1 % [17], в Норвегии у саамов – 0,5, 24,4, 52,9 и 22,2 % у мужчин, 0,4, 33,5, 39,0 и 27,1 %

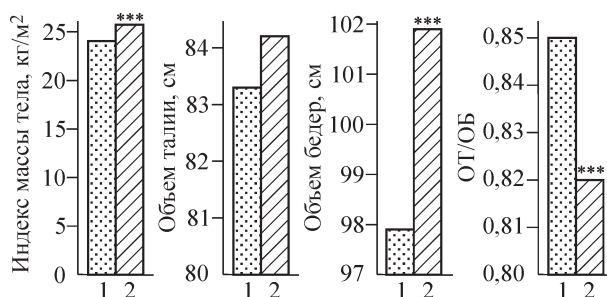


Рис. 1. Средние антропометрические показатели у мужчин (1) и женщин (2) коренных жителей Чукотки. Данные стандартизованы по возрасту; *** – отличие от величины соответствующего показателя у женщин статистически значимо при $p < 0,0001$

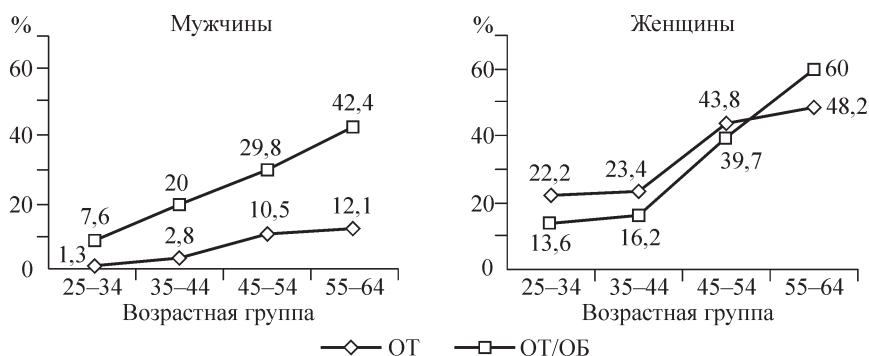


Рис. 2. Частота ожирения по OT_{NCEP} и индексу OT/OB_{WHO} в зависимости от возраста у коренных жителей Чукотки

у женщин; у финнов – 0,5, 24,1, 57,3, 18,2 % у мужчин, 0,4, 34,4, 39,6 и 25,6 % у женщин [18].

Частота ожирения по ИМТ_{WHO} у коренных жителей Чукотки составила 13 %, у мужчин ниже, чем у женщин (5 и 19 % соответственно, $p < 0,0001$); частота ожирения по окружности талии (OT_{NCEP}) – 21 %, по индексу OT/OB (OT/OB_{WHO}) – 25 %, у мужчин оба показателя ниже, чем у женщин (соответственно 5 и 32 %, $p < 0,0001$, 21 и 28 %, $p > 0,05$).

Ранее на Чукотке, по данным Т.И. Астаховой [10], ожирение у мужчин встречалось с частотой 7,4 %, $I_{30}MT$ – 16 %, ожирение I ст. – 13 %, II ст. – 2 %, III ст. – 0,7 %, IV ст. – 0 %, что совпадает с нашими данными. Среди инуитов Гренландии нормальной массой тела обладают 67,2 % мужчин и 76,5 % женщин, $I_{30}MT$ – 19,3 и 13,2 % соответственно; ожирение обнаружено у 13,4 % мужчин и 10,3 % женщин [19]. В Норвегии у лиц обоего пола $I_{30}MT$ была равна 57,6 % и ожирение – 21,5 % [20]. В Европе по исследованию ВОЗ MONICA $I_{30}MT$ встречается у 61,1 % мужчин и у 33,0 % женщин, ожирение по OT_{NCEP} – у 19,5 и 31,3 % соответственно [21].

С возрастом частота ожирения (ИМТ_{WHO}) у коренных жителей Чукотки имеет тенденцию к увеличению (10, 14, 15 и 15 % соответственно по десятилетиям, $p > 0,05$), частота ожирения по показателям OT_{NCEP} и OT/OB_{WHO} растет, достигая максимума к 55–64 годам. Частота ожирения по уровню OT_{NCEP} и OT/OB_{NCEP} у женщин повышается, достигая достоверной разницы между 3 и 4 десятилетиями ($p = 0,01$ и $p = 0,001$ соответственно), у мужчин достоверная разница по уровню OT_{NCEP} получена между 1 и 2 десятилетиями ($p < 0,05$) (рис. 2).

Таким образом, у мужчин Чукотки жировой ткани меньше, чем у женщин (по индексу массы тела), такая картина наблюдается во всех возрастных группах, по OT и OB у мужчин

выражено более централизованное распределение жира, а у женщин – периферическое распределение, что подтверждают и литературные источники [22]. Объем талии с возрастом претерпевает большие изменения, что показывают данные исследования NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), причем максимальные – в более пожилом возрасте [2, 23].

В нашем исследовании выявлена достоверная корреляционная связь между антропометрическими показателями (ИМТ, OT , OB и OT/OB) и уровнями артериального давления, наибольшая зависимость отмечена между объемом талии и систолическим ($r = 0,32$), диастолическим ($r = 0,29$), пульсовым артериальным давлением ($r = 0,22$); объемом талии и содержанием общего холестерина ($r = 0,12$), ХС-ЛПНП ($r = 0,16$), ХС-ЛПВП ($r = -0,09$); ИМТ с количеством выкуриваемых сигарет ($r = -0,12$).

При анализе частоты факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у коренных жителей Чукотки [24] у мужчин выявлена наибольшая частота артериальной гипертензии (46,2 %) в группе с ожирением по ИМТ_{WHO}, у женщин – гиперхолестеринемии (32,9 %) с ожирением по OT/OB_{WHO} , у мужчин чаще всего встречались гипер-ХС-ЛПНП (в 18,2 % случаев) и гипо-ХС-ЛВП (18,5 %) с ожирением по ИМТ_{WHO} (см. таблицу). У мужчин Чукотки среднее количество выкуриваемых сигарет было ниже у лиц с ожирением по сравнению с лицами без ожирения по OT_{NCEP} ($6,0 \pm 1,8$ и $11,8 \pm 0,5$ соответственно, $p = 0,035$) и по OT/OB_{WHO} ($8,2 \pm 0,8$ и $12,5 \pm 0,6$ соответственно, $p = 0,001$).

Таким образом, у коренных жителей Чукотки выявлена прямая зависимость между антропометрическими показателями и уровнями артериального давления, липидов крови, при этом более сильная корреляционная связь OT оказалась с артериальным давлением, OB – с содержанием липидов, ИМТ – с количеством

Таблица

Частота ожирения в зависимости от факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний

Пол	Фактор риска	Параметр ожирения	Ожирение (–)		Ожирение (+)		p
			n	%	n	%	
Мужчины	Артериальная гипертензия	ОТ _{NCEP}	34	15,3	5	38,5	0,029
		ИМТ _{WHO}	51	19,4	6	46,2	0,020
Женщины	Гиперхолестеринемия	ОТ _{NCEP}	30	14,9	26	27,7	0,010
		ОТ/ОБ _{WHO}	30	13,9	26	32,9	0,001
		ИМТ _{WHO}	44	15,4	18	27,3	0,038
Оба пола	Гиперхолестеринемия	ОТ _{NCEP}	50	12,4	28	26,4	0,001
		ОТ/ОБ _{WHO}	47	12,3	31	25,0	0,001
		ИМТ _{WHO}	73	14,0	20	26,0	0,018
Мужчины	Гипер-ХС-ЛПНП	ИМТ _{WHO}	7	3,0	2	18,2	0,041
Женщины	Гипер-ХС-ЛПНП	ОТ _{NCEP}	6	3,0	12	13,0	0,003
		ОТ/ОБ _{WHO}	6	2,8	12	15,6	0,000
		ИМТ _{WHO}	11	3,9	8	12,3	0,038
Оба пола	Гипер-ХС-ЛПНП	ОТ _{NCEP}	13	3,3	13	12,5	0,001
		ОТ/ОБ _{WHO}	12	3,1	14	11,5	0,000
		ИМТ _{WHO}	18	3,5	10	13,2	0,003
Женщины	Гипо-ХС-ЛПВП	ИМТ _{WHO}	26	9,2	12	18,5	0,005

выкуриваемых сигарет. Наибольшая частота артериальной гипертензии встречалась среди лиц с ожирением по ИМТ_{WHO}; наибольшая частота гиперхолестеринемии, гипер-ХС-ЛПНП – с ожирением по ОТ/ОБ_{WHO}; наибольшая частота гипер-ХС-ЛПНП – у мужчин с ожирением по ИМТ_{WHO}, а частота гипо-ХС-ЛПВП – у женщин с ожирением по ИМТ_{WHO}.

ВЫВОДЫ

1. У коренных жителей Чукотки обоего пола в возрасте 25–64 лет антропометрические показатели составили в среднем: ИМТ – 25 кг/м², ОТ – 84 см, ОБ – 100 см, индекс ОТ/ОБ – 0,84; частота критериев ИМТ по критериям ВОЗ (1998) у коренных жителей Чукотки была следующей: пониженная масса тела – 2,2 %, нормальная масса тела – 59 %, избыточная масса тела – 26 %, ожирение I ст. – 8,7 %, ожирение II ст. – 3 %, выраженное ожирение – 1,5 %.

2. Частота ожирения составила по ИМТ_{WHO} 13 %, по индексам ОТ_{NCEP} и ОТ/ОБ_{WHO} – 21 и 25 % соответственно, с возрастом наибольший прирост частоты ожирения наблюдается по критерию объема талии (ОТ_{NCEP}).

3. Выявлена прямая корреляционная связь между антропометрическими данными и уровнями артериального давления, липидов крови и количеством выкуриваемых сигарет, чем больше частота ожирения, тем чаще встречается артериальная гипертензия, дислипотеинемия и реже – табакокурение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finucane M.M., Stevens G.A., Cowan M.J. et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9,1 million participants // Lancet. 2011. 377. (9765). 557–67.
2. Lahti-Koski M., Harald K., Mannisto S. et al. Fifteen-year changes in body mass index and waist circumference in Finnish adults // Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. 2007. 14. (3). 398–404.
3. Huxley R., Mendis S., Zheleznyakov E. et al. Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio as predictors of cardiovascular risk – a review of the literature // European Journal of Clinical Nutrition. 2010. 64(1). 16–22.
4. Hu F.B. Obesity and mortality: watch your waist, not just your weight // Arch. Intern. Med. 2007. (167). 875–876.
5. Qiao Q., Nyamdorj R. Is the association of type II diabetes with waist circumference or waist-to-hip ratio stronger than that with body mass index? // Eur. J. Clin. Nutr. 2010. 64. (1). 30–34.
6. Health transitions in Arctic populations / Eds. T.K. Young, P. Bjerregaard. Toronto; Buffalo; London: University of Toronto Press Inc., 2008. 485 p.
7. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report on a WHO Consultation on Obesity, Geneva, 3–5 June. 1997, 1998. 178 p.
8. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Ex-

pert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) // JAMA. 2001. 285. (19). 2486–97.

9. Клевцова Н.И. Особенности строения тела коренного населения Чукотского полуострова // На стыке Чукотки и Аляски / Отв. ред. В.П. Алексеев. М.: Наука, 1983. 120–133.

10. Астахова Т.И. Распространенность основных факторов риска ИБС среди мужчин в Чукотском автономном округе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1986.

11. Young T.K. Obesity, central fat patterning, and their metabolic correlates among the Inuit of the central Canadian Arctic // Hum. Biol. 1996. 68. (2). 245–263.

12. Boyer B.B., Mohatt G.V., Plaetke R. et al. Metabolic syndrome in yup'ik eskimos: the central for Alaska native health research (CANHR) study // Obesity. 2007. 15. (11). 2535–2540.

13. Jørgensen M.E., Glümer C., Bjerregaard P. et al. Obesity and central fat pattern among Greenland Inuit and a general population of Denmark (Inter99): relationship to metabolic risk factors // Int. J. Obes. 2003. 27. 1507–1515.

14. Симонова Г.И., Мустафина С.В., Печенкина Е.А. Распространенность метаболического синдрома в Сибири: популяционное исследование в г. Новосибирске // Бюл. СО РАМН. 2011. (5). 100–106.

15. Waist Circumference and Waist-Hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation. Geneva, 8–11 December, 2008.

16. Knowles K.M., Paiva L.L., Sanchez S.E. et al. Waist circumference, body mass index, and other measures of adiposity in predicting cardiovascular disease risk factors among Peruvian adults // Int. J. Hypertens. 2011. 29. 1–10.

17. Amplavanar N.T., Curpreet K., Salmiah M.S. et al. Prevalence of cardiovascular disease risk factors among attendees of the Batu 9, Cheras Health centre, Selangor, Malaysia // Med. J. Malaysia. 2010. 65. (3). 166–172.

18. Nystad T., Utsi E., Selmer R. et al. Distribution of ApoB/ApoA-1 ratio and blood lipids in sami, kven and norwegian populations: the Saminor study // Int. J. Circumpolar Health. 2008. 67. (1). 69–83.

19. Bjerregaard P., Mulvad G., Pedersen H.S. Cardiovascular risk factors in Inuit of Greenland // Int. J. Epidemiol. 1997. 67. (6). 1182–1190.

20. WHO, NCD Country Profiles, 2011.

21. Qiao Q. Comparison of different definitions of the metabolic syndrome in relation to cardiovascular mortality in European men and women // Diabetologia. 2006. 49. 2837–2846.

22. Wells J.C. Sexual dimorphism of body composition // Best Prac. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2007. 21. (3). 415–430.

23. Ford E.S., Mokdad A.H., Giles W.H. Trends in waist circumference among U.S. adults // Obes. Res. 2003. 11.(10). 1223–1231.

24. Гырголькау Л.А., Щербаква Л.В., Иванова М.В. Уровни липидов крови и частота дислипидемий у коренных жителей Чукотки // Бюл. СО РАМН. 2011. (5). 79–83.

ANTHROPOMETRIC MEASURES AT THE NATIVE PEOPLE OF CHUKOTKA

Larisa Aleksandrovna GYRGOLKAU, Yurii Petrovich NIKITIN, Liliya Valerjevna SHCHERBAKOVA

*Institute of Internal Medicine SB RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

The single-stage epidemiological (cross-sectional) study of the indigenous inhabitants of Chukotka (675 men) aged 25–64 years has been carried out. Mean of anthropometric measures were: body mass index – 25 kg/m², waist circumference – 84 cm, and overweight – 26 %, obesity class I – 8.7 %, obese class II – 3 %, obese class III – 1.5 %. The direct relationship between anthropometric data and the frequency of blood pressure, dyslipidemia, and the reverse relationship between anthropometric data and the frequency of smoking have been revealed.

Key words: body mass index, waist, hips, the ratio of waist to hip size, obesity, indigenous people, Chukotka.

Gyrgolkau L.A. – candidate of medical sciences, senior researcher, e-mail: l.gyrgolkay@iimed.ru

Nikitin Yu.P. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, head of the laboratory for ethiopathogenesis and internal diseases clinic, e-mail: yu.p.nikitin@gmail.com

Shcherbakova L.V. – senior researcher, e-mail: sherbakova@iimed.ru

МЕХАНИЗМЫ КОРРЕКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ: ДАнные ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ

Алёна Ивановна ИНЖУТОВА¹, Светлана Анатольевна ФИЛИППОВА²,
Алексей Анатольевич ЛАРИОНОВ³, Виктория Владимировна БЫКОВА¹,
Татьяна Васильевна НОВИКОВА¹, Татьяна Павловна ОРЛОВА¹,
Ирина Георгиевна ИНЖУТОВА², Марина Михайловна ПЕТРОВА³,
Алла Борисовна САЛМИНА¹

¹ НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздравоохранения России 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

² Лечебно-оздоровительный центр г. Красноярск 660135, г. Красноярск, ул. Воронова, 39Б

³ Кафедра поликлинической терапии с курсом семейной медицины и ЗОЖ ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздравоохранения России 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Изучены молекулярные механизмы улучшения функционального состояния эндотелиальных клеток на примере применения триметазидина у пациентов с артериальной гипертензией и подтверждены *in vitro* моделированием эндотелиальной дисфункции на культуре клеток HUVEC. Выявлено, что назначение триметазидина способствует усилению продукции VEGF и синтеза ERK, нормализации внутриклеточного содержания кальция и свободных радикалов в эндотелиоцитах. Перечисленные молекулярно-клеточные изменения приводят к снижению апоптоза эндотелиоцитов, усилению их функциональной активности и клеточного роста, что сопровождается уменьшением образования клеточных мембранных микрочастиц. Последние, по-видимому, играют ключевую роль не только в развитии эндотелиальной дисфункции, являясь паракринными регуляторами, но и способствуют клеточной выживаемости за счет «сброса» переизбытка сигнальных протеинов эндотелиальными клетками.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, эндотелиальная дисфункция, патогенез, терапия, клеточные мембранные микрочастицы, HUVEC, триметазидин.

В патогенезе развития гипертонической болезни ключевое место занимает эндотелиальная дисфункция, проявляющаяся снижением выработки эндотелием оксида азота и увеличением продукции эндотелина-1, повышением экспрессии рецепторов к катехоламинам и ангиотензину II [1]. Вместе с усилением вазоконстрикции, нарушением вазодилатации и ремоделированием

сосудов активизируется синтез эндотелиоцитами факторов межклеточной адгезии и фактора фон Виллебранда [2]. В результате формируется воспаление сосудистой стенки, нарушается ее проницаемость, образуются пристеночные тромбы, атеросклеротические бляшки, и, наконец, кальциноз и фиброз сосудов снижает их эластичность [3]. Своевременная диагностика и

Инжутова А.И. – к.м.н., старший научный сотрудник

Филиппова С.А. – врач функциональной диагностики, e-mail: filsvet@mail.ru

Ларионов А.А. – клинический ординатор кафедры поликлинической терапии и семейной медицины с курсом ЗОЖ, e-mail: adpersonamalexylarionov@gmail.com

Быкова В.В. – студентка, e-mail: kgma21@mail.ru

Новикова Т.В. – студентка, e-mail: tatiana_novik@mail.ru

Орлова Т.П. – студентка, e-mail: tanush7@mail.ru

Инжутова И.Г. – к.м.н., главный врач, e-mail: irinainzhutova@gmail.com

Петрова М.М. – д.м.н., проф., зав. кафедрой поликлинической терапии и семейной медицины с курсом ЗОЖ, e-mail: stk99@yandex.ru

Салмина А.Б. – д.м.н., проф., руководитель НИИ, e-mail: allasalmina@mail.ru

коррекция эндотелиальной дисфункции – современная стратегия терапии сердечно-сосудистых заболеваний, преследующая цель профилактики и терапии как кардиоваскулярной патологии, так и ее осложнений [4].

Изучение молекулярных механизмов развития дисфункции эндотелия является залогом выявления патогенетических мишеней для медикаментозного улучшения функции эндотелия. Локализация эндотелиальных клеток в интима сосудов не позволяет провести полноценный прижизненный анализ внутриклеточного состава сигнальных молекул и протеинов, участвующих в регуляции клеточного цикла и функциональной активности. Решение проблемы находится в создании экспериментальных условий для физиологического и патологического функционирования клеток *in vitro* [5, 6]. Моделирование дисфункции эндотелия в культуре клеток эндотелиоцитов обладает несколькими преимуществами: позволяет изменять степень дисфункции эндотелия, контролировать биохимический состав на любом этапе, изучать эндотелиоциты в отсутствие воздействия других клеток сосудистой стенки и крови, а при необходимости и совместно с ними.

Одним из признаков изменения функционального состояния клетки является выпячивание наружной цитоплазматической мембраны (блеббинг), которое нередко заканчивается образованием клеточных мембранных микрочастиц [7]. Мембранные микрочастицы, образуемые клетками при активации и апоптозе, связанными с извращением мембранного состава протеинов и фосфолипидов мембраны клетки, представляют собой потенциальный маркер дисфункции эндотелия и мишень терапевтического воздействия [8]. Клеточные мембранные микрочастицы имеют размер менее 1,0 мкм, способны проникать через межклеточные щели и, путем пиноцитоза, – внутрь клетки [9]. Состав мембранных микрочастиц зависит от клетки-родительницы, т. е. клеточные мембранные микрочастицы несут те же рецепторы и содержат те же биологически активные вещества, что позволяет им включаться в каскад сигнальных путей в клетках-мишенях. Последнее обуславливает не только их диагностическую, но и патогенетическую значимость [10]. Поиск эффективных лекарственных средств, оказывающих влияние на новые мишени патогенеза эндотелиальной дисфункции, – это перспективное направление оптимизации эффективности медикаментозной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Установление механизмов, лежащих в основе улучшения функции эндотелия, будет способ-

ствовать разработке новых лекарственных препаратов сосудистой терапии.

Работа выполнена с целью получить ответы на следующие вопросы: 1) являются ли клеточные мембранные микрочастицы и внутриклеточные биологически активные вещества (кальций и свободные радикалы) перспективной молекулярной мишенью для медикаментозной терапии эндотелиальной дисфункции; 2) можно ли экстраполировать данные лабораторных исследований *in vitro* на пациентов с гипертонической болезнью.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование включало в себя два этапа: I – клинический анализ распространенности эндотелиальной дисфункции у пациентов с гипертонической болезнью и эффективность ее коррекции триметазидином МВ, II – лабораторное моделирование эндотелиальной дисфункции *in vitro* с оценкой влияния триметазидина на функцию эндотелиальных клеток. Работа выполнена с соблюдением «Этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека» Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации» и с информированного согласия обследуемых.

В исследовании приняли участие 90 пациентов обоего пола в возрасте 40–60 лет, находящиеся в медицинских учреждениях г. Красноярск с диагнозом гипертоническая болезнь II стадии. Критерии исключения: сосудистые катастрофы на момент включения и в анамнезе, острые и хронические воспалительные заболевания, патология крови, онкология, иммунодефицитные и аллергические состояния. Контрольную группу составили 30 человек соответствующего возрастного-полового состава, не страдающие сердечно-сосудистыми заболеваниями и также не имеющие признаков из списка исключения.

Всем пациентам были проведены общеклинические исследования, ЭКГ, эхокардиография, мониторинг артериального давления, ультразвуковая диагностика («манжеточная проба») диаметра плечевой артерии [11] как общепризнанного маркера дисфункции эндотелия. Забор образца периферической крови в объеме 5 мл был осуществлен на 1-е и 60-е сутки терапии триметазидином МВ (предуктал МВ, Сервье, Франция) для исследования биохимических (sPECAM-1, VEGF-A) и клеточных (циркулирующие апоптотические эндотелиоциты, циркулирующие клеточные мембранные микрочастицы) маркеров эндотелиальной дисфункции.

Для экспериментов *in vitro* была использована культура клеток HUVEC (эндотелиальные

клетки пуповинной вены человека) из расчета 1 млн клеток на культуральный флакон. Моделирование эндотелиальной дисфункции проводилось физической гипоксией (инкубация при 37 °С в течение 24 ч при содержании O₂ менее 2 %, в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, 10 % H₂, 85 % N₂) [12, 13] и добавлением в обогащенную питательную среду EBM 10 нг/мл TNF-α [14]. Для одного и того же пассажа HUVEC в параллельных флаконах была добавлена автоклавированная дистиллированная вода или триметазидин (Sigma-Aldrich, США, 500 мкМ, 5,0 мкг/мл) [15, 16] соответственно. Эндотелиальная дисфункция была оценена биохимическими тестами на содержание в питательной среде VEGF [17], тестом «раневого дефекта» [18], подсчетом апоптотических аннексин-положительных эндотелиальных клеток.

Образцы периферической крови пациента и экспериментальный материал были изучены на содержание клеточных мембранных микрочастиц эндотелиального происхождения (CD62E⁺), аннексин-положительных эндотелиальных клеток, определен уровень свободных радикалов и концентрация внутриклеточного кальция (Ca²⁺) в эндотелиоцитах до и после влияния триметазидина MB. Циркулирующие эндотелиоциты, циркулирующие клеточные мембранные микрочастицы и экспериментальные образцы были исследованы на содержание митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) p38, JNK, ERK.

Выделение эндотелиоцитов из периферической крови осуществляли по методу Iwata et al. [19], циркулирующих клеточных мембранных микрочастиц – методом Pirro et al. [20]. Для иммуноцитохимии использован набор Annexin detection kit (Bender MedSystem, Австрия, стандартный протокол), меченные фикоэритрином анти-CD62E антитела (Abscam, Великобритания). Иммуноферментный анализ проведен с применением анти-VEGF-A и анти-SPECAM-1 ELISA kit (Invitrogen, Бельгия). Вестерн-блоттинг осуществлен по стандартному протоколу с использованием антител к p38 (Cell Signaling Technology, США; разведение 1:1000), JNK (Cell Signaling Technology; разведение 1:1000), ERK (Cell Signaling Technology; разведение 1:1000).

Иммуногистохимические параметры оценивали с помощью микроскопа Olympus IX81 (США), концентрацию свободных радикалов и кальция – на счетчике Wallac Victor-2 (PerkinElmer, США) с использованием соответственно дигидроэтидия (Sigma-Aldrich, стандартный протокол) и FLUO4-AM (Invitrogen, стандартный протокол).

При выполнении статистической обработки полученных результатов применяли дисперсионный анализ с использованием критерия Колмогорова–Смирнова, теста Манна–Уитни, теста Ньюмена–Кейлса, парного *t*-теста. Статистически достоверным считалось значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение образцов крови больных артериальной гипертонией до приема триметазидина и после двух месяцев его приема показало значительное уменьшение дисфункции эндотелия, что проявлялось снижением количества циркулирующих апоптотических эндотелиоцитов, циркулирующих клеточных мембранных микрочастиц эндотелиального происхождения, уровня sPECAM-1 (табл. 1). Данные подтверждены «манжеточной пробой», диагностировавшей увеличение прироста диаметра плечевой артерии на реактивную гиперемии и на пробу с нитроглицерином на 28,6 и 48,9 % соответственно по сравнению с исходным приростом изучаемых параметров у этих же пациентов до приема триметазидина MB. Нормальным считается прирост диаметра плечевой артерии на 10 % и более от исходного при пробе с реактивной гиперемией и 20 % и более при пробе с нитроглицерином.

У пациентов с гипертонической болезнью исходно содержание VEGF было в 12 раз выше ($p < 0,001$), чем в контрольной группе, а на фоне приема триметазидина повысилось по отношению к исходной концентрации в 1,5 раза ($p < 0,05$) (см. табл. 1). На фоне артериальной гипертонии в эндотелиоцитах содержание кальция и свободных радикалов превышало показатели в контрольной группе соответственно в 1,6 ($p < 0,001$) и 2,9 ($p < 0,001$) раза. Назначение триметазидина привело к снижению содержания внутриклеточного кальция (на 21,0 %, $p < 0,01$) и концентрации свободных радикалов (на 55,1 %, $p < 0,001$) в эндотелиоцитах по сравнению с группой без триметазидина.

Эксперимент *in vitro* (табл. 2) с моделированием эндотелиальной дисфункции, приближенным к физиологическим условиям, путем воздействия физической гипоксии и стимуляции эндотелиальных клеток TNF-α подтвердил результаты, полученные *in vivo*, и показал, что в модели эндотелиальной дисфункции возрастают интенсивность апоптоза (в 7,72 раза, $p < 0,01$), образование клеточных мембранных микрочастиц (на 75,3 %, $p < 0,01$), концентрация VEGF в питательной среде (в 2,02 раза, $p < 0,01$) по сравнению с HUVEC, культивируемыми в

Таблица 1

Характеристика параметров функциональной активности эндотелия у пациентов с артериальной гипертензией и у лиц контрольной группы

Показатель	Гипертоническая болезнь (n = 90)		Контрольная группа (n = 30)
	До приема триметазидина	Через 60 дней после приема триметазидина	
Количество апоптотических эндотелиоцитов, %	2,5 ± 0,2*	0,3 ± 0,2	0,8 ± 0,5
Количество клеточных мембранных микрочастиц, шт./мкл	671,8 ± 7,2**	256,2 ± 2,2*	100,6 ± 1,9
Содержание sPЕСАМ-1, нг/мл	6,60 ± 1,90*	3,80 ± 0,80*	0,23 ± 0,03
Содержание VEGF-A, пг/мл	29,94 ± 7,03***	46,21 ± 11,63***	2,31 ± 2,07
Содержание Ca ²⁺ (коэффициент флуоресценции × 10 ⁵)	3,52 ± 0,45***	2,76 ± 0,65	2,24 ± 0,04
Содержание свободных радикалов (коэффициент флуоресценции × 10 ⁵)	85,78 ± 10,26***	38,43 ± 12,16	28,87 ± 0,84
Манжеточная проба:			
диаметр плечевой артерии	3,72 ± 0,6*	4,32 ± 0,03	4,9 ± 0,4
% PГ	6,0 ± 2,1***	8,4 ± 0,3**	15,8 ± 1,7
% НГ	9,4 ± 6,7***	18,4 ± 0,1	20,3 ± 1,12

Примечание. % PГ – процент вазодилатации в ответ на реактивную гиперемию, % НГ – процент вазодилатации в ответ на нитроглицерин сублингвально (0,5 мг); здесь и в табл. 2 отличие от величины соответствующего показателя в контроле статистически значимо: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$.

Таблица 2

Характеристика параметров функциональной активности HUVEC в эксперименте *in vitro*

Показатель	Модель эндотелиальной дисфункции		Контроль
	Без инкубации с триметазидином	На фоне инкубации с триметазидином	
Количество апоптотических эндотелиоцитов, %	19,3 ± 2,7**	5,6 ± 1,4*	2,5 ± 0,5
Количество клеточных мембранных микрочастиц, шт. × 10 ⁵ /мл	4,16 ± 0,52**	1,56 ± 0,30*	1,00 ± 0,06
Содержание VEGF-A, нг/мл	19,86 ± 0,54***	27,63 ± 2,60***	9,54 ± 0,24
Содержание Ca ²⁺ (коэффициент флуоресценции × 10 ⁵)	38,00 ± 4,76***	23,00 ± 0,50**	18,00 ± 2,48
CP (коэффициент флуоресценции × 10 ⁵)	7,65 ± 0,01**	4,53 ± 0,03**	2,83 ± 0,02
Тест раневого дефекта 3 ч, %	80,0	99,9	30,0

обычных условиях нормоксии. На фоне инкубации модели эндотелиальной дисфункции с триметазидином происходит значимое снижение количества апоптотических эндотелиоцитов (в 3,5 раза, $p < 0,01$), клеточных мембранных микрочастиц (в 2,7 раза, $p < 0,01$) и увеличивается концентрация VEGF в питательной среде (в 1,4 раза, $p < 0,01$) по сравнению с моделью эндотелиальной дисфункции без инкубации с триметазидином. В эксперименте *in vitro* триметазидин так же, как у пациентов, привел к снижению содержания внутриклеточного кальция и свободных радикалов в эндотелиоцитах в 1,7 раза ($p < 0,05$ по сравнению с эндотелиальной дисфункцией без триметазидина) (см. табл. 2).

Данные «теста раневого дефекта» выявили, что скорость пролиферации эндотелиоцитов и покрытия ими свободной культуральной поверхности выше в модели дисфункции эндотелия на 50 % – без обработки триметазидином и на 69,9 % – при инкубации с триметазидином по сравнению с контролем (см. табл. 2).

Методом вестерн-блоттинга определено, что содержание сигнальных протеинов MAPK различается в культуре клеток HUVEC при нормоксии и эндотелиальной дисфункции (рис. 1). Содержание ERK при нормальных условиях инкубации было в 3,5 раза выше, чем в клетках в модели эндотелиальной дисфункции ($p < 0,01$). Напротив, эндотелиальная дисфункция сопровождалась увеличением содержания JNK и p38

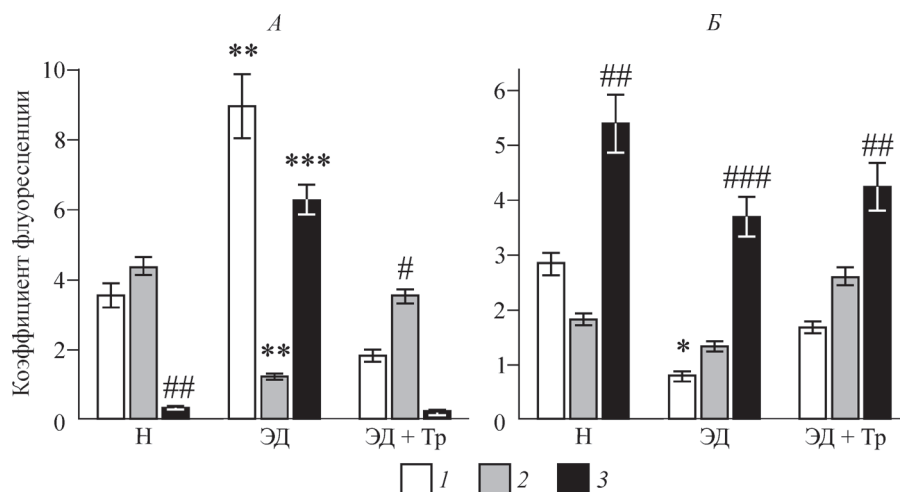


Рис. 1. Содержание MAPK в клетках HUVEC (А) и продуцируемых ими клеточных мембранных микрочастицах (Б). Н – нормоксия, ЭД – эндотелиальная дисфункция, ЭД + Тр – условия эндотелиальной дисфункции в сочетании с инкубацией с триметазидином. Здесь и на рис. 2: 1 – JNK, 2 – ERK, 3 – p38; отличие от величины соответствующего показателя при нормоксии (в контроле) статистически значимо: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$; отличие от содержания других белков этой же группы статистически значимо: # – при $p < 0,05$, ## – при $p < 0,01$, ### – при $p < 0,001$

по сравнению с нормоксией в 2,5 ($p < 0,01$) и 16,9 ($p < 0,001$) раза соответственно. Под действием триметазидина соотношение содержания внутриклеточных сигнальных протеинов было схоже с таковым при нормоксии: концентрация ERK была выше, чем JNK и p38 ($p < 0,05$). При исследовании уровня MAPK в клеточных мембранных микрочастицах во всех экспериментальных образцах получен сходный результат: содержание p38 было существенно выше, чем других протеинов ($p < 0,01$). В то же время установлено, что концентрация JNK была в 3,5 раза выше в мембранных микрочастицах от культуры HUVEC при нормоксии, чем при эндотелиальной дисфункции ($p < 0,05$). Достоверных различий содержания сигнальных протеинов в мембранных микрочастицах в модели эндотелиальной дисфункции при инкубации с триметазидином и без него не выявлено. Однако отмечена тенденция к увеличению содержания всех изучаемых MAPK в клеточных мембранных микрочастицах после культивирования HUVEC в условиях эндотелиальной дисфункции с триметазидином (см. рис. 1).

Анализ содержания митоген-активируемых протеинкиназ в пуле циркулирующих эндотелиоцитов от пациентов с гипертонической болезнью выявил повышение всех трех показателей ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой. У пациентов с гипертонической болезнью, как получавших, так и не получавших триметазидин, значительно преобладало содержание p38: у получавших – в 3 раза ($p < 0,01$), у не получавших – усреднено в 1,5 раза ($p < 0,05$) относи-

тельно содержания ERK и JNK в этих группах. Если сравнить структуру соотношения концентраций изучаемых протеинов, то видно, что у лиц контрольной группы наименьшее содержание JNK, несколько больше ERK и наибольшее количество p38. Такое же соотношение можно наблюдать у пациентов с гипертонической болезнью, получавших триметазидин, тогда как у больных, которым препарат не назначался, наименьшее содержание ERK, несколько выше – JNK и наибольшее – p38. Циркулирующие клеточные мембранные микрочастицы пациентов с гипертонической болезнью на фоне терапии триметазидином и без нее содержали одинаковое количество ERK, у первых содержание JNK над ERK преобладало в 2,3 раза ($p < 0,01$), у последних – в 1,8 раза ($p < 0,05$). Среди изучаемых MAPK превалировала p38, концентрация которой была в 1,1 раза больше, чем JNK, у пациентов, не получавших триметазидин ($p > 0,05$), и в 1,7 раза больше ($p < 0,001$), чем у больных, получавших препарат. По структуре содержания изучаемых протеинов в клеточных мембранных микрочастицах контрольной группы статистически значимо не отличались количества JNK и ERK, а содержание p38 превышало концентрацию JNK в 1,4 раза ($p < 0,05$) и ERK в 1,1 раза ($p > 0,05$) (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

На наш взгляд, возрастание концентрации VEGF не свидетельствует напрямую об эндотелиальной дисфункции, являясь отображением компенсаторного процесса в тканях на фоне

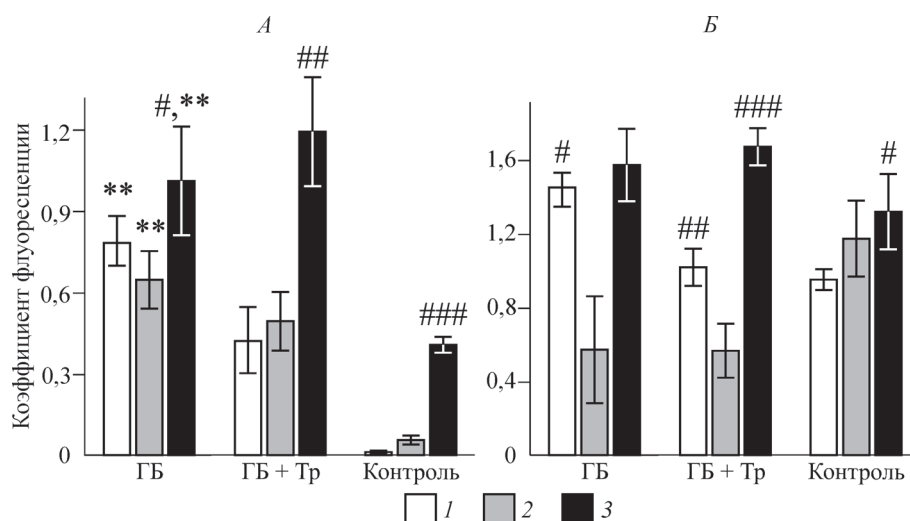


Рис. 2. Содержание *MARC* в циркулирующих эндотелиоцитах (А) и циркулирующих клеточных мембранных микрочастицах (Б). ГБ – гипертоническая болезнь, ГБ + Тр – гипертоническая болезнь, леченная триметазидином, контроль – здоровые волонтеры

гипоксии/ишемии. VEGF выделяется ишемизированными тканями и стимулирует ангиогенез [21]. В нашем исследовании установлено, что триметазидин участвует в индуцировании продукции VEGF и, следовательно, развитии новых сосудистых коллатералей в ишемизированных тканях, что обуславливает улучшение самочувствия пациентов с сердечно-сосудистой патологией, например, снижение ангинозных болей и повышение общей толерантности к физической нагрузке.

Ранее было определено, что триметазидин, воздействуя на кардиомиоциты, вызывает уменьшение окисления жирных кислот и стимулирует использование глюкозы [22], в условиях дефицита кислорода восстанавливает сопряжение гликолиза и окислительного декарбоксилирования, уменьшает внутриклеточный ацидоз, увеличивает количество пирувата, что приводит к возрастанию продукции АТФ [23]. Перечисленные эффекты положительно сказываются на снижении зоны ишемии миокарда и повышении качества жизни пациента. Кроме того, увеличение продукции VEGF приводит к закономерному увеличению деления эндотелиальных клеток, что отображается в «тесте раневого дефекта»: скорость и площадь заполнения пустого поля в модели дисфункции эндотелия при инкубации с триметазидином на 19,9 % выше, чем в его отсутствие. Повышение митотической активности в условиях эндотелиальной дисфункции имеет компенсаторный характер, направленный на поддержание целостности эндотелиального пласта. Было показано, что чрезмерная продукция VEGF может стимулировать эндотелиальную дисфункцию и нарушение барьерных фун-

кций эндотелия за счет нарушения мембран-цитоскелетных взаимодействий [24].

Триметазидин предотвращает возможные эффекты VEGF на эндотелиальную дисфункцию через снижение внутриклеточной концентрации кальция и свободных радикалов, а также стабилизацию клеточных мембран, что подтверждается уменьшением под его воздействием содержания клеточных мембранных микрочастиц под воздействием триметазидина. Механизм снижения внутриклеточной концентрации кальция и свободных радикалов может быть связан со стабилизацией клеточных мембран, в том числе с закрытием митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore) [25, 26]. Известно, что триметазидин может снижать «текучесть» плазматической мембраны клеток [27], в том числе путем угнетения окисления липидов и жирных кислот, стимуляции обмена фосфолипидов, что создает благоприятные условия для восстановления структурной целостности клеточных мембран [28]. В нашем исследовании триметазидин *in vivo* и *in vitro* привел к снижению образования клеточных мембранных микрочастиц эндотелиоцитарного происхождения. Возможно, это связано со стабилизацией клеточных мембран за счет уменьшения «текучести» и снижения внутриклеточной концентрации кальция и свободных радикалов, которые индуцируют сигнальные системы, провоцирующие клеточную активацию или апоптоз.

Ранее нами было продемонстрировано, что назначение триметазидина приводит к снижению блеббинга клеток (выпячивание цитоплазматической мембраны) [29]. Нами проведен анализ циркулирующих эндотелиоцитов, выде-

ленных из крови. Пул циркулирующих эндотелиоцитов состоит из апоптотических и митотических слущенных эндотелиоцитов, а также специализированных прогениторных клеток [30]. Слущивание клеток с эндотелиального пласта может происходить в результате напряжения сдвига или при повышенной пролиферативной активности, что вкупе с прогениторными эндотелиальными клетками обеспечивает формирование коллатералей [31, 32]. Таким образом, экстраполяция результатов исследования на эндотелиальные клетки сосудистой интимы является условной, отображающей совокупность процессов эндотелиальной дисфункции, сопряженных с клеточной активацией, апоптозом и замещением «раневого дефекта» эндотелиального пласта [33].

Анализ содержания MAP-киназ в пуле циркулирующих эндотелиоцитов выявил различия между исследуемыми группами. Обращает на себя внимание то, что в циркулирующих эндотелиоцитах контрольной группы преобладает содержание p38 по сравнению с ERK и JNK. Это может быть объяснено тем, что в состав циркулирующего пула эндотелиоцитов входят преимущественно апоптотические. Учитывая, что у пациентов контрольной группы (здоровых волонтеров) отсутствует эндотелиальная дисфункция, логично, что прогениторных и активированных эндотелиоцитов у них меньше, чем у пациентов с гипертонической болезнью, к тому же нет дополнительного повреждающего фактора в виде напряжения сдвига или действия ударной волны крови. Напротив, в циркулирующих эндотелиоцитах пациентов с гипертонической болезнью преобладало содержание p38 и JNK над ERK, которое совокупно было больше, чем в клетках лиц контрольной группы. Такое соотношение может свидетельствовать в пользу присутствия в циркулирующем пуле всех трех видов циркулирующих эндотелиоцитов: апоптотических, активированных и специализированных прогениторных. Под действием триметазида на фоне повышенного содержания изучаемых протеинов в циркулирующих эндотелиоцитах отмечается тенденция к приближению соотношения концентраций митоген-активируемых протеинкиназ к таковому в контрольной группе, что свидетельствует об улучшении функции эндотелия. В циркулирующих клеточных мембранных микрочастицах от пациентов контрольной группы содержатся MAPK всех трех изучаемых типов, в то время как низкое содержание ERK и высокая концентрация p38 у пациентов с гипертонической болезнью, а также более высокое содержание JNK у не леченных

триметазидином пациентов позволяют предположить, что циркулирующие мембранные микрочастицы – не только диагностический маркер патологических состояний сердечно-сосудистой системы, но и биогенный регулятор клеточной активности за счет транспорта сигнальных молекул. Это имеет непосредственное значение в реализации направленного ответа клеток-мишеней и поддержания жизнеспособности клетки-родительницы [34, 35].

В культуре клеток в условиях эндотелиальной дисфункции инкубация с триметазидином привела к возвращению синтеза MAPK эндотелиоцитами на уровне, характерном для нормоксии. Возрастание синтеза ERK свидетельствует о функциональной активности клеток, что выражается в их росте, делении. Увеличение продукции JNK и p38 происходит под воздействием свободных радикалов, кальция, то есть стрессовых условий для клетки, а также на фоне аутокринно-паракринного действия ростовых факторов, таких как VEGF. Повышенный синтез JNK ведет к клеточной активации и росту, а также контролирует индукцию апоптоза, что наблюдается при эндотелиальной дисфункции *in vivo* и *in vitro*. В целом, JNK может действовать по пути как поддержания жизнеспособности клетки, так и развития апоптоза. Эффекты p38 более драматичны для клетки, и наиболее вероятный механизм сигнальной трансдукции в эндотелиоцитах приведет к их апоптозу. Из полученных результатов *in vitro* следует, что при эндотелиальной дисфункции синтез p38 возрастает в меньшей степени, чем продукция JNK, однако значимо выше, чем при нормоксии. Не удивительно, что клеточные мембранные микрочастицы перенасыщены p38 от клеток HUVEC во всех проведенных экспериментах *in vitro*. Мы предполагаем, что таким образом клетки избавляются от избытка p38, тем самым обеспечивая свое выживание. Вероятно, с этим же связано то, что под действием триметазида в условиях дисфункции эндотелия сохраняется соотношение содержания JNK, ERK и p38, как в модели эндотелиальной дисфункции без триметазида с тенденцией к увеличению их содержания. Другими словами, триметазидин приводит к стабилизации клеточных мембран, увеличению их митотической активности, снижению апоптоза путем не только уменьшения внутриклеточного содержания кальция и свободных радикалов, но и сохраняя удаление условно негативных сигнальных протеинов посредством микрочастиц. Особенно хорошо это показано на культуре эндотелиоцитов в условиях нормоксии, когда низкая экспрессия p38 в эндотелиоцитах сопро-

вождается высоким его содержанием в клеточных мембранных микрочастицах. Предположительно, это может служить для паракринной регуляции, препятствуя увеличению синтеза р38 в нормальных условиях. В целом, механизм формирования и насыщения мембранных микрочастиц сигнальными протеинами, вероятно, носит универсальный характер, что отражается в сходной тенденции изменения содержания MAPK в клеточных мембранных микрочастицах эндотелиоцитарного происхождения при разных условиях инкубации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндотелиальная дисфункция является патогенетическим звеном развития артериальной гипертензии и регистрируется у пациентов с гипертонической болезнью. Клеточно-молекулярные маркеры (циркулирующие эндотелиоциты, циркулирующие клеточные мембранные микрочастицы, sPECAM-1) обладают равной диагностической ценностью с ультразвуковым исследованием диаметра плечевой артерии («манжеточная проба»). Снижение внутриклеточной концентрации кальция, свободных радикалов и уменьшение образования клеточных мембранных микрочастиц ассоциировано с улучшением функции эндотелиальных клеток. В основе молекулярных механизмов коррекции функции эндотелия находится стабилизация клеточных мембран, в том числе митохондрий, что приводит к нормализации содержания биологически активных веществ в эндотелиоцитах и уменьшению экспрессии сигнальных протеинов (р38 и JNK), повышению синтеза ERK, регулирующей клеточную выживаемость. Создание эндотелиальной дисфункции *in vitro*, заключающееся в воздействии на эндотелиальные клетки линии HUVES физической гипоксией и TNF- α , моделирует дисфункцию эндотелия у пациентов с гипертонической болезнью и отвечает следующим параметрам: содержание апоптотических эндотелиоцитов должно быть не менее 19 %, эндотелиальных микрочастиц – не менее 41×10^4 /мкл и сосудисто-эндотелиального фактора роста – не менее 190,864 пг/мл в питательной среде после применения условий эндотелиальной дисфункции. Модель эндотелиальной дисфункции *in vitro* позволяет экстраполировать данные на пациентов с гипертонической болезнью и изучать внутриклеточные механизмы патогенеза нарушения функции эндотелиальных клеток, генерации клеточных мембранных микрочастиц, а также эффекты лекарственных препаратов на молекулярном уровне. Повышение кон-

центрации сосудисто-эндотелиального фактора роста, определенное в модели эндотелиальной дисфункции *in vitro* и у пациентов с гипертонической болезнью, связано с повышением синтеза JNK и направлено на увеличение активации и пролиферации эндотелия. Цитопротективный эффект триметазида на эндотелиальные клетки, определенный *in vitro* и *in vivo*, реализуется через воздействие на патогенетические мишени эндотелиальной дисфункции (снижение внутриклеточной концентрации биологически активных веществ) и ингибирование процесса образования эндотелиальных мембранных микрочастиц путем повышения синтеза ERK и уменьшения содержания MAPK с негативными эффектами. Кроме того, модель дисфункции эндотелия позволила подтвердить обнаруженное свойство триметазида увеличивать содержание сосудисто-эндотелиального фактора роста в крови пациентов с гипертонической болезнью. Медикаментозное повышение концентрации сосудисто-эндотелиального фактора роста, контролирующего развитие сосудистых коллатералей, аргументирует улучшение самочувствия пациентов с гипертонической болезнью на фоне терапии цитопротекторами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторский коллектив выражает благодарность за оказанную материально-техническую поддержку проекта ректору ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Д. Войно-Ясенецкого д.м.н., профессору И.П. Артюхову, исполнительному директору НИИ молекулярной медицины и патофизиологии к.м.н., доценту Е.А. Пожиленковой, директору ООО «ВладКО» В.Д. Кожемякину, профессору Университета Хельсинки Э. Мервала.

Работа выполнена при поддержке гранта ККФПНиНТД, 2012, гранта Университета Хельсинки, 2010.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Contreras F., Rivera M., Vásquez J. et al. Endothelial dysfunction in arterial hypertension // J. Hum. Hypertens. 2000. 14. (Suppl. 1). 20–25.
2. Ferroni P., Basili S., Paoletti V. et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2006. 16. 222–233.
3. Thuillez C., Richard V. Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects // J. Hum. Hypertens. 2005. 19. 21–25.

4. Tousoulis D., Papageorgiou N., Androulakis E. et al. Novel therapeutic strategies targeting vascular endothelium in essential hypertension // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2010. 19. (11). 1395–1412.
5. Wilasrusmee C., Da Silva M., Singh B. et al. A new *in vitro* model to study endothelial injury // *J. Surg. Res*. 2002. 104. (2). 131–136.
6. Chong A.-Y., Blann A.D., Lip G.Y.H. Assessment of endothelial damage and dysfunction: observations in relation to heart failure // *Q. J. Med.* 2003. (96). 253–267.
7. Инжутова А.И., Салмина А.Б., Петрова М.М. и др. Регистрация блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови как экспресс-метод оценки тяжести состояния больных осложненными формами гипертонической болезни // *Бюл. СО РАМН*. 2007. 123. (1). 6–10.
8. Dignat-George F., Boulanger C.M. The many faces of endothelial microparticles // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. (31). 27–33.
9. Yuana Y., Bertina R.M., Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles // *Thromb. Haemost.* 2011. (105). 396–408.
10. Tushuizen M.E., Diamant M., Sturk A. et al. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. 31. (1). 4–9.
11. Corretti M.C., Anderson T.J., Benjamin E.J. et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. A report of the international brachial artery reactivity task force // *JACC*. 2002. 39. (2). 257–265.
12. Fish J.E., Matouk C.C., Yeboah E. et al. Hypoxia-inducible expression of a natural *cis*-antisense transcript inhibits endothelial nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* 2007. 282. (21). 15652–15666.
13. Stempien-Otero A., Karsan A., Cornejo C.J. et al. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis // *J. Biol. Chem.* 1999. 274. (12). 8039–8045.
14. Yamagishi S., Inagaki Y., Nakamura K. et al. Azelnidipine, a newly developed long-acting calcium antagonist, inhibits tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 expression in endothelial cells through its anti-oxidative properties // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004. (43). 724–730.
15. Demaison L., Fantini E., Sentex E. et al. Trimetazidine: *in vitro* influence on heart mitochondrial function // *Am. J. Cardiol.* 1995. 76. (6). 31–37.
16. He S., Yan F., Zhan J. et al. Protective effects of trimetazidine against vascular endothelial cell injury induced by oxidation // *J. Geriatr. Cardiol.* 2008. (5). 248–251.
17. Suzuki H., Seto K., Shinoda Y. et al. Paracrine upregulation of VEGF receptor mRNA in endothelial cells by hypoxia-exposed Hep G2 cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 1999. 276. G92–G97.
18. Izuta H., Chikaraishi Y., Adachi T. et al. Extracellular SOD and VEGF are increased in vitreous bodies from proliferative diabetic retinopathy patients // *Molecular Vision*. 2009. 15. 2663–2672.
19. Iwata Y., Kuzuya F., Hayakawa M. et al. Circulating endothelial cells fail to induce cerebral infarction in rabbits // *Stroke*. 1986. 17. (3). 506–509.
20. Pirro M., Schillaci G., Paltriccia R. et al. Increased ratio of CD31⁺/CD42⁻ microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. 26. 2530–2535.
21. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors // *FASEB J.* 1999. 13. 9–22.
22. Kantor P.F., Lucien A., Kozak R., Lopaschuk G.D. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase // *Circ. Res.* 2000. 86. 580–588.
23. Lopaschuk G., Stanley W. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions. Potentials for pharmacological intervention // *Cardiovasc. Res.* 1997. 33. 243–257.
24. Cromer W., Jennings M.H., Odaka Y. et al. Murine rVEGF164b, an inhibitory VEGF reduces VEGF-A-dependent endothelial proliferation and barrier dysfunction // *Microcirculation*. 2010. 17. (7). 536–547.
25. Argaud L., Gomez L., Gateau-Roesch O. et al. Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia-reperfusion injury // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005. 39. (6). 893–899.
26. Morin D., Sapena R., Elimadi A., Testa B. et al. [³H]-Trimetazidine mitochondrial binding sites: regulation by cations, effect of trimetazidine derivatives and other agents and interaction with an endogenous substance // *Br. J. Pharmacol.* 2000. 130. (3). 655–663.
27. Devynck M.A., Le Quan Sang K.H., Joulin Y., Mazeaud M. Acute membrane effects of trimetazidine in human platelets // *Eur. J. Pharmacol.* 1993. 245. (2). 105–110.
28. Di Napoli P. Anti-ischemic cardioprotection with trimetazidine. Focus on vastarel MR // *Heart Metab.* 2008. 41. 25–29.
29. Инжутова А.И., Ларионов А.А., Петрова М.М., Салмина А.Б. Стабилизация клеточных мембран как цель сосудистой терапии // *Кардиология*. 2011. (4). 52–55.
30. Goon P.K.Y., Lip G.Y.H., Boos C.J. et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor

cells, and endothelial microparticles in cancer // *Neoplasia*. 2006. 8. (2). 79–88.

31. Boos C.J., Lip G.Y.H., Blann A.D. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006. 48. 1538–1547.

32. Reneman R.S., Arts T., Hoeks A.P.G. Wall shear stress – an important determinant of endothelial cell function and structure – in the arterial system in vivo // *J. Vasc. Res.* 2006. 43. 251–269.

33. Woywodt A., Bahlmann F.H., de Groot K. et al. Circulating endothelial cells: life, death, detach-

ment and repair of the endothelial cell layer // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002. 17. (10). 1728–1730.

34. Mack M., Kleinschmidt A., Brühl H. et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection // *Nat. Med.* 2000. (6:7). 769–775.

35. Bebawy M., Combes V., Lee E. et al. Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells // *Leukemia*. 2009. 23. 1643–1649.

THERAPEUTIC CORRECTION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION: DATA OF THE TRANSLATIONAL MEDICINE

Alyona Ivanovna INZHUTOVA¹, Svetlana Anatoljevna FILIPPOVA², Aleksey Anatoljevich LARIONOV³, Viktoria Vladimirovna BYKOVA¹, Tatyana Vasiljevna NOVIKOVA¹, Tatyana Pavlovna ORLOVA¹, Irina Georgievna INZHUTOVA², Marina Mikhajlovna PETROVA³, Alla Borisovna SALMINA¹

¹*Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry of Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Vojno-Yasenetsky*
660022, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 1

²*Krasnoyarsk Health and Care Center*
660135, Krasnoyarsk, Voronov str., 39Б

³*Department of Ambulatory Therapy, Family Medicine and Healthy Life Style, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Vojno-Yasenetsky*
660022, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 1

Molecular mechanisms for the mend of functional condition of epithelial cells have been studied by the example of trimetazidine treatment of the patients with arterial hypertension and have been confirmed by *in vitro* simulation of endothelial dysfunction in cell culture HUVEC. It has been revealed that trimetazidine treatment increases VEGF production and synthesis of ERK, normalization of intracellular calcium concentration and free radicals level in endothelial cells. These molecular changes result in reduced apoptosis of endothelial cells, enhancing their functional activity and cell growth, accompanied by the decrease in the formation of cell membrane microparticles. Membrane microparticles play a key role not only in the development of endothelial dysfunction, but also they are as paracrine regulators of cell survival due to «dumping» excess of signaling proteins by endothelial-derived microparticles.

Key words: arterial hypertension, endothelial dysfunction, pathogenesis, treatment, membrane microparticles, HUVEC, trimetazidine.

Inzhutova A.I. – candidate of medical sciences, senior researcher

Filippova S.A. – doctor of functional diagnostics, e-mail: filsvet@mail.ru

Larionov A.A. – clinical attending physician of department of polyclinic therapy and family medicine, e-mail: adpersonamalexylarionov@gmail.com

Bikova V.V. – student, e-mail: kgma21@mail.ru

Novikova T.V. – student, e-mail: tatiana_novik@mail.ru

Orlova T.P. – student, e-mail: tanush7@mail.ru

Inzhutova I.G. – candidate of medical sciences, head doctor, e-mail: irinainzhutova@gmail.com

Petrova M.M. – doctor of medical sciences, professor, a head of department of polyclinic therapy and family medicine, e-mail: stk99@yandex.ru

Salmina A.B. – doctor of medical sciences, professor, director, e-mail: allasalmina@mail.ru

ПАТОГЕНЕЗ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ (ОБЗОР)

Константин Юрьевич НИКОЛАЕВ¹, Алевтина Андреевна НИКОЛАЕВА¹,
Людмила Владимировна ПОПОВА², Алла Константиновна ОВСЯННИКОВА¹,
Галина Израйлевна ЛИФШИЦ³, Ирина Михайлона ГИЧЕВА⁴

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

² Центральная клиническая больница СО РАН
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 25

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

⁴ МБУЗ Городская клиническая больница № 19
630068, г. Новосибирск, ул. Шукшина, 3

В течение последних полутора десятилетий в мире констатируется пандемия хронической болезни почек. Значительную роль в повсеместном возрастании ее распространенности играет рост в структуре нефрологических заболеваний удельного веса сосудистых поражений почек (почечных васкулопатий). В основе формирования гипертонической нефропатии лежит эндотелиальная дисфункция и ремоделирование внутривисцеральных сосудов. Ранние маркеры вовлечения сердца коррелируют с начальными проявлениями вовлечения почек. Возникновение и прогрессирование изменений в сердце и почках во многом обусловлены сходными гемодинамическими, нейрогуморальными и генетическими механизмами.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, факторы риска для органов-мишеней, хроническая почечная недостаточность.

В течение последних полутора десятилетий в мире констатируется пандемия хронической болезни почек. По данным международных эпидемиологических исследований, ее распространенность среди взрослого населения США, Западной Европы, Австралии, Китая находится в диапазоне от 11 до 16 % [32, 33, 42] и зависит от расовых и других демографических особенностей обследованных популяций. Установлено, что у 3–9,5 % взрослого населения хроническая болезнь почек находится в стадии начальной хронической почечной недостаточности, а экстраполяция этих данных на население земного шара в целом позволяет допустить, что ею страдает около 5 % взрослого населения Земли, причем величина показателя существенно воз-

растает в старшей возрастной группе, достигая 15–20 и даже 30 % [29].

Значительную роль в повсеместном возрастании распространенности хронической болезни почек играет рост в структуре нефрологических заболеваний удельного веса сосудистых поражений почек (почечных васкулопатий), таких как диабетическая нефропатия, гипертонический нефроангиосклероз, ишемическая болезнь почек, развивающаяся в рамках распространенного атеросклероза. Протекая латентно, эти нефропатии усугубляют течение сердечно-васкулярной патологии, как следствие, существенно возрастает риск сердечно-сосудистой смертности [29]. По данным Московского городского нефрологического регистра, с 1995

Николаев К.Ю. – д.м.н., проф., главный научный сотрудник, e-mail: nikolaevky@yandex.ru

Николаева А.А. – д.м.н., проф., главный научный сотрудник, e-mail: nikolaev@sibmail.ru

Попова Л.В. – д.м.н., зав. 3 терапевтическим отделением

Овсянникова А.К. – аспирант, e-mail: aknikolaevq@kb.ru

Лифшиц Г.И. – д.м.н., проф., зав. лабораторией персонафицированной медицины, e-mail: gl62@mail.ru

Гичева И.М. – к.м.н., главный врач, e-mail: gl62@mail.ru

по 2008 г. зарегистрировано 25 308 больных с хронической болезнью почек, при этом доля гипертонического нефроангиосклероза составляет 11,0 %. При анализе динамики отдельных нозологий показано, что за последние 5 лет увеличилась распространенность гипертензивного нефросклероза на 136,8 %.

ПАТОГЕНЕЗ ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

Изменение функций миокарда и нефрона при формировании хронической почечной недостаточности следует рассматривать через призму эволюции артериальной гипертензии (АГ) [27]. Понятие «континуум» подразумевает непрерывную цепь развития заболевания от факторов риска до гибели пациента. Сердечно-сосудистый и почечный континуумы развиваются параллельно и в тесной взаимосвязи. Ранние маркеры вовлечения сердца коррелируют с начальными проявлениями вовлечения почек. Возникновение и прогрессирование изменений в сердце и почках во многом обусловлены сходными гемодинамическими, нейрогуморальными и генетическими механизмами [27].

Сибирская школа ученых под руководством профессора И.Ш. Штеренталя и профессора А.А. Николаевой с 1980-х гг. XX в. при помощи серии многочисленных работ имела возможность выстроить свою концепцию возникновения ранних нарушений микроциркуляторного русла при АГ. На протяжении многих лет изучалась чувствительность рецепторов сосудов к вазоактивным веществам прессорного и депрессорного механизма действия у здоровых и больных людей АГ, у людей с положительным семейным анамнезом по сердечно-сосудистым болезням. Оценивались сосудистая регуляция, ее нарушения, адаптивное реагирование на стресс, нейрогормональный дисбаланс и метаболические нарушения при развитии сердечно-сосудистых болезней [19–23]. Первые признаки сосудистого, гормонального и метаболического дисбалансов, раннее формирование инсулинорезистентности оценивались с обязательным учетом семейного анамнеза, факторов риска и вредных привычек [22].

В группах больных даже с мягкой формой АГ, а также в группах высокого риска из семей с положительным отягощенным семейным анамнезом по этому заболеванию был выявлен феномен гиперреактивности сосудов к норадреналину при спонтанной нормализации артериального давления и при определенных обстоятельствах (после солевой нагрузки, сопровож-

дающейся снижением сосудистой реактивности к вазодилататору гистамину и ростом ее к норадреналину) [16, 17]. У некоторых больных с АГ в начальных стадиях сосудистая реактивность к гистамину становится констрикторной, т. е. приобретает характер парадоксальной реакции [6, 7, 18, 26].

Больные с таким вариантом АГ отличаются увеличенным содержанием кортизола, высокими индексами гормональной (кортизол/инсулин) и сосудистой адаптации (сосудистая реактивность к норадреналину/сосудистая реактивность к гистамину), низким уровнем метаболической адаптации (Т3/Т4). На солевую нагрузку у таких больных выявляется гиперинсулинемия. На этом фоне снижена экскреция нитратов, повышена концентрация малонового диальдегида в мембранах эритроцитов, что свидетельствует об активации процессов перекисного окисления липидов [7].

Не исключено, что развитие АГ по такому варианту приведет к ускоренному развитию дисфункции эндотелия как в коронарном русле, так и в почечных артериях с соответствующим исходом.

А.А. Николаева и К.Ю. Николаев в своих исследованиях показали, что чем выше дисбаланс сосудистой регуляции микроциркуляторного русла, тем прогрессирование атеросклеротического процесса более выражено в коронарных и церебральных сосудах. Вероятнее всего, это относится и к системе почечных артерий [22].

В последние годы изучение маркеров эндотелиальной дисфункции включало другие ее параметры, в том числе и фибриногенез. Было показано, что у больных эссенциальной АГ I–III степеней по классификации российского медицинского общества по АГ при сопоставлении с нормотензивными представителями контрольной группы имело место достоверное повышение экскреции с мочой трансформирующего фактора роста β (TGF- β), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ингибитора активатора плазминогена типа 1 (PAI-1) и коллагена IV типа. Увеличение содержания в моче TGF- β , VEGF и PAI-1 может рассматриваться как ранний признак гипертонического поражения почек, рост мочевого экскреции коллагена IV типа ассоциирован с микроальбуминемией и свидетельствует в пользу активации процессов почечного фиброгенеза [5, 14, 15].

Прогрессированию эндотелиальной дисфункции способствует гиперурикемия [8, 10]. В основе формирования гипертонической нефропатии лежит эндотелиальная дисфункция и ремоделирование внутрисосудов [3].

Повышенное пульсовое давление выступает как фактор риска поражения органов-мишеней у больных АГ. Наряду с развитием почечной дисфункции в виде снижения клиренса клубочковой фильтрации параллельно развиваются гипертрофия левого желудочка, повышение жесткости аорты и периферических артерий [28].

Подчеркивается существенное сходство морфологических изменений в сердце и в почках в процессе развития сердечно-сосудистых катастроф и почечного континуума [1]. Снижение клубочковой фильтрации у больных эссенциальной АГ сопряжено с достоверным увеличением частоты осложнений ишемической болезни сердца, фибрилляций предсердий, а также с диабетической и уратной нефропатией [13], ишемической болезнью почек [12].

Гипертоническая нефропатия является следствием нарушения работы почечных гемодинамических механизмов, защищающих клубочки от повреждающего действия повышенного артериального давления (АД). В результате в почках развиваются два принципиально разных патологических процесса – ишемическое и гипертрофическое повреждение клубочков, которые ведут к формированию фокально-сегментарного гломерулосклероза и нарастающей потере почечной функции. Причиной первого из них служит избыточная ауторегуляторная реакция, осложняющаяся обструктивным гилинозом афферентных артериол, ишемическим повреждением клубочков и потерей части функционирующих нефронов. Одновременно с ишемическим поражением почек в сохранившихся нефронах развивается компенсаторный по своей природе феномен гиперфильтрации, ведущий к потере почечной ауторегуляции и стойкой гломерулярной гипертензии. В результате этих гемодинамических нарушений в почках развивается гипертрофический (пролиферативный) гломерулосклероз. Ключевую роль при этом играет гиперактивность клеточной ренин-ангиотензиновой системы подоцитов, которая сопровождается избыточной продукцией TGF- β 1, VEGF и PDGF, вызывающей профибротическую структурно-функциональную перестройку подоцитов и мезангиальных клеток клубочков [5].

ДИАГНОСТИКА ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ АГ

Микроальбуминурия (МАУ) является маркером поражения почек и риска сердечно-сосудистых осложнений. Нарастающая МАУ в настоящее время приобрела значение интег-

рального маркера неблагоприятного прогноза, поскольку отражает генерализованную дисфункцию эндотелия, которая обуславливает поражение органов-мишеней (миокард, сосудистая стенка, почка) и наблюдается уже при незначительном повышении мочевого экскреции альбумина («альбуминурия низких величин») [30].

Установлена диагностическая значимость определения показателя функционального почечного резерва [25]. В процессе лечения трудно контролируемой АГ у пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности приобретают диагностическую ценность магнитно-резонансная томография и спиральная компьютерная томография [11]. Для ранней диагностики структурно-функциональных изменений почечных сосудов при АГ с успехом применяется доплерографическое исследование интрапаренхиматозного кровотока с использованием ортостатической пробы [4]. С целью дифференциальной диагностики функциональных и органических изменений почечных артерий при АГ используется миогенное нагрузочное тестирование, дающее представление о скоростных показателях кровотока и индексах периферического сопротивления [2].

В заключение следует отметить, что сочетанное определение содержания в сыворотке крови креатинина, МАУ и скорости клубочковой фильтрации повышают возможность определения субклинического поражения почек у больных АГ [24].

НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИИ ПОЧЕК У БОЛЬНЫХ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ В СОЧЕТАНИИ С АГ

Доля диабетических нефропатий в общей структуре нефрологической заболеваемости (с 1955 по 2008 г. их зарегистрировано 25 308 случаев) составляет 12,9 % и быстро увеличивается [29].

Группа сибирских ученых во время обследования семей пробандов, перенесших в молодом возрасте острый инфаркт миокарда, выявила, что у их детей высока частота встречаемости признаков метаболического синдрома: гиперинсулинемия – в 80–83 %, гипертриглицеридемия – в 30–80 %, избыточная масса тела – в 60 %, АГ – в 17–30 % случаев в зависимости от пола и возраста [9, 24].

На развитие АГ и нарушение почечной функции метаболический синдром оказывает свое влияние. Известно, что сочетание АГ и сахарного диабета второго типа приводит к появлению более ранних признаков хронической почечной

недостаточности. Влияние различных составляющих метаболический синдром признаков на скорость развития хронической почечной недостаточности неоднозначно. Большинство авторов, изучающих эту проблему, главную роль отводят артериальной гипертензии [35, 36, 39], полагая АД определяющим фактором увеличения экскреции альбумина с мочой у лиц с ожирением [35, 39, 41]. I.S. Hoffmann с соавт. [36] считают, что у лиц с ожирением уровень АД, особенно систолического, является детерминантом уровня альбумина в моче. А.М. Grandi с соавт. [35] на большом клиническом материале доказали отсутствие влияния на почечную дисфункцию как гиперинсулинемии, так и семейного анамнеза по АГ, придавая значение у больных с МАУ только ночному и дневному уровням систолического АД. R. Pedrinelli с соавт. [39] сделали вывод о том, что ни высокая резистентность к инсулину, ни другие признаки метаболического синдрома не влияют на МАУ. МАУ чаще всего встречается только при сочетании высокого уровня АД и ожирения.

Показано, что высокое содержание TGF- β прямо коррелирует с индексом массы тела, средним АД и уровнем экскреции альбумина с мочой у больных АГ, а также, что гиперпродукция цитокина может считаться патофизиологическим механизмом прогрессирования нарушенной функции почек у больных АГ, страдающих ожирением [31].

Единичные исследования говорят о том, что у больных АГ на фоне метаболического синдрома микроальбуминурия связана с повышением в плазме крови уровня триглицеридов плазмы крови и снижением содержания холестерина липопротеинов высокой плотности [34].

Ряд авторов доказал влияние инсулинорезистентности на функцию почек у больных с АГ и метаболическим синдромом [37, 40]. R. Redon с соавт. [40] считают, что уровень инсулина натощак является независимым параметром, связанным с увеличением экскреции альбумина с мочой. Авторы пришли к заключению, что у лиц с АГ I степени с МАУ имеет место гиперинсулинемия при отсутствии ожирения, а уровень инсулина служит основным определяющим фактором микроальбуминурии. Y.I. Kim с соавт. [37] показали, что МАУ в общей популяции Кореи ассоциируется с гиперинсулинемией и центральным ожирением, свидетельствующим о том, что МАУ является следствием синдрома резистентности к инсулину независимо от АГ или сахарного диабета второго типа.

В то же время в перекрестном исследовании «Third National Health and Nutrition Examination

Survey» [38] с участием 5360 жителей США была обнаружена взаимосвязь между МАУ и метаболическим синдромом, где основными предикторами МАУ оказались величина АД и уровень глюкозы плазмы крови.

Таким образом, учитывая сложность взаимоотношений всех симптомов метаболического синдрома у различных пациентов с АГ, трудно установить единый определяющий механизм патогенеза хронической почечной недостаточности при таком виде полиорганной патологии. Вероятно, это связано с определенным сочетанием АГ, ожирения, инсулинорезистентности с генетически детерминированными особенностями нейрогормональных и метаболических процессов организма, что в конечном итоге определяет вовлечение в процесс такого органа-мишени, как почки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из приведенной литературы можно сделать вывод, что сердечно-сосудистый и почечный континуумы развиваются параллельно и в тесной взаимосвязи. Ранние маркеры вовлечения сердца коррелируют с начальными проявлениями вовлечения почек. Возникновение и прогрессирование изменений в сердце и почках во многом обусловлены сходными гемодинамическими, нейрогуморальными и генетическими механизмами. Помимо этого существует и определенная избирательность поражения органов-мишеней, причины которой требуют дальнейшего изучения.

Однако практикующим врачам следует учесть факт раннего развития нефропатии при сердечно-сосудистых болезнях, особенно при АГ. Необходимо помнить о существовании раннего маркера этого процесса в виде микроальбуминурии, которую в настоящее время выполняют все лаборатории в условиях поликлиник.

В начальных стадиях нефропатия обратима, если вовремя провести соответствующее медикаментозное лечение в качестве вторичной профилактики гипертонического нефроангиосклероза с последующим развитием хронической почечной недостаточности; препаратом выбора будет ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, при этом необходим обязательный контроль МАУ. Для оценки эффективности лечения АГ с поражением органов-мишеней следует контролировать восстановление эндотелиальной дисфункции на уровне микроциркуляторного русла, для чего необходимо использовать индекс сосудистой адаптации, который выступает в качестве интегрального показателя

как нейрогормонального, так и метаболического ответов на различные стрессовые воздействия. При отсутствии нормализации показателей микроциркуляторного русла риск осложнений остается высоким и требует активной работы в группе таких пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.А., Попова Л.А., Рыженкова И.В. Эссенциальная артериальная гипертензия и хроническая почечная недостаточность у пациентов, длительно наблюдающихся в многопрофильном амбулаторном учреждении // Клиническая нефрология. 2010. (1). 49–52.
2. Виллевальде С.В., Гудгалис Н.И., Ефремовцева М.А., Кобалава Ж.Д. Сравнительное исследование различных методов оценки функционального состояния почек у больных артериальной гипертензией // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2008. 7. (4). 21–29.
3. Дзизинский А.А., Протасов К.В., Синкевич Д.А. и др. Пульсовое давление как фактор риска поражения органов-мишеней у больных артериальной гипертензией // Сиб. мед. журн. 2009. 90. (7). 27–30.
4. Егорова Н.П., Головин Д.А., Скворцов А.Е. и др. Роль миогенного нагрузочного тестирования в дифференциальной диагностике функциональных и органических изменений почечных артерий при артериальной гипертензии // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2006. (2). 101–111.
5. Кузьмин О.Б., Бучнева Н.В., Пугачева М.Д. Почечные гемодинамические механизмы формирования гипертонической нефропатии // Нефрология. 2009. 13. (4). 28–36.
6. Куроедов А.Ю. Парадоксальная (вазоконстрикторная) сосудистая реактивность к гистамину у больных пограничной артериальной гипертензией: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1999.
7. Куроедов А.Ю. Характеристика варианта артериальной гипертензии с первичной дисфункцией эндотелия и эффект от фармакотерапии энalapрилом // Семейные подходы к организации первичной профилактики ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии. Новосибирск: Наука, 2000. 51–77.
8. Лебедева М.В., Стахова Т.Ю., Балкаров И.М. и др. Альбуминурия, плазменная концентрация эндотелина-1 и атеросклеротическое поражение сонных артерий у больных артериальной гипертензией и гиперурикемией // Клиническая нефрология. 2009. (3). 57–61.
9. Лифшиц Г.И., Николаев К.Ю., Отева Э.А., Николаева А.А. ИБС и компоненты метаболического синдрома Х (семейное исследование) // Терапевт. арх. 2000. (12). 10–13.
10. Люсов В.А., Машукова Ю.М., Евсиков Е.М. и др. Характер нарушений почечной функции у молодых мужчин призывного возраста, больных артериальной гипертензией с нарушением обмена мочевой кислоты // Рус. кардиол. журн. 2009. (5). 16–24.
11. Мельников Л.В., Бартош Л.Ф. Ранние доплерографические признаки структурно-функциональных изменений почечных артерий у больных с эссенциальной гипертензией // 2010. 16. (3). 282–285.
12. Мухин Н.А., Арутюнов Г.П., Фомин В.В. Альбуминурия – маркер поражения почек и риска сердечно-сосудистых осложнений // Клиническая нефрология. 2009. (1). 5–10.
13. Мухин Н.А., Фомин В.В., Моисеев С.В. и др. Ишемическая болезнь почек (атеросклеротическая реноваскулярная гипертензия) – клинический вариант распространенного атеросклероза и причина хронической почечной недостаточности // Вестн. РАМН. 2008. (11). 24–33.
14. Нанчикеева М.Л., Козловская Л.В., Фомин В.В. и др. Клиническое значение определения в моче маркеров эндотелиальной дисфункции и фиброгенеза у больных артериальной гипертензией с поражением почек // Клиническая нефрология. 2009. (4). 54–58.
15. Нанчикеева М.Л., Козловская Л.В., Фомин В.В. и др. Эндотелиальная дисфункция и ремоделирование внутрпочечных сосудов как основа формирования гипертонической нефропатии // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2009. (5). 84–94.
16. Николаев К.Ю. Особенности гормональной и сосудистой реактивности на кратковременную солевую нагрузку хлористым натрием у больных пограничной артериальной гипертензией: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1992.
17. Николаев К.Ю. Эндотелиальная дисфункция и сосудистая реактивность к вазоактивным веществам при сердечно-сосудистой патологии // Омский научн. вестн. 2003. (23). 122–126.
18. Николаев К.Ю., Николаева А.А., Куроедов А.Ю., Скворцова Ю.Н. Парадоксальная сосудистая реактивность к гистамину как возможный маркер риска развития артериальной гипертензии // Артериальная гипертензия. 1997. (3). 50–53.
19. Николаев К.Ю., Скворцова Ю.Н., Николаева А.А. Сосудистая реактивность и липидно-гормональные взаимоотношения у больных с ранними стадиями гипертонической болезни // Терапевт. арх. 1996. (12). Деп. в ВИННИМК. № 3735В-96. 11.

20. Николаева А.А. Научные подходы к организации семейной профилактики гипертензии и ишемической болезни сердца. Новосибирск: Наука, 2000. 106 с.
21. Николаева А.А. Стресс-артериальная гипертензия и подходы к семейной профилактике // Стресс, артериальная гипертензия, инфаркт миокарда. Новосибирск, 1996. 86–100.
22. Николаева А.А., Николаев К.Ю., Попова Л. В. Сосудистая реактивность и эндотелиальные дисфункции при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца. Новосибирск, 2006. 192 с.
23. Николаева А.А., Скворцова Ю.Н., Николаев К.Ю. Клинико-патофизиологический анализ синдрома вегетососудистых дисфункций у лиц с пограничной артериальной гипертензией // Кардиология. 1994. 34. (12). 39–41.
24. Отева Э.А., Николаева А.А., Николаев К. Ю. и др. Синдром вегетососудистой дисфункции как интегральный показатель высокого риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у лиц молодого возраста с отягощенной наследственностью // Терапевт. арх. 2000. (4). 31–34.
25. Пец В.А., Тарабарко Н.В., Миронков Б.Л., Муслимов Р.Ш. Диагностическая ценность магнитно-резонансной томографии и спиральной компьютерной томографии в лечении трудно контролируемой артериальной гипертензии у пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности // Вестн. трансплантол. искусств. органов. 2007. (6). 45–48.
26. Пархоменко Е.И. Сосудистая реактивность: прогностические аспекты и особенности у мужчин и женщин с сердечно-сосудистыми заболеваниями: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2004.
27. Подзолков В.И., Булатов В.А. Миокард. Нефрон. Взгляд через призму эволюции артериальной гипертензии // Рус. мед. журн. 2008. 16. (11). 1517–1523.
28. Подзолков В.И., Булатов В.А. Состояние сердца в процессе эволюции артериальной гипертензии // Фарматека. 2008. (12). 8–14.
29. Томилина Н.А., Бихбов Б.Т., Антонова Т.Н. и др. К вопросу о распространенности хронической болезни почек в г. Москве и ее связи с сердечно-сосудистой патологией // Нефрология и диализ. 2009. 11. (4). 375–377.
30. Юсупова В.А. Возможности ранней диагностики нарушений почечной функции и медикаментозной нефропротекции при артериальной гипертензии // Рос. мед.-биол. журн. 2009. (2). 77–82.
31. Abuaisa B., Kumar S., Malik R., Boulton A. J. Relationship of elevated urinary albumin excretion to components of the metabolic syndrome in non-insulin-dependent diabetes mellitus // Diabetes. Res. Clin. Pract. 1998. 39. (2). 93–99.
32. Chadban S.J., Briganti E.M., Kerr P.G. et al. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab Kidney Study // J. Am. Soc. Nephrol. 2003. 14. S131–S138.
33. Coresh J., Astor B.C., Greene T. et al. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey // Am. J. Kidney. Dis. 2003. 41. 1–12.
34. De la Sierra A., Bragulat E., Sierra C. et al. Microalbuminuria in essential hypertension: clinical and biochemical profile // Br. J. Biomed. Sci. 2000. 57. (4). 987–291.
35. Grandi A.M., Santillo R., Zanzi P. et al. Microalbuminuria in never-treated hypertensives: lack of relationship to hyperinsulinemia and genetic predisposition to hypertension // Am. J. Hypertens. 2000. 13. (4, Pt. 1). 353–358.
36. Hoffmann I.S., Jimenez E., Cubeddu L.X. Urinary albumin excretion in lean, overweight and obese glucose tolerant individuals: its relationship with dyslipidaemia, hyperinsulinemia and blood pressure // J. Hum. Hypertens. 2001. 15. (6). 407–412.
37. Kim Y.I., Kim C.H., Choi C.S. et al. Microalbuminuria is associated with the insulin resistance syndrome dependent of hypertension and type 2 diabetes in the Korean population // Diabetes. Res. Clin. Pract. 2001. 52. (2). 145–152.
38. Palaniappan L., Carnethon M., Fortmann S.P. Association between microalbuminuria and the metabolic syndrome: NHANES III // Am. J. Hypertens. 2003. 16. 952–958.
39. Pedrinelli K., Dell’Omo J., Pennog J. et al. Microalbuminuria, a parameter independent of metabolic influences in hypertensive man // J. Hypertens. 2003. 21. (6). 1163–1169.
40. Redon J., Miralles A., Pascual J.M. et al. Hyperinsulinemia as a determinant of microalbuminuria in essential hypertension // J. Hypertens. 1997. 15. (1). 78–86.
41. Scaglione R., Argano C., di Chiara T. et al. Central obesity and hypertensive renal disease: association between higher levels of BMI, circulating transforming growth factor betaland urinary albumin excretion // Blood Press. 2003. 12. (5–6). 269–276.
42. Xu R., Zhang L., Zhang P. et al. Comparison of the prevalence of chronic kidney disease among different ethnicities: Beijing CKD survey and American NHANES // Nephrol. Dial. Transplant. 2009. 24. 1220–1226.

PATHOGENESIS OF CHRONIC RENAL FAILURE IN PATIENTS WITH HYPERTENSION (REVIEW)

**Konstantin Yurevich NIKOLAEV¹, Alevtina Andreyevna NIKOLAEVA¹,
Lyudmila Vladimirovna POPOVA², Alla Konstantinovna OVSYANNIKOVA¹,
Galina Izraylevna LIFSHITS³, Irina Mikhailovna GICHEVA⁴**

¹ *Institute of Internal Medicine
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

² *Central Clinical Hospital of SB RAS
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 25*

³ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS
630090, Novosibirsk, Acad. Lavrent'ev av., 8*

⁴ *City Clinical Hospital N19
630068, Novosibirsk, Shukshin str., 3*

Pandemia of chronic kidney disease (CKD) is stated in the world over the past decade. The significant role in the widespread increase of the CKD prevalence plays the growing proportion of the kidneys vascular lesions (renal vasculopathy) in the structure of nephrological diseases. The endothelial dysfunction and remodeling of intrarenal vessels are the basis for hypertensive renal disease forming. Early markers of cardiac involvement correlate with the initial manifestations of renal involvement. The appearance and progression of changes in heart and kidney are largely determined by similar hemodynamic, neurohumoral and genetic mechanisms.

Key words: arterial hypertension, risk factors for target organs damage, chronic renal failure.

Nikolaev K.Yu. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher, e-mail: nikolaevky@yandex.ru

Nikolaeva A.A. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher, e-mail: nikolaev@sibmail.ru

Popova L.V. – doctor of medical sciences, head of therapy department

Ovsyannikova A.K. – postgraduate student, e-mail: aknikolaevq@kb.ru

*Lifshits G.I. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of personalized medicine,
e-mail: gl62@mail.ru*

Gicheva I.M. – candidate of medical sciences, chief medical officer, e-mail: gl62@mail.ru

КОГНИТИВНЫЙ ВЫЗВАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ P300 : РОЛЬ В ОЦЕНКЕ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У БОЛЬНЫХ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ОЖИРЕНИЕМ

Ирина Борисовна ЗУЕВА, Карина Игоревна ВАНАЕВА, Екатерина Леонидовна САНЕЦ

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

Минздравсоцразвития России

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

С целью оценить возможности измерения с помощью когнитивного вызванного потенциала когнитивных нарушений у пациентов с артериальной гипертензией и ожирением обследованы 372 пациента (167 женщин и 205 мужчин) в возрасте $47,8 \pm 6,1$ года. Всем пациентам выполнялось нейропсихологическое тестирование, оценивался когнитивный вызванный потенциал для оценки ментальных функций. Проведенное исследование показало, что анализ когнитивного вызванного потенциала является информативным методом, дополняющим клинично-нейропсихологическое исследование в диагностике когнитивных расстройств в среднем возрасте у пациентов с артериальной гипертензией и ожирением. Исследование когнитивного вызванного потенциала может служить скрининговой методикой для ранней диагностики когнитивных нарушений у данной категории больных.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, ожирение, когнитивные нарушения, когнитивный вызванный потенциал.

В связи с увеличением продолжительности жизни отчетливо прослеживается тенденция к увеличению числа пациентов с деменцией по всему миру. В большинстве случаев сосудистые легкие и умеренные когнитивные нарушения рассматриваются как предшествующие деменции [1–4].

В диагностике когнитивных нарушений традиционно используются нейропсихологические методы исследования. Однако в последние годы все большее внимание уделяется методикам, объективизирующим информацию о когнитивных нарушениях.

Вызванными потенциалами (ВП) называются биоэлектрические сигналы, которые появляются с постоянными временными интервалами после определенных внешних воздействий. Ричард Катон в 1875 году впервые показал, что в мозге возникают электрические потенциалы в ответ на стимуляцию какого-либо сенсорного органа. Исследование ВП головного мозга основано на регистрации электрических ответов мозга на экзогенные стимулы (зрительный, слуховой, чувствительный), а также эндоген-

ные события, связанные с ожиданием, распознаванием, принятием решения и инициацией двигательного ответа [5–7]. ВП записывают с электродов, располагаемых на поверхности головы больного. Метод ВП появился почти на 20 лет позже электроэнцефалографии [8]. Применение для записи ВП высокочувствительных усилителей позволяет выделить слабые сигналы центральной нервной системы (ЦНС), которые по амплитуде в 5–100 раз меньше обычной спонтанной активности головного мозга. Электрические отклики мозга на зрительные, слуховые или сенсорные стимулы оцениваются по изменению основных параметров ВП – амплитуды и латентности различных компонентов ответа [8–10]. Основным методом выделения эндогенных событий, значительно продвинувшим анализ когнитивных процессов, является исследование когнитивного потенциала P300, в реализации которого у человека активное участие принимают височно-лимбические и стволово-ретикулярные структуры [10, 11].

P300 — только часть сложного потенциала, возникающего в модели направленного внима-

Зуева И.Б. – к.м.н., зав. кардиологическим отделением № 1 для больных с инфарктом миокарда, e-mail: iravit@yandex.ru

Ванаева К.И. – врач кардиологического отделения № 1 для больных с инфарктом миокарда

Санец Е.Л. – врач кардиологического отделения № 1 для больных с инфарктом миокарда

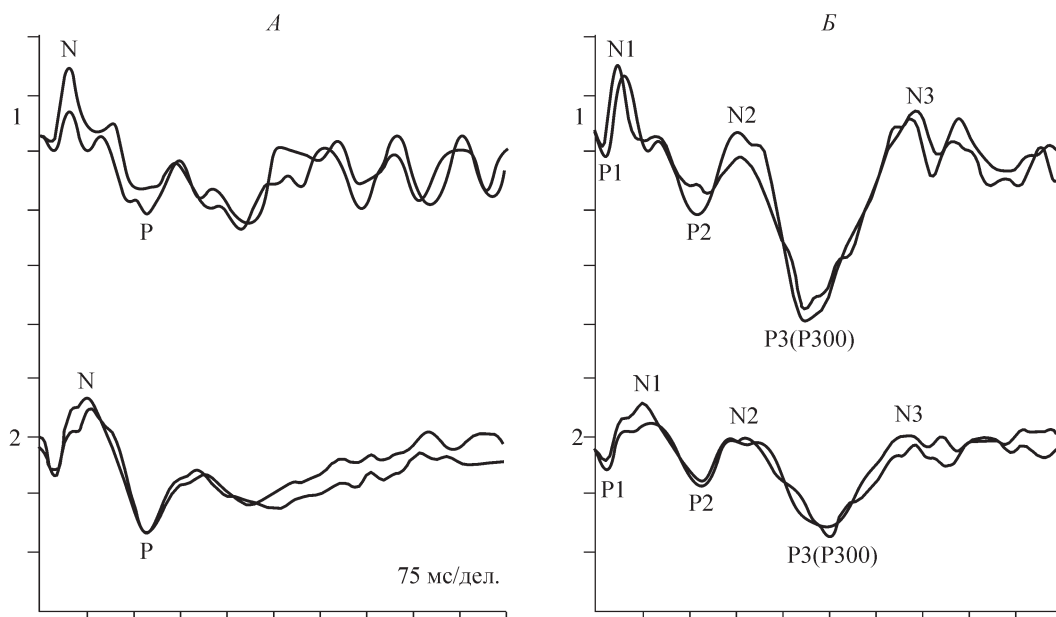


Рис. 1. КВП (P300) у здоровых испытуемых разного возраста. А – сенсорная часть ответа (комплекс N-P) – усреднение ответа на незначимый стимул; Б – сенсорная (N1-P2) и когнитивная (N2-P3-N3) части ответа при усреднении ответов на значимый стимул; 1 – здоровый испытуемый А., 25 лет, латентный период P300 – 331 мс, амплитуда – 12 мкВ; 2 – здоровый испытуемый Л., 55 лет, латентный период P300 – 363 мс, амплитуда – 6,8 мкВ

ния при выполнении когнитивной задачи [9, 12, 13]. Процесс отбора значимого стимула включает в себя чисто сенсорную часть, связанную с физическими параметрами, в основном отражающуюся в показателях ранних компонентов ВП. Следующим этапом являются первичное опознание и классификация стимулов, что наиболее четко отражается в негативном отклонении в области 96–250 мс после начала стимула, которое обозначают как N2 (N200). Затем следует окончательная идентификация стимула, требующая сравнения его с образцом в памяти и принятия решения в отношении связанного с ним действия. С этими событиями связан собственно потенциал P3 (P300) [14, 15] (рис. 1).

Отмечается отчетливая зависимость показателей P300 от возраста. Начиная с 7 лет имеется тенденция к уменьшению латентного периода пика P300 вплоть до 18–20 лет, то есть латентный период находится в обратной связи с возрастом, отражая такие процессы, как когнитивное развитие. После этого момента начинается собственно «кривая старения», так как далее латентный период P300 увеличивается со скоростью 1,25 мс в год, а его амплитуда уменьшается со скоростью около 0,1 мкВ в год [8, 16]. Эти изменения амплитудно-временных параметров когнитивного ВП (КВП) связывают

с нормальным процессом старения, сопровождающимся уменьшением количества дендритных шипиков и снижением плотности синаптических контактов на уровне церебральных нейронов [8, 9]. Существенными преимуществами данной методики является объективизация получаемых данных, а также возможность выявлять ранние когнитивные нарушения. Метод полезен не только для диагностики последних, но и для проведения дифференциальной диагностики между когнитивными нарушениями, деменцией и функциональными расстройствами, в том числе депрессией [9, 17, 18].

Однако в основном данная методика применяется в неврологической практике у пациентов со значимой патологией [19, 20]. В то же время широкая распространенность, высокая социальная значимость и ограниченные возможности терапии делают чрезвычайно актуальной проблему ранней диагностики когнитивных расстройств у пациентов с сердечно-сосудистыми факторами риска (артериальная гипертензия, абдоминальное ожирение, гиперхолестеринемия). В этой связи было проведено данное исследование.

Целью настоящего исследования было оценить возможности измерения методом P300 когнитивных нарушений у пациентов с артериальной гипертензией (АГ) и ожирением.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Всем больным проводилось клиническое обследование с определением антропометрических показателей (окружности талии (ОТ), окружности бедер, окружности шеи, индекса массы тела (ИМТ)). Осуществлялся забор крови для определения уровня глюкозы плазмы и показателей липидного спектра с помощью реактивов фирмы «Abbott» (Германия) на биохимическом анализаторе (ARCHITECT C8000, Германия).

ИМТ рассчитывали по формуле Кеттле: масса тела/рост² (кг/м²) [21]. Масса тела была расценена как нормальная при ИМТ от 18,5 до 24,9 кг/м², как избыточная – при ИМТ от 25,0 до 29,9 кг/м², а при ИМТ 30 кг/м² и более было диагностировано ожирение.

В исследование было включено 372 пациента (205 мужчин и 167 женщин). Средний возраст составил 47,8 ± 6,1 года. У 190 (51,1 %) пациентов отмечалась АГ, длительность которой составила 6,5 ± 1,4 года. ИМТ ≥ 25 кг/м² отмечался у 186 (50 %) больных, длительность ожирения 5,7 ± 1,2 года. Курили 124 (33,3 %) обследованных пациента. Высшее образование было у 194 (52,2 %) больных.

Для исключения значимой тревоги и депрессии использовалась госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS). Когнитивные функции оценивались с помощью нейропсихологических шкал: краткая шкала оценки психического статуса (Mini-Mental State Examination, MMSE), батарея тестов на лобную дисфункцию, тест рисования часов, тест «10 слов по Лурии». Для анализа быстроты реакции и способности концентрировать внимание была использована проба Шульте. Для оценки памяти применялась шкала памяти Векслера (Wechsler Memory Scale, WMS).

Субъективные жалобы на нарушение памяти и внимания оценивались с помощью опросника CFQ (Cognitive Failures Questionnaire). Результат теста CFQ < 1 оценивался нами как показатель незначительного числа жалоб, результат CFQ > 1 – как показатель негативной оценки собственных когнитивных функций.

Количественная оценка когнитивных функций определялась методом КВП с помощью ЭМГ/ВП Nicolet Viking Select (США). Методика исследования P300 основывается на парадигме «odd ball», когда в случайной последовательности подаются серии двух стимулов, среди которых есть «незначимые» (частые) и «значимые» (редкие) стимулы, которые исследуемый должен сосчитать. Для регистрации КВП

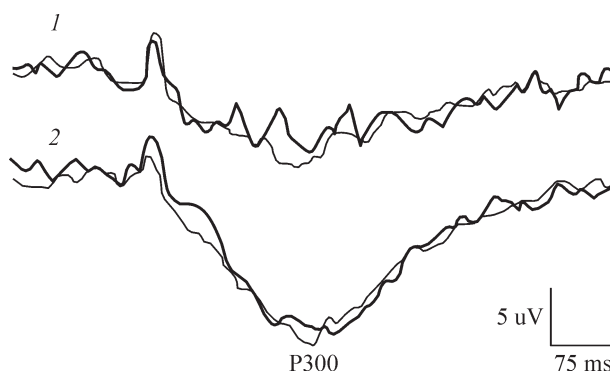


Рис. 2. КВП в ответ на незначимый (1) и значимый (2) стимулы

применяли стимуляцию в виде случайного события в ответ на слуховые стимулы. Использовали слуховые стимулы в виде щелчков с частотой подачи незначимых стимулов 1000 Гц и вероятностью 70–80 %, значимых – 2000 Гц и вероятностью 20–30 %. Длительность стимулов – 50 мс, интенсивность – 80 дБ, период между стимулами – 1 с. Применялась бинауральная стимуляция. Эпоха анализа – 750–1000 мс. Число усреднений – 30–70 отдельно для значимых и незначимых стимулов. Частотная полоса – 0,5–30 Гц. Клиническое значение имели ответы на значимые стимулы. Вначале верифицировали компонент P300 путем сравнения ответов на значимый и незначимый стимулы. Ответы на значимый стимул имели среднелатентные компоненты в ответ на сам стимул и затем непосредственно сам когнитивный комплекс P300 (рис. 2). После верификации компонентов оценивали латентность и амплитуду компонента P300.

Статистический анализ полученных данных проводили с применением параметрических и непараметрических методов в зависимости от характера распределения данных. Показатели представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). При систематизации и статистической обработке данных различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были сформированы четыре группы: первую составили 92 здоровых человека (24,73 %), во вторую группу вошли 94 пациента с АГ (25,26 %), в третьей были 90 пациентов с ожирением 90 (24,19 %), в четвертой – 96 больных с сочетанием АГ и ожирения (25,82 %) (табл. 1). Исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с эти-

Таблица 1

Антропометрические и биохимические показатели в исследуемых группах

Показатель	Здоровые лица, n = 92 (1-я группа)	АГ, n = 94 (2-я группа)	Ожирение, n = 90 (3-я группа)	Сочетание АГ с ожирением, n = 96 (4-я группа)
Возраст, лет	47,67 ± 6,43	48,07 ± 5,71	47,49 ± 6,49	48,36 ± 5,17
Пол, мужчин/женщин, %	53/39 (57,6/42,4)	50/44 (53,2/46,8)	46/44 (51,1/48,9)	56/40 (58,3/41,7)
ИМТ, кг/м ²	22,93 ± 1,85	23,41 ± 2,09	31,02 ± 3,30*	32,40 ± 4,74*
ОТ, см	83,67 ± 8,12	85,40 ± 9,97	99,40 ± 9,93*	101,33 ± 11,32*
Окружность бедер, см	98,54 ± 4,62	100,15 ± 8,71	111,94 ± 7,66*	113,54 ± 12,54*
САД, мм рт. ст.	117,91 ± 7,40	144,06 ± 13,05*	118,18 ± 6,20	146,18 ± 14,30*
ДАД, мм. рт. ст.	77,26 ± 7,19	89,14 ± 7,55	79,58 ± 6,52	90,85 ± 10,21*
Содержание глюкозы в плазме, ммоль/л	5,14 ± 0,51	5,46 ± 0,60	5,33 ± 0,50	5,58 ± 0,70
Содержание триглицеридов, ммоль/л	1,06 ± 0,47	1,40 ± 0,91	1,89 ± 0,65*	1,94 ± 0,83*
Содержание ОХС, ммоль/л	5,31 ± 1,00	5,59 ± 1,04	5,42 ± 0,80	6,03 ± 1,16*
Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л	1,54 ± 0,40	1,49 ± 0,34	1,36 ± 0,32	1,32 ± 0,32
Содержание ХС ЛПНП, ммоль/л	1,71 ± 0,42	1,79 ± 0,45	3,11 ± 0,49*	3,14 ± 0,45*

Примечание. САД и ДАД измеряли «офисным» способом; ОХС – общий холестерин, ХС ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности, ХС ЛПНП – холестерин липопротеидов низкой плотности; * – отличие от величины соответствующего показателя здоровых лиц статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 2

Латентный период и амплитуда P300 в исследуемых группах

Показатель	Здоровые лица, n = 92 (1-я группа)	АГ, n = 94 (2-я группа)	Ожирение, n = 90 (3-я группа)	Сочетание АГ с ожирением, n = 96 (4-я группа)
Латентный период P300, мс	335,78 ± 16,57	346,17 ± 18,37*	340,84 ± 15,61*	357,55 ± 16,09*
Амплитуда P300, мкВ	16,2 ± 5,7	10,4 ± 4,3*	12,0 ± 4,9*	8,2 ± 3,9*

Примечание. Здесь и в табл. 3 * – отличие от величины соответствующего показателя здоровых лиц статистически значимо при $p < 0,01$.

ческими нормами Хельсинкской Декларации (2000 г.).

Все группы были сопоставимы по полу и возрасту. Пациенты второй и четвертой групп не различались по длительности АГ и показателям «офисных» измерений артериального давления (АД), больные третьей и четвертой групп – по длительности ожирения и ИМТ. У пациентов с АГ, ожирением и их сочетанием обращала на себя внимание тенденция к более высокому уровню глюкозы, чем у лиц группы контроля. Отмечалось увеличение содержания триглицеридов в группе пациентов с ожирением и при сочетании АГ с ожирением по сравнению с контрольной группой.

Всем обследованным пациентам проводилась количественная оценка когнитивных функций, выявлено достоверное повышение КВП

и снижение амплитуды P300 по сравнению с группой здоровых лиц (табл. 2). При этом более значимые изменения отмечались у больных с сочетанием АГ и ожирения.

При проведении корреляционного анализа выявлена связь между величиной КВП и ИМТ ($r = 0,72$; $p < 0,01$), массой тела ($r = 0,68$; $p < 0,01$), ОТ ($r = 0,48$; $p < 0,01$), окружностью шеи ($r = 0,43$; $p < 0,01$). Констатирована статистически значимая связь между ИМТ ($r = 0,48$; $p < 0,01$), ОТ ($r = -0,53$; $p < 0,01$), с одной стороны, и амплитудой P300 – с другой.

Пошаговый регрессионный анализ позволил выявить, от какого из антропометрических параметров зависел КВП. В качестве независимых переменных в модель были включены ОТ, окружность шеи, масса тела, ИМТ. При коэффициенте детерминации (R^2) 0,49 зависимость

Таблица 3

Результаты нейропсихологического тестирования в исследуемых группах

Показатель	Здоровые лица, n = 92 (1-я группа)	АГ, n = 94 (2-я группа)	Ожирение, n = 90 (3-я группа)	Сочетание АГ с ожирением, n = 96 (4-я группа)
MMSE, баллы	28,9 ± 1,78	26,97 ± 2,13*	27,7 ± 1,98	26,54 ± 2,0*
Часы, баллы	9,76 ± 1,44	9,34 ± 0,92	9,72 ± 0,85	9,20 ± 0,88
CFQ, баллы	0,86 ± 0,06	1,15 ± 0,26*	1,21 ± 0,28*	1,25 ± 0,24*
10 слов, баллы	8,22 ± 0,44	6,24 ± 1,11*	7,12 ± 0,92*	5,7 ± 0,93*
Проба Шульте, с	150,03 ± 21,24	197,23 ± 23,78*	198,0 ± 21,73*	208,52 ± 21,35*
Проба Векслера				
Эквивалентный показатель памяти, баллы	135,13 ± 12,18	110,87 ± 10,63*	113,61 ± 14,09*	105,52 ± 11,91*
Шифровка	66,37 ± 9,46	49,74 ± 10,18*	52,84 ± 8,91*	45,14 ± 9,72*
Семантическое восприятие	0,56 ± 0,89	2,13 ± 1,24 *	1,49 ± 1,05 *	2,67 ± 1,95 ± *
Семантическая беглость				
Животные	17,79 ± 1,78	15,01 ± 2,42	15,46 ± 2,31	14,25 ± 2,14*
Слова на «б»	15,36 ± 1,73	12,05 ± 2,09	12,76 ± 2,18	10,23 ± 2,05*
Слова на «с»	15,24 ± 2,23	12,78 ± 2,08	13,42 ± 2,16	11,32 ± 1,96*

величины КВП выражалась величиной массы тела ($\beta = 0,92$, $p < 0,001$): $\text{КВП} = 321,02 + \text{масса тела} \times 0,31$ ($R^2 = 0,49$; $F = 5,47$; $p < 0,05$). Выявлена зависимость между величиной латентного периода P300 и уровнем диастолического АД (ДАД) ($r = 0,51$; $p < 0,01$).

В результате проведенного нейропсихологического тестирования обнаружено, что группы пациентов с АГ, ожирением, их сочетанием достоверно отличались по ряду показателей от группы контроля (табл. 3).

Так, во 2-й, 3-й и 4-й группах результат MMSE был достоверно ниже, чем в группе здоровых лиц; пациенты предъявляли жалобы на нарушения памяти (CQF). Результаты теста «рисования часов» достоверно не различались во всех группах больных. По данным опросника FAB, достоверных различий также получено не было ($17,2 \pm 0,83$, $17,1 \pm 0,92$, $17,0 \pm 0,84$ и $17,3 \pm 0,89$ баллов во 2-й, 3-й, 4-й группах пациентов и у здоровых лиц соответственно, $p > 0,05$).

В группе с АГ, ожирением и их сочетанием отмечалось снижение как краткосрочной (тест «10 слов по Лурии»), так и долгосрочной (эквивалентный показатель) памяти, снижалась быстрота реакции и способность концентрировать внимание (проба Шульте) по сравнению с группой здоровых лиц.

В группе больных с сочетанием АГ и ожирения выявлялось снижение числа названных слов в пробе на категориальные («животные»)

и литеральные ассоциации (слова на «с») по сравнению с группой контроля. Полученные результаты указывают на нарушение семантической памяти и наличие легких когнитивных расстройств.

При проведении корреляционного анализа обнаружена отрицательная ассоциация между MMSE и ИМТ ($r = -0,22$; $p < 0,001$), ОТ ($r = -0,21$; $p < 0,001$), систолическим АД (САД) ($r = -0,34$; $p < 0,001$), ДАД ($r = -0,27$; $p < 0,001$). Выявлена статистически значимая связь САД ($r = -0,20$; $p < 0,001$), длительности АГ ($r = -0,21$; $p < 0,001$) и показателя краткосрочной памяти.

При сопоставлении данных нейропсихологического тестирования и результатов количественной оценки когнитивных функций между ними обнаружена тесная взаимосвязь. Выявлена ассоциация КВП с результатами теста MMSE ($r = -0,31$; $p < 0,01$), теста «рисование часов» ($r = -0,24$; $p < 0,01$), теста Векслера ($r = -0,34$; $p < 0,01$), теста «10 слов по Лурии» ($r = -0,35$; $p < 0,01$), FAB-теста ($r = -0,32$; $p < 0,01$) и теста «Шульте» ($r = 0,48$; $p < 0,01$). Отмечалась связь между амплитудой P300 и параметрами краткосрочной ($r = 0,39$; $p < 0,01$) и долгосрочной ($r = 0,41$; $p < 0,01$) памяти. При появлении у пациентов жалоб на нарушение памяти отмечалось увеличение продолжительности КВП ($r = 0,44$; $p < 0,01$) и снижение амплитуды P300 ($r = -0,37$, $p < 0,01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

КВП, если рассматривать его в целом, представляет собой сложный потенциал, возникающий в парадигме направленного внимания и отражающий процесс отбора целевого стимула [22–24]. Ранние компоненты КВП, отражающие сенсорную часть, связанную с физическими параметрами стимула, обусловлены активацией специализированных систем приема и обработки информации. Для клинической части данной методики наибольшее значение имеет этап, связанный с окончательной идентификацией стимула, требующей сравнения его с образцом в памяти и принятия решения в отношении связанного с ним действия (игнорирование, запоминание, оговоренное инструкцией действие) [23–25]. С этими событиями и связан собственно потенциал P300, причем процессам направленного внимания и кратковременной памяти придается особое значение.

P300 регистрируется в гиппокампе, различных подкорковых образованиях. Однако амплитудные, а также временные параметры P300 не связаны лишь с одним качеством или свойством ЦНС, функцией отдельной структуры головного мозга или ограниченного региона. Они отражают организацию целого комплекса механизмов переработки информации в ЦНС в обеспечении различных форм когнитивной и перцептивно-моторной деятельности человека. Генерация P300 осуществляется через сложное пространственно-временное взаимодействие коры, таламических и гиппокамповых структур.

Удлинение латентного периода КВП (P300) на 20–58 мс тесно коррелирует с показателями нейропсихологических тестов, степенью расширения желудочков, тяжестью перивентрикулярного лейкоареоза при компьютерной томографии, но не с количеством инфарктных очагов в головном мозге [26]. Такие результаты были получены в ряде работ, однако в исследованиях включались пациенты, перенесшие инсульт.

Гипоталамус, таламус, лобная кора головного мозга рассматриваются исследователями как возможная зона генерации КВП [27]. Эти структуры важны для процессов обучения и памяти [28]. Нами выявлена ассоциация КВП с результатами теста MMSE, параметрами долгосрочной и краткосрочной памяти, что может подтверждать результаты ранее проведенных исследований.

Как известно, наличие АГ является одним из патогенетических факторов развития сосудистой деменции [29–31]. Во Фремингемском исследовании в течение 12–15 лет наблюдали

1695 больных с АГ в возрасте от 55 до 88 лет, была установлена достоверная отрицательная обратная связь между уровнями АД, длительностью АГ и показателями слуховой и зрительной памяти по данным нейропсихологических тестов [32]. В выполненной нами работе получены сходные результаты. Величины САД и ДАД были тесно связаны с результатами тестирования, отражающими как состояние когнитивных функций в целом, так и параметры краткосрочной памяти.

Ряд авторов показал, что нет убедительной разницы между латентным периодом P300 у пациентов пожилого возраста с систолической АГ и здоровых лиц [33–36]. В нашем исследовании было выявлено не только увеличение латентного периода КВП и снижение его амплитуды у пациентов с АГ, но и продемонстрировано, что P300 в большей степени был связан с уровнем ДАД. Кроме того, нами обнаружена значимая корреляция между показателями нейропсихологических тестов и КВП как у пациентов с АГ, ожирением, так и при их сочетании.

В настоящее время в литературе широко обсуждается роль ожирения как самостоятельного фактора, способствующего развитию когнитивной дисфункции. В ряде исследований показано, что увеличение ИМТ ассоциировано с развитием когнитивного дефицита [32, 37, 38]. Полученные нами результаты подтверждают данное предположение: у пациентов с ожирением или избыточной массой тела отмечалось снижение концентрации внимания, краткосрочной и долгосрочной памяти. Особенно интересным представляется тот факт, что достоверной разницы в результатах таких тестов, как MMSE, тест «рисования часов», между здоровыми людьми и пациентами с избыточной массой тела или ожирением получено не было, однако выявлены достоверные изменения при объективизации когнитивных нарушений с применением КВП по сравнению со здоровыми лицами. Также при проведении корреляционного анализа обнаружена связь между КВП и антропометрическими показателями, такими как ИМТ, ОТ, окружность шеи. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что изменение P300 является объективным и ранним признаком когнитивных расстройств, когда показатели нейропсихологических шкал могут находиться в пределах нормальных значений.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с АГ и ожирением показатели P300 ассоциируются с результатами нейропсихологического тестирования.

2. Изменение P300 является объективным и ранним признаком когнитивных расстройств у пациентов с АГ и ожирением.

3. Исследование P300 может служить скрининговой методикой для ранней диагностики когнитивных нарушений у данной категории больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frisoni G.B., Galluzzi S., Bresciani L. et al. Mild cognitive impairment with subcortical vascular features. Clinical characteristics and outcome // *J. Neurol.* 2002. 249. 1423–1432.

2. Geroldi C., Ferrucci L., Bandinelli S. et al. Mild cognitive deterioration with subcortical features. Prevalence, clinical characteristics, and association with cardiovascular risk factors in community-dwelling older persons (The InCHIANTI Study) // *J. Am. Ger. Soc.* 2003. 51. 1064–1071.

3. Meyer J.S., Xu G., Thornby J. et al. Is mild cognitive impairment prodromal for vascular dementia like Alzheimer's disease? // *Stroke.* 2002. 33. 1981–1985.

4. Stephens S., Kenny R.A., Rowan E. et al. Association between mild vascular cognitive impairment and impaired activities of daily living in older stroke survivors without dementia // *J. Am. Ger. Soc.* 2005. 53. (1). 103–107.

5. Polich J. Meta-analysis of P300 normative aging studies // *Psychophysiology.* 1996. 33. 334–353.

6. Polich J. Cognitive brain potentials // *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 1993. 2. 175–179.

7. Polich J. Attention, probability and task demands as determinants of P300 latency from auditory stimuli // *EEG Clin. Neurophysiol.* 1986. 63. 251–259.

8. Гнездицкий В.В. Вызванные потенциалы мозга в клинической практике. М., 2003. 264 с.

9. Гнездицкий В.В., Шамишнова А.М. Опыт применения вызванных потенциалов в клинической практике. М., 2001. 480 с.

10. Зенков Л.Р., Ронкин М.А. Функциональная диагностика нервных болезней. М., 2004. 480 с.

11. Гордеев С.А. Применение метода эндогенных связанных с событиями потенциалов мозга P300 для исследования когнитивных функций в норме и клинической практике // *Физиол. человека.* 2007. (2). 121–133.

12. Patel S.H., Azzam P.N. Characterization of N200 and P300: selected studies of the event-related potential // *Int. J. Med. Sci.* 2005. 2. 147–154.

13. Pritchard W.S. Psychophysiology of P300 // *Psychol. Bul.* 1981. 89. 506–540.

14. Егоров А.В., Гнездицкий В.В., Контелов Ю.М. Анализ дипольных источников когни-

тивных вызванных потенциалов (P300) мозга человека // *Современное состояние методов неинвазивной диагностики в медицине.* Ялта; Гурзуф, 1996. 106.

15. Araki T., Kasai K., Yamasue H. et al. Association between lower P300 amplitude and smaller anterior cingulate cortex volume in patients with post-traumatic stress disorder: a study of victims of Tokyo subway sarin attack // *Neuroimage.* 2005. 25. 43–50.

16. Ally B.A., Jones G.E., Cole J.A., Budson A.E. The P300 component in patients with Alzheimer's disease and their biological children // *Biol. Psychol.* 2006. 72. 180–187.

17. Muscoso E.G., Costanzo E., Daniele O. et al. Auditory event-related potentials in subcortical vascular cognitive impairment and Alzheimer's disease // *J. Neural. Transm.* 2006. 113. 1779–1786.

18. Sachs G., Anderer P., Margreiter N. et al. P300 event-related potentials and cognitive function in social phobia // *Psychiat. Res.* 2004. 131. 249–261.

19. Копетина О.С., Гнездицкий В.В., Ревенко Е.В. и др. Вызванные потенциалы в оценке сенсорных, активирующих и когнитивных функций мозга человека в норме и при сосудистой деменции коркового и подкоркового типа // *Журн. высшей нервной деятельности.* 1998. 48. 707–718.

20. Ревенко Е.В., Гнездицкий В.В., Калашикова Л.А. Различия P300, нейропсихологического профиля и когнитивных нарушений при деменции коркового и подкоркового типов // *Физиол. человека.* 2001. (3). 42–53.

21. Благодосклонная Я.В., Шляхто Е.В., Бабенко А.Ю. Эндокринология: Учебник для медицинских вузов. СПб.: СпецЛит, 2004. 398 с.

22. Гордеев С.А. Применение метода эндогенных связанных с событиями потенциалов мозга P300 для исследования когнитивных функций в норме и клинической практике // *Физиол. человека.* 2007. (2). 121–133.

23. Коберская Н.Н. Когнитивный потенциал P300 // *Неврол. журн.* 2003. (6). 34–42.

24. Чарвей А., Коберская Н.Н. Характеристики когнитивного вызванного потенциала P300 при умеренных когнитивных расстройствах у пожилых пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией // *Неврол. журн.* 2006. (Прил. 1). 64–70.

25. Tashibana H., Toda K., Sudita M. Event-related potentials in patients with multiple lacunar infarcts // *Gerontology.* 1992. 38. 322–329.

26. Мартынов А.И., Шмырев В.И., Остроумова О.Д. и др. Особенности поражения белого вещества головного мозга у пожилых больных с артериальной гипертензией // *Клин. мед.* 2000. (6). 11–15.

27. Frodl-Bauch T., Bottlender R., Hegerl U. Neurochemical substrates and neuroanatomical gen-

erators of the event-related P300 // *Neuropsychobiology*. 1999. 40. 86–94.

28. Hénon H., Pasquier F., Leys D. Poststroke dementia // *Cerebrovasc. Dis.* 2006. 22. 61–70.

29. Kuo H.K., Sorond F., Iloputaife I. et al. Effect of blood pressure on cognitive functions in elderly persons // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2004. 59. (11). 1191–1194.

30. Singh-Manoux A., Marmot M. High blood pressure was associated with cognitive function in middle-age in the Whitehall II study // *J. Clin. Epidemiol.* 2005. 58. (12). 1308–1315.

31. Knecht S., Wersching H., Lohmann H. et al. High-normal blood pressure is associated with poor cognitive performance // *Hypertension*. 2008. 51. (3). 663–668.

32. Yaffe K., Fiocco A.J., Lindquist K. et al. Health ABC Study. Predictors of maintaining cognitive function in older adults: the Health ABC study // *Neurology*. 2009. 72. (23). 2029–2035.

33. Cicconetti P., Ciotti V., Tafaro L. et al. Event related brain potentials in elderly patients with re-

cently diagnosed isolated systolic hypertension // *Clin. Neurophysiol.* 2007. 118. (4). 824–832.

34. Cicconetti P., Ciotti V., Tafaro L. et al. Event-related brain potentials in elderly dippers and nondippers with recently diagnosed hypertension // *Hypertens. Res.* 2004. 27. (8). 581–588.

35. Nilsson P., Gullberg G., Ekesbo R. et al. No impaired cognitive function in treated patients with mild-moderate hypertension compared to normotensive controls // *Blood Press.* 1998. 7. (4). 209–213.

36. Cicconetti P., Cacciafesta M., Monteforte G. et al. Event-related potentials in the elderly with new mild hypertension // *Clin. Exp. Hypertens.* 2000. 22. (6). 583–593.

37. Elias M.F., Elias P.K., Sullivan L.M. et al. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study // *Neurobiol. Aging*. 2005. 26. (Suppl. 1). 11–16.

38. Bagger Y.Z., Tanky L.B., Alexandersen P. et al. The implications of body fat mass and fat distribution for cognitive function in elderly women // *Obes. Res.* 2004. 12. (9). 1519–1526.

COGNITIVE EVOKED POTENTIAL, P300 COMPONENT: ROLE IN ASSESSMENT OF COGNITIVE FUNCTION AMONG PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND OBESITY

Irina Borisovna ZUEVA, Karina Igorevna VANAEVA, Ekaterina Leonidovna SANETS

Federal Centre for Heart, Blood, and Endocrinology n.a. V.A. Almazov
197341, Sankt-Petersburg, Akkuratov str., 2

Aim. To see ability of cognitive evoked potential in assessment of cognitive function among patients with arterial hypertension and obesity. Material and methods. 372 patients (167 female and 205 men) at the age of 47.8 ± 6.1 have been examined. All participants underwent neuropsychological testing; the cognitive evoked potential has been used for mental functions evaluation. Results. Conducted study has shown that the analysis of the cognitive evoked potential parameters is the informative method which supplements the clinical-neuropsychological investigation in diagnostics of cognitive dysfunction in patients of middle age with obesity and arterial hypertension. The investigation of cognitive evoked potential could be the screening method for early diagnostics of cognitive dysfunction in these patients.

Key words: arterial hypertension, obesity, cognitive dysfunction, cognitive evoked potential.

Zueva I.B. – candidate of medical sciences, head of cardiology department N 1 for patients with myocardial infarction, e-mail: iravit@yandex.ru

Vanaeva K.I. – doctor of cardiology department N 1 for patients with myocardial infarction, e-mail: iravit@yandex.ru

Sanets E.L. – doctor of cardiology department N 1 for patients with myocardial infarction, e-mail: iravit@yandex.ru

ЭНДОГЕННЫЕ КАННАБИНОИДЫ И КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖИРЕНИЕМ

Ирина Борисовна ЗУЕВА, Карина Игоревна ВАНАЕВА

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

Минздравсоцразвития России

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

С целью изучения взаимосвязи показателей когнитивных функций и активности эндоканнабиноидной системы у больных с ожирением обследованы 32 пациента (18 женщин и 14 мужчин) в возрасте $47,81 \pm 2,34$ года. Всем пациентам выполнялось нейропсихологическое тестирование, оценивался когнитивный вызванный потенциал для оценки ментальных функций, определялся уровень эндогенных каннабиноидов. Установлено, что у пациентов среднего возраста с ожирением отмечается развитие когнитивной недостаточности. Активация эндоканнабиноидной системы ассоциирована с развитием когнитивного дефицита в данной группе больных.

Ключевые слова: когнитивные нарушения, абдоминальное ожирение, эндогенные каннабиноиды.

Проведенные к настоящему времени исследования показывают, что когнитивные нарушения, выходящие за пределы возрастной нормы, но не достигающие степени деменции, отмечаются у 11–17 % пожилых и старых людей [3]. Как известно, на развитие когнитивных расстройств влияют возраст, артериальная гипертензия, сахарный диабет, курение, дислипидемия [21]. В настоящее время нет единого мнения, является ли ожирение самостоятельным фактором риска развития когнитивного дефицита. В ряде исследований показано, что наличие ожирения в течение длительного периода времени может способствовать развитию когнитивной дисфункции в пожилом возрасте [34, 35]. Влияние ожирения на когнитивные функции может осуществляться посредством нескольких механизмов (инсулинорезистентность, воспаление, эндотелиальная дисфункция). Одним из них может быть гиперактивация ЭС.

ЭС – это комплексная эндогенная сигнальная система, влияющая на различные метаболические процессы [33]. Было показано, что ЭС регулирует энергетический обмен и метаболический гомеостаз, так же как и поведение, например прием пищи [13, 25]. Другие функции ЭС в нормальной физиологии могут быть связаны с эндокринными функциями, сосудистыми реакциями, регуляцией иммунитета,

ноцицепцией, нейропротекцией и ремоделированием костей [5].

ЭС берет свое название от конопли обыкновенной (*Cannabis sativa*), однолетнего растения, известного как марихуана. Первые типы каннабиноидов, активных химических компонентов *Cannabis sativa*, ответственных за психотропные и физиологические эффекты растения, обнаружены в XX в. В наши дни описано три типа каннабимиметиков: каннабиноиды растений, которые встречаются только в конопле; эндогенные каннабиноиды (или эндоканнабиноиды), которые вырабатываются в головном мозге и периферических тканях; синтетические каннабиноиды [8, 12].

В 1988 г. Howlett и соавт., используя радиоактивную методику, выделили молекулярные структуры мозга с высоким средством к каннабиноидам, получившие название каннабиноидных рецепторов СВ1. Позднее, в начале 1990-х годов, были открыты каннабиноидные рецепторы СВ2, функционирующие за пределами головного и спинного мозга и связанные с иммунной системой. Вскоре были обнаружены первые эндоканнабиноиды, анандамид (N-арахидонилэтанолламин) и 2-арахидоноилглицерол [11, 32]. Таким образом, в настоящее время известно, что ЭС состоит из трансмембранных эндоканнабиноидных рецеп-

Зуева И.Б. – к.м.н., зав. кардиологическим отделением № 1 для больных с инфарктом миокарда, e-mail: iravit@yandex.ru

Ванаева К.И. – врач кардиологического отделения № 1 для больных с инфарктом миокарда

торов (CB1 и CB2), их внутренних лигандов (эндоканнабиноидов) и белков, вовлеченных в эндоканнабиноидный синтез и инактивацию, а также внутриклеточных сигнальных путей [19].

В ряде работ выявлено увеличение уровня эндогенных каннабиноидов при ожирении, особенно висцеральном [12]. Некоторые исследователи показали, что стимуляция ЭС может являться частью патогенеза ожирения [8, 11, 12]. Показано, что введение экзогенных каннабиноидов отрицательно влияет на нейрональную активность. Так, введение тетрагидроканнабиола приводит к снижению нейрональных осцилляций, что, предположительно, является механизмом каннабиноид-индуцированного дефицита памяти [32]. Каннабиноидные рецепторы CB1 преобладают в головном мозге и затрагивают множество важных физиологических и поведенческих процессов [36]. Области мозга с высоким содержанием рецепторов CB₁ также богаты γ -аминомасляной кислотой и глутаминовыми ионными каналами [18].

Высокая плотность этих рецепторов отмечается в пресинаптических терминалах в областях, связанных с когнитивными функциями, особенно это касается таких процессов, как обучение и память [18]. К таким зонам относятся гиппокамп, префронтальная кора головного мозга, поясная извилина, базальные ганглии и мозжечок [26]. ЭС посредством ее эндогенных лигандов анандамида и 2-арахидоноилглицерола осуществляет передачу информации в головной мозг [7]. Эндоканнабиноиды синтезируются по требованию [26].

В исследовании влияния экзогенных каннабиноидов на человека выявлено снижение церебрального кровотока в участках головного мозга, участвующих в формировании внимания (париетальная, лобная доли и таламус) [10]. Влияние эндогенных каннабиноидов на когнитивные функции остается малоизученным. Это и послужило целью настоящего исследования – выполнить анализ взаимосвязи показателей когнитивных функций и активности ЭКС у больных с ожирением.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 32 больных (18 женщин и 14 мужчин) в возрасте от 35 до 55 лет. Средний возраст составил $47,81 \pm 2,34$ года. Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле Кеттле: масса тела/рост² (кг/м²) [1]. Масса тела была расценена как нормальная при ИМТ от 18,5 до 24,9 кг/м², как избыточная – при ИМТ от 25,0 до 29,9 кг/м², а при ИМТ 30 кг/м² и более было диагностировано ожирение. Выс-

шее образование было у 24 (75 %) пациентов. Исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской Декларации (2000 г.).

У всех больных определяли антропометрические показатели (окружность талии, окружность бедер, ИМТ). Проводилось три измерения артериального давления с интервалом в 2 минуты, в положении сидя, после 5 минут покоя по стандартной методике.

Содержание глюкозы и показатели липидного спектра сыворотки крови определяли с помощью реактивов фирмы «Abbott» (Германия) на биохимическом анализаторе (ARCHITECT C8000, Германия), эндогенных каннабиноидов (анандамида и 2-арахидоноил глицерола) – хромато-масс-спектрометрией, инсулина – иммуноферментным методом на микрочастицах AxSymInsulin (“Abbott”). Для оценки степени резистентности к инсулину определяли индекс инсулинорезистентности (НОМА-IR) [23].

Для исключения значимой тревоги и депрессии использовалась госпитальная шкала тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS). Когнитивные функции оценивались с помощью применения нейропсихологических шкал: краткая шкала оценки психического статуса (Mini-Mental State Examination, MMSE), батарея тестов на лобную дисфункцию, тест рисования часов, тест «10 слов по Лурии». Для определения быстроты реакции и способности концентрировать внимание была использована проба Шульте. Субъективные жалобы на нарушение памяти и внимания оценивали с помощью опросника CFQ (Cognitive Failures Questionnaire), результат теста CFQ < 1 считали показателем незначительного числа жалоб, CFQ > 1 – показателем негативной оценки собственных когнитивных функций. Память анализировали с помощью шкалы Векслера (Wechsler Memory Scale, WMS). Количественную оценку когнитивных функций выполняли методом когнитивного вызванного потенциала (КВП) (P300) с помощью ЭМГ/ВП Nicolet Viking Select (США).

Методика исследования P300 основывается на парадигме «odd ball», когда в случайной последовательности подаются серии двух стимулов, среди которых есть «незначимые» (частые) и «значимые» (редкие) стимулы, которые исследуемый должен сосчитать. Для регистрации КВП применяли стимуляцию в виде случайного события в ответ на слуховые стимулы. Использовали слуховые стимулы в виде щелчков с частотой подачи незначимых стимулов 1000 Гц

и вероятностью 70–80 %, значимых – 2000 Гц и вероятностью 20–30 %. Длительность стимулов – 50 мс, интенсивность – 80 дБ, период между стимулами – 1 с. Применялась бинауральная стимуляция. Эпоха анализа – 750–1000 мс. Число усреднений – 30–70 отдельно для значимых и незначимых стимулов. Частотная полоса 0,5–30 Гц. Клиническое значение имели ответы на значимые стимулы.

Статистический анализ полученных данных проводили с применением параметрических и непараметрических методов в зависимости от характера распределения данных. Показатели представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). При систематизации и статистической обработке данных различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все обследованные пациенты были разделены на две группы. У пациентов с ожирением ($n = 17$) были закономерно выше ИМТ, окружность талии, окружность бедер, чем у лиц группы сравнения ($n = 15$) (табл. 1). По величине систолического и диастолического артериального давления группы достоверно не различались. Содержания общего холестерина и триглицеридов, инсулина натощак, индекс инсулинорезистентности были достоверно выше у больных с ожирением, чем у здоровых лиц.

Концентрация анандамида и 2-арахидоноилглицерола была выше в группе пациентов с ожирением ($0,60 \pm 0,32$ и $7,008 \pm 1,45$ нг/мл соответственно) по сравнению с контрольной

группой ($0,30 \pm 0,29$ и $2,25 \pm 1,41$ нг/мл соответственно, $p < 0,05$).

При проведении корреляционного анализа выявлена значимая положительная связь между содержанием анандамида и общего холестерина ($r = 0,58$; $p = 0,002$), холестерина липопротеидов низкой плотности ($r = 0,44$; $p = 0,004$). Установлена ассоциация между концентрацией 2-арахидоноилглицерола и ИМТ ($r = 0,47$; $p = 0,001$), окружностью талии ($r = 0,65$; $p = 0,003$). Взаимосвязи между уровнем эндогенных каннабиноидов и глюкозы, индексом инсулинорезистентности получено не было.

При анализе когнитивных функций обнаружено, что у пациентов с ожирением по сравнению со здоровыми лицами снижен индекс MMSE, страдают процессы запоминания и воспроизведения, отражающие состояние краткосрочной памяти (табл. 2). У пациентов с ожирением отмечались жалобы на нарушение памяти, что сопровождалось повышением результата теста CFQ, ухудшались параметры краткосрочной (тест «10 слов по Лурии») и долгосрочной (проба Векслера) памяти, снижалась способность концентрировать внимание (проба Шульте) по сравнению с группой здоровых лиц.

Латентный период P300 у пациентов с ожирением был достоверно больше, а амплитуда КВП – ниже, чем в контрольной группе. При проведении корреляционного анализа в группе пациентов с ожирением была выявлена значимая связь между величиной КВП и MMSE ($r = -0,32$; $p = 0,001$), вниманием ($r = 0,32$; $p = 0,003$), краткосрочной и долгосрочной памятью ($r = -0,41$; $p = 0,002$; $r = -0,24$, $p = 0,001$).

Таблица 1

Антропометрические и биохимические показатели в исследуемых группах

Показатель	Здоровые лица, $n = 15$ (1-группа)	Ожирение, $n = 17$ (2-группа)
Возраст, лет	$47,4 \pm 2,12$	$47,3 \pm 2,23$
ИМТ, кг/м ²	$23,63 \pm 2,52$	$30,32 \pm 2,43^*$
Окружность талии, см	$81,7 \pm 12,71$	$97,5 \pm 12,81^*$
Окружность бедер, см	$97,7 \pm 7,92$	$113,5 \pm 7,54^*$
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	$119,0 \pm 10,96$	$122,0 \pm 10,82$
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	$80,1 \pm 9,71$	$82,3 \pm 9,1$
Содержание общего холестерина, ммоль/л	$5,1 \pm 0,50$	$5,9 \pm 0,52^*$
Содержание триглицеридов, ммоль/л	$1,45 \pm 0,87$	$2,17 \pm 0,91^*$
Содержание глюкозы, ммоль/л	$5,1 \pm 0,41$	$5,4 \pm 0,43$
Содержание инсулина, мкМЕ/мл	$6,85 \pm 3,53$	$12,34 \pm 3,68^*$
Индекс инсулинорезистентности	$1,57 \pm 0,81$	$3,48 \pm 0,87^*$

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

Таблица 2
Показатели когнитивных функций
в исследуемых группах

Показатель	Здоровые лица, $n = 15$ (1-я группа)	Ожирение, $n = 17$ (2-я группа)
MMSE, баллы	$29,9 \pm 1,91$	$27,7 \pm 1,87^*$
Часы, баллы	$9,8 \pm 0,93$	$9,75 \pm 0,85$
CFQ, баллы	$0,84 \pm 0,23$	$1,21 \pm 0,28^*$
10 слов, баллы	$8,5 \pm 0,87$	$7,25 \pm 0,95^*$
Проба Шульте, с	$148,0 \pm 17,7$	$197,0 \pm 18,1^*$
Проба Векслера, эквивалентный показатель памяти, баллы	$133,0 \pm 9,89$	$108,00 \pm 8,3^*$
КВП, мс	$329,50 \pm 11,6$	$339,25 \pm 11,2^*$
Амплитуда P300, мкВ	$18,2 \pm 6,1$	$16,4 \pm 5,9^*$

Установлены достоверные связи между содержанием 2-арахидоноилглицерола и латентным периодом КВП ($r = 0,30$, $p = 0,001$), результатами пробы Шульте ($r = 0,29$; $p = 0,002$), теста «10 слов по Лурии» ($r = -0,37$, $p = 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Открытие ЭС положило начало исследованиям по оценке эффектов экзогенных и эндогенных каннабиноидов на рецепторы и функцию головного мозга [31]. В ряде доклинических исследований показано, что стимуляция рецепторов СВ₁ головного мозга способствовала нарушению оперативной памяти, но не влияла на долговременную память [16, 30].

Также в доклинических исследованиях продемонстрировано, что эндоканнабиноиды могут провоцировать длительную нейрональную депрессию, а блокада селективного рецептора СВ₁ усиливает мнемонические процессы и улучшает память [22, 37]. Более того, у нокаутных по рецептору СВ₁ мышей отмечалось улучшение памяти [29]. М. Ranganathan и соавторы в 2006 г. показали, что введение тетрагидроканнабиола временно ухудшало непосредственное и отсроченное воспроизведение информации.

По данным нейропсихологических тестов в нашем исследовании установлено, что у пациентов с ожирением снижается концентрация внимания и страдает краткосрочная память. При проведении корреляционного анализа выявлена достоверная связь между содержанием 2-арахидоноилглицерола и вниманием, краткосрочной памятью. Таким образом, эндогенные каннабиноиды, так же как экзогенные, оказывают влияние на процессы не только памяти, но и внима-

В настоящее время гипоталамус, таламус, лобная кора головного мозга рассматриваются исследователями как возможная зона генерации КВП [14]. Эти структуры важны для процессов обучения и памяти [17]. По данным ряда исследователей, в них отмечается высокая плотность рецепторов СВ₁ [18, 26].

Когнитивные, или эндогенные, вызванные потенциалы — зафиксированная во времени электрическая активность головного мозга, отражающая определенные фазы корковых процессов восприятия и обработки информации [4]. Эндогенные потенциалы являются объективными показателями состояния когнитивных функций и служат для изучения их нарушений. Одним из компонентов КВП является позитивная волна — P300, которая возникает в интервале 250–450 мс (в среднем около 300 мс) после предъявления стимула. Считается, что этот компонент наиболее тесно связан с когнитивными процессами восприятия и внимания [27, 28]. В результате проведенного нами исследования была выявлена достоверная связь между КВП и уровнем 2-арахидоноилглицерола, что также подтверждает влияние эндогенных каннабиноидов на количественные показатели когнитивных функций.

Доклинические исследования ожирения продемонстрировали, что ЭС связана с нарушением гомеостаза липидов и глюкозы [20]. Ряд исследователей показал, что активация ЭС стимулирует липогенез, а блокада рецепторов СВ₁ способствует улучшению липидных нарушений, сопутствующих ожирению [15, 24]. В нашем исследовании получена положительная корреляционная связь между содержанием анандамида и общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности.

М. Blucher и соавт., I. Matias и соавт. продемонстрировали, что у мужчин и женщин, страдающих абдоминальным ожирением, повышен уровень 2-арахидоноилглицерола, но не анандамида в крови [6, 9]. Нами выявлено увеличение концентрации не только 2-арахидоноилглицерола, но и анандамида, а также показана ассоциация между содержанием 2-арахидоноилглицерола и ИМТ, окружностью талии, что соответствует результатам, полученным рядом других авторов.

В проведенном нами исследовании не было получено взаимосвязи между концентрацией эндогенных каннабиноидов и глюкозы. Возможно, небольшое количество включенных в исследование пациентов предопределило полученный результат.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с ожирением отмечается развитие когнитивного дефицита по результатам нейропсихологических тестов и количественного анализа когнитивных функций.

2. Увеличение уровня 2-арахидоноилглицерола ассоциируется со снижением памяти и внимания в группе пациентов с ожирением как по результатам тестирования, так и при количественной оценке когнитивных функций.

3. Нарушение липидного обмена у пациентов с ожирением тесно связано с увеличением уровня эндогенных каннабиноидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Благосклонная Я.В., Шляхто Е.В., Бабенко А.Ю.* Эндокринология. Учебник для медицинских вузов. СПб.: СпецЛит, 2004. 398 с.
2. *Захаров В.В., Яхно Н.Н.* Когнитивные расстройства в пожилом и старческом возрасте. Методическое пособие для врачей. М., 2005.
3. *Захаров В.В., Яхно Н.Н.* Синдром умеренных когнитивных расстройств в пожилом и старческом возрасте // Рус. мед. журн. 2004. (10). 573–576.
4. *Коберская Н.Н.* Когнитивный потенциал P300 // Неврол. журн. 2003. (6). 34–42.
5. *Ameri A.* The effects of cannabinoids on the brain // Prog. Neurobiol. 1999. 58. 315–348.
6. *Blucher M., Engeli S., Kloting N. et al.* Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity // Diabetes. 2006. 55. 3053–3060.
7. *Chevalere V., Takahashi K.A., Castillo P.E.* Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS // Annu. Rev. Neurosci. 2006. 29. 37–76.
8. *Cota D., Woods S.* The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. 2005. 12. 338–351.
9. *Cote M., Matias I., Lemieux I. et al.* Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men // Int. J. Obes (Lond). 2007. 31. 692–699.
10. *De Petrocellis L., Cascio M.G., Di Marzo V.* The endocannabinoid system: a general view and latest additions // Br. J. Pharmacol. 2004. 141. 765–774.
11. *Devane W.A., Hanus L., Breuer A. et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor // Science. 1992. 258. 1946–1949.
12. *Di Marzo V., Fontana A.* Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone' // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 1995. 53. 1–11.
13. *Di Marzo V., Matias I.* Endocannabinoid control of food intake and energy balance // Nat. Neurosci. 2005. 8. 585–589.
14. *Frodl-Bauch T., Bottlender R., Hegerl U.* Neurochemical substrates and neuroanatomical generators of the event-related P300 // Neuropsychobiology. 1999. 40. 86–94.
15. *Gary-Bobo M., Elachouri G., Gallas J.F. et al.* Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa // Hepatology. 2007. 46. 122–129.
16. *Hampson R.E., Deadwyler S.A.* Role of cannabinoid receptors in memory storage // Neurobiol. Dis. 1998. 5. 474–482.
17. *Hénon H., Pasquier F., Leys D.* Poststroke dementia // Cerebrovasc. Dis. 2006. 22. 61–70.
18. *Howlett A.C., Breivogel C.S., Childers S.R. et al.* Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress // Neuropharmacology. 2004. 47. (Suppl. 1). 345–358.
19. *Idris A.I., van 't Hof R.J., Greig I.R. et al.* Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors // Nat. Med. 2005. 11. 774–779.
20. *Jbilo O., Ravinet-Trillou C., Arnone M. et al.* The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance // FASEB J. 2005. 19. 1567–1569.
21. *Johnson K.C., Margolis K.L., Espeland M.A. et al.* A prospective study of the effect of hypertension and baseline blood pressure on cognitive decline and dementia in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study // J. Am. Geriatr. Soc. 2008. 56. 1449–1458.
22. *Lichtman A.H.* SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats // Eur. J. Pharmacol. 2000. 404. 175–179.
23. *Matthews D., Hosker J., Rudenski A. et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man // Diabetologia. 1985. 28. (7). 412–419.
24. *Osei-Hyiaman D., DePetrillo M., Pacher P. et al.* Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity // J. Clin. Invest. 2005. 115. 1298–1305.
25. *Pagotto U., Vicenati V., Pasquali R.* The endocannabinoid system and the treatment of obesity // Ann. Med. 2005. 37. 270–275.
26. *Piomelli D.* The molecular logic of endocannabinoid signaling // Nat. Rev. Neurosci. 2003. 4. 873–884.

27. Polich J. Meta-analysis of P300 normative aging studies // *Psychophysiology*. 1996. 33. 334–353.
28. Polich J. Attention, probability and task demands as determinants of P300 latency from auditory stimuli // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1986. 63. 251–259.
29. Reibaud M., Obinu M.C., Ledent C. et al. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. 379. R1–2.
30. Robinson L., McKillop-Smith S., Ross N.L. et al. Hippocampal endocannabinoids inhibit spatial learning and limit spatial memory in rats // *Psychopharmacology (Berl)*. 2008. 198. 551–563.
31. Sim-Selley L. Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids // *Crit. Rev. Neurobiol.* 2003. 15. 91–119.
32. Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. 215. 89–97.
33. Wang H., Dey S.K., Maccarrone M. Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility // *Endocr. Rev.* 2006. 27. 427–448.
34. Whitmer R.A., Gustafson D.R., Barrett-Connor E. et al. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later // *Neurology*. 2008. 71. 1057–1064.
35. Whitmer R.A., Gunderson E.P., Barrett-Connor E. et al. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study // *BMJ*. 2005. 330. 1360–1364.
36. Wilson R.I., Nicoll R.A. Endocannabinoid signaling in the brain // *Science*. 2002. 296. 678–682.
37. Wolff M.C., Leander J.D. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task // *Eur. J. Pharmacol.* 2003. 477. 213–217.

THE ENDOGENOUS CANNABINOIDS AND COGNITIVE FUNCTIONS IN PATIENTS WITH OBESITY

Irina Borisovna ZUEVA, Karina Igorevna VANAEVA

Federal Center for Heart, Blood, and Endocrinology n.a. V.A. Almazov
197341, Sankt-Petersburg, Akkuratov str., 2

Aim. To see the association between cognitive function and activity of the endocannabinoid system in patients with obesity. Material and methods. 32 patients (18 female and 14 men) (mean age 47.81 ± 2.34) have been examined. All participants underwent neuropsychological testing, cognitive evoked potential and level of the endocannabinoids measures. Results. It has been shown that cognitive dysfunction has been revealed in patients of middle age with obesity. Activation of the endocannabinoid system was associated with cognitive deficiency in this group.

Key words: cognitive dysfunction, abdominal obesity, endogenous cannabinoids.

Zueva I.B. – candidate of medical sciences, head of cardiology department № 1 for patients with myocardial infarction, e-mail: iravit@yandex.ru

Vanaeva K.I. – doctor of cardiology department № 1 for patients with myocardial infarction, e-mail: iravit@yandex.ru

ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ СОЧЕТАННЫХ ХРОНИЧЕСКИХ НЕИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ТРУДЯЩИХСЯ г. МИРНОГО РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

Юрий Алексеевич НИКОЛАЕВ, Вячеслав Алексеевич ШКУРУПИЙ,
Игорь Михайлович МИТРОФАНОВ, Владимир Яковлевич ПОЛЯКОВ

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

Согласно протоколу программы Европейского регионального Бюро WHO/CINDI (Countrywide Integrated Non-communicable Diseases Intervention programme) было проведено обследование трудящихся промышленных предприятий г. Мирного Республики Саха (Якутия) с целью изучения динамики распространенности хронических неинфекционных заболеваний (ХНИЗ) и их сочетаний. Всего было обследовано 2814 человек. В 1991 г. в популяционной выборке было 790 человек, в 2000 г. – 1012 человек, в 2007 г. – 417 человек. Для анализа динамики распространенности ХНИЗ и их сочетаний была использована международная классификация болезней 10 пересмотра. В период с 1991 по 2007 г. у трудящихся г. Мирного Республика Саха (Якутия) распространенность изолированных форм ХНИЗ в целом снижалась, но происходило увеличение распространенности сочетанных ХНИЗ. Заболевания, которые наиболее часто встречались в сочетании: эндокринной системы и нарушения обмена веществ; сердечно-сосудистой системы; пищеварительной системы; костно-мышечной системы и соединительной ткани.

Ключевые слова: динамика распространенности хронических неинфекционных заболеваний, сочетанная патология, г. Мирный, Республика Саха (Якутия).

Современные эпидемиологические исследования носят преимущественно моноэтиологический характер, тогда как в 70–90 % случаев хронические неинфекционные заболевания (ХНИЗ) сочетаются между собой, что не позволяет в полной мере проанализировать факторы риска, прогнозы развития какой-то одной нозологии, эффективно решать вопросы их профилактики и лечения [1]. При сочетанной хронической неинфекционной патологии (ХНП) имеются общие этиологические факторы, которые обуславливают общность некоторых звеньев патогенеза ХНП [2, 3]. При этом синтропические аспекты необходимо учитывать для проведения целенаправленной профилактики, адекватного лечения и прогнозирования осложнений [4]. Эта проблема актуальна для Сибири и на Севере, где на комплекс экстремальных природных условий проживания [5] «наслаивается» тяжелая работа в горнорудной промышленности, что оказывает

неблагоприятное воздействие на организм человека [6] и, очевидно, требует новых стратегий, обеспечивающих повышение медицинской безопасности населения. Поэтому необходимо располагать объективными данными о состоянии здоровья населения этих регионов, особенностях формирования и проявлений сочетанной хронической неинфекционной патологии.

Цель исследования – изучить распространенность сочетанных и изолированных форм соматических болезней у пришлого населения – трудящихся промышленных предприятий г. Мирного Республики Саха (Якутия) и их соотношений в период с 1991 по 2007 г.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для анализа использовали результаты, полученные в ходе стандартизированных, скрининговых обследований в 1991, 2000 и 2007 гг. трудящихся промышленных предприятий г. Мир-

Николаев Ю.А. – д.м.н., главный научный сотрудник, и.о. зам. директора по клинической и научной работе, руководитель лаборатории патогенеза соматических заболеваний

Шкурупий В.А. – д.м.н., проф., академик РАМН, директор

Митрофанов И.М. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патогенеза соматических заболеваний

Поляков В.Я. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории патогенеза соматических заболеваний,
e-mail: vpolyakov15@yandex.ru

ного Республики Саха (Якутия), занятых в горнорудной отрасли промышленности. Обследование людей проводили согласно протоколу программы Европейского регионального Бюро WHO/CINDI (Countrywide Integrated Noncommunicable Diseases Intervention programme). В 1991 г. из 3500 трудящихся была сформирована рандомизированная репрезентативная выборка в 1000 человек, отклик составил 79,0 %, обследовано 790 человек (277 мужчин и 513 женщин). В 2000 г. была сформирована репрезентативная рандомизированная выборка численностью 1200 человек, при отклике 84,5 % обследовано 1012 человек (644 мужчины и 368 женщин). В 2007 г. была сформирована репрезентативная рандомизированная выборка из 417 человек, отклик составил 92 % (266 мужчин и 151 женщина). Таким образом, всего было обследовано 2814 человек. Выявленные заболевания были закодированы по международной классификации заболеваний 10 пересмотра (МКБ-10). При проведении статистической обработки полученных данных для оценки достоверности различий частотных характеристик использовался z-критерий, в случае множественных апостериорных сравнений применялся z-критерий с поправкой Бонферрони. Выявленные различия считали статистически значимыми при величине $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В период с 1991 по 2007 г. распространенность изолированных форм заболеваний в

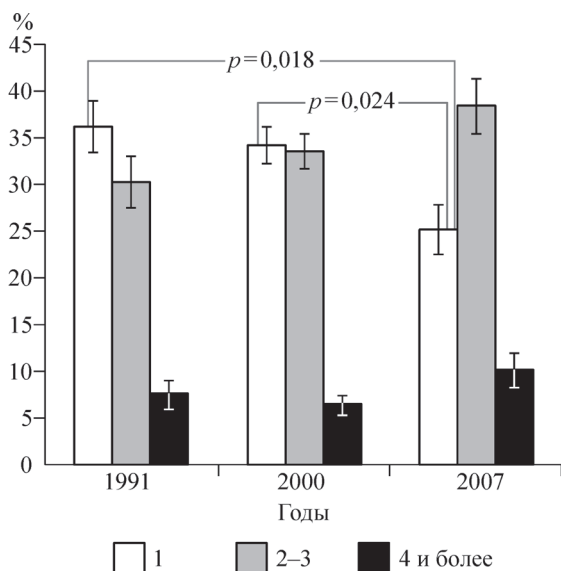


Рис. 1. Распространенность изолированных форм и сочетанных заболеваний (%) у мужчин г. Мирного Республики Саха (Якутия) с 1991 по 2007 г.

целом снижалась, но увеличивалась частота встречаемости сочетанной ХНИЗ (2–3 и более нозологические формы). Гендерные различия во временном интервале с 1991 по 2007 г. характеризовались увеличением у мужчин распространенности сочетанной хронической неинфекционной патологии – двух и более заболеваний (рис. 1). У женщин в этом временном интервале происходило достоверное увеличение частоты встречаемости четырех и более сочетанных ХНИЗ – с 17,0 % в 1991 г. до 34,1 % в 2000 г. и 28,7 % в 2007 г. (рис. 2). Это, вероятно, связано с тем, что у женщин с увеличением возраста количество хронических заболеваний становится больше, чем у мужчин [7]. Анализ структуры распространенности болезней показал, что основной вклад вносят заболевания сердечно-сосудистой системы, эндокринной системы и обмена веществ, пищеварительной системы (см. таблицу).

При анализе изолированных форм ХНИЗ установлено, что распространенность болезней системы кровообращения в 1991 г. составляла 4,1 %, в 2000 г. – 6,0 % и в 2007 г. – 4,6 % от обследованных в выборке людей. Наиболее часто сочетались болезни сердечно-сосудистой системы с болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани. В 2007 г. эти сочетания составили в структуре распространенности заболеваний 16,3 %, несколько меньше – в 1991 и 2000 гг., 10,4 и 10,0 % соответственно. В 1991 г. изолированными формами болезней системы кровообращения страдали 6,5 % мужчин, в 2000 г. – 8,4 %, в 2007 г. – 4,9 %. У мужчин на

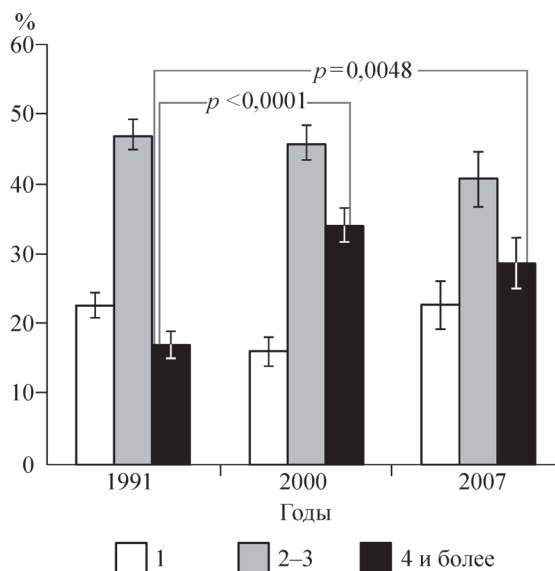


Рис. 2. Распространенность изолированных форм и сочетанных заболеваний (%) у женщин г. Мирного Республики Саха (Якутия) с 1991 по 2007 г.

Таблица 1

Динамика распространенности (%) основных классов болезней у трудящихся г. Мирного Республики Саха (Якутия) в период с 1991 по 2007 г.

Класс болезней по МКБ-10	1991 г.			2000 г.			2007 г.		
	Мужчины (n = 277)	Женщины (n = 513)	Всего (n = 790)	Мужчины (n = 643)	Женщины (n = 369)	Всего (n = 1012)	Мужчины (n = 266)	Женщины (n = 150)	Всего (n = 416)
Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (класс IV)	2,5	14,6	10,4	19*	56,4*	32,6*	5,6#	20,7	11,1#
Болезни системы кровообращения (класс IX)	20,9	25,9	24,2	24	26,8	25	27,4	29,3	28,1
Болезни органов дыхания (класс X)	22,7	29,6	27,2	11,4*	17,1*	13,4	15,8	10^	13,7^
Болезни органов пищеварения (класс XI)	23,5	36,1	31,6	21,3	49,9*	31,7	30,5#	54,7^	39,2#^
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (класс XIII)	35,7	41,1	39,2	33,6	39,6	35,8	45,9#^	45,3	45,7#^
Всего случаев хронической патологии	141,9	216,2	190,1	141,7	297,0	198,3	159,8	260,7	196,2

Примечание. Различия статистически значимы при $p < 0,05$ между показателями: * – 1991 и 2000 гг., # – 2000 и 2007 гг., ^ – 1991 и 2007 гг.

Наибольшая распространенность сочетания болезней системы кровообращения была с болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани: в 2007 г. – 16,2 %, в 1991 г. – 8,7 % и в 2000 г. – 8,1 %. У женщин распространенность изолированных болезней системы кровообращения в 1991 г. составляла 2,7 %, в 2000 г. – 3,8 %, в 2007 г. – 4,0 %. Распространенность болезней системы кровообращения в сочетании с болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани у женщин, так же как и у мужчин, была максимальной и в 2007 г. составляла 16,7 %, в 1991 г. – 11,3 %, в 2000 г. – 13,3 %.

Обнаружены значимые прямые взаимосвязи между частотами встречаемости болезней системы кровообращения (класс IX) и болезней органов пищеварения (класс XI) ($r = 0,04$, $p = 0,0475$), болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани (класс XIII) ($r = 0,07$, $p = 0,0010$), новообразований (класс II) ($r = 0,05$, $p = 0,0318$), а также обратная – с психическими расстройствами и расстройствами поведения (класс V) ($r = -0,12$; $p < 0,0001$).

Изолированные формы болезней эндокринной системы и нарушения обмена веществ имели максимальную распространенность в 2000 г., составив 7,2 %, в то время как в 1991 г. она

была равна 0,1 %, а в 2007 г. – 0,5 %. Наибольшая распространенность сочетанной патологии этого класса болезней была с психическими расстройствами и расстройствами поведения. В 2000 г. этот показатель составлял 15,5 %, существенно ниже он был в 1991 г. (5,7 %) и в 2007 г. (6,3 %). Также была высока частота встречаемости болезней эндокринной системы и нарушений обмена веществ, сочетанных с патологиями костно-мышечной системы и соединительной ткани (в 1991 г. – 3,5 %, в 2000 г. – 12,4 %, в 2007 г. – 5,3 %) и с болезнями органов пищеварения (в 1991 г. – 4,4 %, в 2000 г. – 11,6 %, в 2007 г. – 4,3 %).

У мужчин изолированные формы болезней эндокринной системы и нарушения обмена веществ в 1991 и 2007 гг. выявлены не были, в 2000 г. их распространенность составляла 3,6 %. Максимальная частота встречаемости данного класса болезней у мужчин была в сочетании с психическими расстройствами и расстройствами поведения в 2000 г. (10,1 %).

У женщин распространенность (изолированно) болезней эндокринной системы и нарушений обмена веществ в 1991 г. была равна 0,2 %, в 2000 г. – 13,6 % и в 2007 г. – 1,3 %. Наибольшая распространенность данного класса болезней

была у женщин в сочетании с болезнями органов пищеварения, которая в 2000 г. составляла 25,5 %. Такие показатели распространенности изолированных и сочетанных заболеваний эндокринной системы с максимальным ростом в 2000 г. можно объяснить рядом причин. Так, социально-экономический кризис 1998 г. повлек за собой снижение уровня дохода, уменьшение миграции населения и накопление в популяции лиц с данными нозологиями. Можно предполагать, что одной из причин может быть значительное изменение в эти годы перечня завозимых в северные регионы продуктов питания, влекущее за собой перестройку структуры питания, повышение доступности продуктов с глубокой переработкой, содержащих легко усвояемые жиры и углеводы. Немаловажна также роль депрессивных расстройств, которые ассоциированы с эндокринной патологией [8].

Выявлены прямые взаимосвязи между частотой встречаемости болезней эндокринной системы, расстройства питания и нарушений обмена веществ (класс IV) и болезней крови, кроветворных органов и отдельных нарушений, вовлекающих иммунный механизм (класс III) ($r = 0,05$; $p = 0,0119$), психических расстройств и расстройств поведения (класс V) ($r = 0,66$; $p < 0,0001$).

В целом распространенность изолированных форм болезней системы пищеварения составляла в 1991 г. 5,9 %, в 2000 г. – 6,7 %, в 2007 г. – 6,5 %. Наиболее часто патологии данного класса сочетались с болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани: в 1991 г. – у 14,1 %, в 2000 г. – у 13,0 %, в 2007 г. – у 22,8 %. Распространенность изолированных форм болезней системы пищеварения у мужчин в 1991 г. составляла 5,9 %, в 2000 г. – 6,7 %, в 2007 г. – 6,5 %. У мужчин наиболее часто болезни органов пищеварения сочетались с болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани: в 2007 г. – у 17,7 % обследованных, в 1991 г. – у 9,4 %, в 2000 г. – у 8,2 %. Распространенность изолированных форм болезней системы пищеварения у женщин в 1991 г. составляла 5,1 %, в 2000 г. – 6,0 %, в 2007 г. – 8,7 %. Наибольшая распространенность болезней органов пищеварения у женщин была в сочетании с болезнями костно-мышечной системы и соединительной ткани: в 2007 г. – 32,0 %, в 1991 г. – 16,6 %, в 2000 г. – 21,4 %.

Частота встречаемости болезней органов пищеварения (класс XI) значимо коррелировала с распространенностью хронических инфекционных и паразитарных болезней (класс I) ($r = 0,07$; $p = 0,0004$), новообразований (класс II) ($r = 0,06$;

$p = 0,0066$), болезней эндокринной системы, расстройств питания и нарушения обмена веществ (класс IV) ($r = 0,04$; $p = 0,0422$), болезней нервной системы (класс VI) ($r = 0,04$; $p = 0,0370$), болезней системы кровообращения (класс IX) ($r = 0,04$; $p = 0,0475$), болезней органов дыхания (класс X) ($r = -0,10$; $p = 0,0018$), болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани (класс XIII) ($r = 0,10$; $p < 0,0001$), болезней мочеполовой системы (класс XIV) ($r = 0,09$; $p < 0,0001$).

Таким образом, в период с 1991 по 2007 г. у трудящихся г. Мирного снизилась распространенность изолированных форм соматической патологии, но увеличивалась распространенность полиморбидных состояний. Среди классов болезней, где наиболее часто встречались синтропии, были болезни эндокринной системы и нарушения обмена веществ (класс IV), болезни сердечно-сосудистой системы (класс IX), пищеварительной системы (класс XI), костно-мышечной системы и соединительной ткани (класс XIII). Они, в свою очередь, имели достоверную взаимозависимость между собой и с другой соматической патологией, что, вероятно, связано с динамическим сочетанным влиянием комплекса факторов природной среды, антропогенно-экологических, социальных и производственных факторов. Слабая сила взаимосвязи между изучаемыми классами заболеваний, скорее всего, отражает сложную многоуровневую патогенетическую структуру формирования сочетанной соматической патологии и требует дальнейшего детального изучения.

Результаты популяционных исследований в качестве наиболее вероятных факторов неблагоприятного влияния Севера на здоровье населения предполагают экстремальные климато-географические условия проживания, способствующие возрастанию распространенности заболеваний различных классов у работающего населения [9–11], и негативные социально-экономические факторы, имевшие место в период исследования. Выявлена связь увеличения доли полиморбидной патологии со старением населения [12], расширением диагностических возможностей медицины [13], неблагоприятным воздействием факторов окружающей среды [14]. Показано возрастание в условиях проживания на Севере, в регионе проведения исследования, частоты встречаемости таких коморбидных состояний, как артериальная гипертензия и гепатобилиарная патология [15], артериальная гипертензия в сочетании с нарушениями углеводного и липидного обмена [16].

Полагаем, что многофакторный подход к профилактике хронических неинфекционных заболеваний, в том числе коморбидных патологий, может быть более эффективным [17–18]. Так как у пациентов с коморбидными состояниями раньше, чем у больных с мононозоологиями того же класса, ухудшается прогноз развития заболевания и снижается качество жизни [19–21], возникают очевидные сложности в медикаментозной терапии. В связи с этим необходима разработка оптимальной стратегии ведения пациентов с сочетанными нозологиями, совершенствование технологии мероприятий по профилактике и лечению больных в условиях проживания на Севере. Интегральная оценка состояния здоровья при сочетанности нозологических форм необходима не только при выборе тактики лечения, но и при проведении профилактических осмотров, целью которых является формирование групп высокого и очень высокого риска развития хронических неинфекционных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bhaskaran K., Hajat S., Haines A., Herrett E. et al.* Short term effects of temperature on risk of myocardial infarction in England and Wales: time series regression analysis of the Myocardial Ischaemia National Audit Project (MINAP) registry // *BMJ*. 2010. (341). с3823.
2. *Шаробаро В.И.* Клинические особенности заболевания, психологические изменения личности и активность антиоксидантной системы у больных язвенной болезнью // *Клин. мед.* 2001. (5). 39–40.
3. *Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н.* Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. М., 2000.
4. *Смирнова Л.Е.* К проблеме коморбидности язвенно-эрозивных поражений гастродуоденальной зоны и артериальной гипертензии // *Клин. мед.* 2003. (3). 9–15.
5. *McGrath-Hanna N.K., Greene D.M., Tavernier R.J., Bult-Ito A.* Diet and mental health in the Arctic: is diet an important risk factor for mental health in circumpolar peoples // *Int. J. Circumpolar Health*. 2003. 62. (3). 228–241.
6. *Семенова И.Н., Рафикова Ю.С., Янтурин С.И.* Техногенное загрязнение и состояние здоровья работников горнорудных производств // *Соврем. наукоемкие технологии*. 2010. (2). 52–53.
7. *Лазебник Л.Б.* Старение и полиморбидность // *Consilium medicum*. 2005. 7. (12). 1–5.
8. *Филатова Е.Г., Вейн А.М.* Мотивационные и эндокринные расстройства при депрессии // *Consilium medicum*. 2000. (1). 1–7.
9. *Николаев Ю.А., Дарянина С.А., Пальцев А.И. и др.* Эпидемиология, патогенез, профилактика и лечение артериальной гипертензии у пришлого населения на Севере / Ред. В.А. Шкурупий. Новосибирск, 2005. 200 с.
10. *Кейль В.Р., Кузнецова И.Ю., Митрофанов И.М. и др.* Здоровье трудящихся промышленных предприятий Севера. Ред. В.А. Шкурупий. Новосибирск: Наука, 2005. 231 с.
11. *Жеглова А.В., Сааркоптель Л.М.* Региональные особенности функционального состояния горнорабочих различных регионов РФ // *Экологически обусловленные ущербы здоровью: методология, значение и перспективы оценки: Материалы пленума научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и МЗ и соцразвития РФ*. М., 2005. 365–367.
12. *Процаев К.И., Ильницкий А.Н., Постникова Л.И. и др.* Клиническая патология полиморбидности в гериатрической практике // *Успехи геронтологии*. 2011. 24. (2). 285–289.
13. *Горшунова Н.* Диагностика полиморбидности в практике семейного врача // *Врач*. 2006. (1). 10–11.
14. *Поляков В.Я., Николаев Ю.А.* Клинико-метаболические, возрастные и биоритмологические аспекты особенностей суточного профиля артериального давления у больных артериальной гипертензией // *Клин. мед.* 2011. (3). 31–35.
15. *Дарянина С.А., Пальцев А.И., Николаев Ю.А.* Особенности вариабельности сердечного ритма при заболеваниях желчевыделительной системы в сочетании с артериальной гипертензией у пришлого населения Севера // *Терапевт. арх.* 2009. (4). 76–79.
16. *Гинсар Е.А., Селятицкая В.Г., Лутов Ю.В. и др.* Распространенность и структура метаболического синдрома у работающих женщин г. Мирного (Республика Саха (Якутия)) // *Профилактика заболеваний и укрепление здоровья*. 2008. 11. (6). 30–34.
17. *Оганов Р.Г.* Эффективные стратегии длительного контроля неинфекционных заболеваний в России // *Профилактика заболеваний и укрепление здоровья*. 2004. (1). 3–6.
18. *Ивашова С.С.* Распространенность факторов риска неинфекционных заболеваний в неорганизованной популяции промышленного города в условиях Севера. Возможности коррекции // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2009. (S). 133a-133.
19. Европейская стратегия профилактики и борьбы с неинфекционными заболеваниями. Ко-

пенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ, 2006. 46 с.

20. Fortin M., Bravo G., Hudon C. Relationship between multi-morbidity and health-related quality of life of patients in primary care // Qual. Life Res. 2006. (15). 83–91.

21. Rijken M., Kerkhof M., Dekker J., Schellevis F. Comorbidity of chronic diseases: effects of disease pairs on physical and mental functioning // Qual. Life Res. 2005. (4). 45–55.

DYNAMICS OF COMORBIDE INTERNAL DEASESES PREVALENCE AT WORKERS IN MIRNY OF THE SAKHA REPUBLIC (YAKUTIA)

Yuryi Alekseevich NIKOLAEV, Vyacheslav Alekseevich SHKURUPIY,
Igor` Mikhaylovich MITROFANOV, Vladimir Yakovlevich POLYAKOV

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

The examination of workers of the industrial enterprises of Mirny (Sakha-Yakutia) has been carried out with the purpose of studying the dynamics of prevalence of chronic non-communicable diseases (CNCD) and their combinations in accordance with the protocol of the European regional Bureau WHO/CINDI program (Countrywide Integrated Noncommunicable Diseases Intervention program). 2814 people have been surveyed in total. The population sampling in 1991 consisted of 790 people; in 2000 – 1012 people; in 2007 – 417 people. The International Statistical Classification of Diseases of 10 revisions (ICD-10) has been used for the analysis of prevalence of chronic non-communicable diseases dynamics and their combinations. The prevalence of isolated forms of chronic non-communicable diseases among the workers of Mirny (Sakha-Yakutia) reduced during the period from 1991 to 2007, but the combinations of chronic non-communicable diseases increased during the same period. The most common diseases in combination are: endocrine system and metabolic derangements; cardiovascular system; digestive system; musculoskeletal system and a connective tissue.

Key words: Prevalence of somatic diseases, comorbide pathology, the Republic of Sakha (Yakutia).

Nikolaev Yu.A. – doctor of medical sciences, deputy director on clinical and scientific work, head of the laboratory for somatic disease pathogenesis, senior researcher

Shkurupiy V.A. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, director

Mitrofanov I.M. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory for somatic disease pathogenesis

Polyakov V.Ya. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory for somatic disease pathogenesis, e-mail: vpolyakov15@yandex.ru

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ГОРМОНАЛЬНО-ЗАВИСИМОГО ЭТАПА Фолликулогенеза при Эндокринном Бесплодии

Елена Анатольевна ТЕПЛЯШИНА, Марина Викторовна ЕКИМОВА,
Елена Анатольевна ПОЖИЛЕНКОВА, Алла Борисовна САЛМИНА

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Проанализировано содержание маркеров пролиферации и ангиогенеза в фолликулярной жидкости на разных стадиях развития фолликулов. Фолликулярную жидкость получали от пациенток с нарушениями менструальной и репродуктивной функции на фоне хронической ановуляции и гиперандрогении ($n = 65$) или функциональной гиперпролактинемии ($n = 59$) и женщин с регулярным двухфазным менструальным циклом и трубно-перитонеальной формой бесплодия, которые составили контрольную группу ($n = 45$). Результаты позволяют предположить, что развитие фолликулов при эндокринной патологии происходит в условиях нарушенного ангиогенеза и дисрегуляции механизмов клеточной пролиферации и дифференцировки.

Ключевые слова: эндокринное бесплодие, фолликулогенез, факторы роста, ангиогенез, пролиферация.

Эндокринное бесплодие у женщин является важнейшей составляющей многофакторной структуры бесплодного брака. На первый план выступают такие заболевания, как гиперандрогения и гиперпролактинемия [2]. В основе патогенеза указанных форм эндокринного бесплодия лежит функционирование репродуктивной системы в условиях измененного гормонального статуса, что приводит к последовательному нарушению стероидо- и фолликулогенеза, овуляции и оплодотворения [3].

Исследование молекулярно-биологических маркеров развития фолликулов в процессе фолликулогенеза – одно из наиболее перспективных и социально значимых направлений репродуктивной биологии. В настоящее время актуальность изучения оогенеза и фолликулогенеза обусловлена высоким процентом бесплодных браков.

Факторам пролиферации отводится важная роль в процессе фолликулогенеза. Значение данных регуляторных элементов сложно переоценить, поскольку они тесным образом связаны с процессами ангиогенеза и фолликулогенеза на

гормонально-независимой стадии [5]. Контроль этих процессов осуществляют основная форма фактора роста фибробластов (oФРФ), эпидермальный фактор роста (ЭФР), инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1), трансформирующий фактор роста- β (ТФР- β).

Целью работы послужило исследование содержания маркеров пролиферации и ангиогенеза в образцах антральной жидкости фолликулов человека разной степени зрелости (III–VIII классы).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе проанализированы образцы фолликулярной жидкости (ФЖ) 169 полостных фолликулов на разных стадиях развития, полученных от пациенток, проходивших лечение в циклах экстракорпорального оплодотворения.

Выполнение работы одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола № 19 от 25 ноября 2009 года). В исследовании соблюдались этические принципы, предъявляе-

Тепляшина Е.А. – аспирант кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, e-mail: elenateplyashina@mail.ru

Екимова М.В. – д.м.н., проф. кафедры клинко-лабораторной диагностики ИПО, e-mail: ekimovamv@mail.ru

Пожиленкова Е.А. – к.б.н., доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, e-mail: pozhilenkova@yandex.ru

Салмина А.Б. – д.м.н., проф., зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, e-mail: allasalmina@mail.ru

мые Хельсинкской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2000).

Образцы ФЖ получали от пациенток репродуктивного возраста с нарушениями менструальной и репродуктивной функции на фоне хронической ановуляции и гиперандрогении (ГА, $n = 65$) или функциональной гиперпролактинемии (ГП, $n = 59$). Контрольную группу составили образцы ФЖ от женщин с регулярным двухфазным менструальным циклом и трубно-перитонеальной формой бесплодия (ТПФ, $n = 45$).

Возраст женщин варьировал от 21 до 42 лет и в среднем составил $32,7 \pm 1,5$ года. Период предшествующего бесплодия у обследованных супружеских пар составил 3–18 лет, в среднем $7,6 \pm 1,5$ года.

Для установления причины бесплодия пациенткам проводили стандартное клинико-лабораторное обследование. Стимуляцию овуляции во всех лечебных циклах осуществляли с использованием препаратов агонистов гонадотропин рилизинг-гормона (а-ГнРГ) (декапептил-дейли) в сочетании с пурегоном. В качестве индуктора овуляции использовали овитрель.

Образцы ФЖ для исследования получали во время проведения трансвагинальной пункции фолликулов разной степени зрелости (объем полученной ФЖ варьировал от 0,1 до 8 мл для диаметра фолликула от 0,2–0,9 до 16–20 мм соответственно), помещали в стерильные пластиковые пробирки и использовали для анализа. Образцы анализировали по принципу: «одна пациентка – один доминантный фолликул» или «одна пациентка – 2–3 фолликула разной степени зрелости».

Стадию развития фолликула определяли в зависимости от его диаметра. Таким образом, в исследование включены фолликулы от ранних антральных до преовуляторных (III–VIII классы) [7, 10].

Концентрацию факторов роста определяли при помощи твердофазного иммуоферментного анализа. Для определения концентрации ИФР-1 использовали набор «Non-Extraction IGF-I ELISA DSL-10-2800» (Diagnostic Systems Laboratories, США), для определения концентрации ЭФР – «Invitrogen Immunoassay Kit KHG0062» (Invitrogen, США), для определения концентрации ТФР- β – «BMS249/3 human TGF- β 1 Platinum ELISA» (eBioscience, США), для определения концентрации оФРФ – «Invitrogen ELISA Kit HG0021».

Полученные данные сравнивали с показателями стадии раннего антрального фолликула

при помощи критерия Вилкоксона и с показателями соответствующей стадии развития фолликула в контрольной группе при помощи критерия Манна–Уитни. При анализе связи признаков рассчитывали коэффициент корреляции по методу Спирмена. Результаты оценивали с учетом следующих величин r : $|r| \leq 0,25$ – корреляция слабой силы; $0,25 < |r| \leq 0,75$ – корреляция умеренной силы; $|r| > 0,75$ – тесная корреляция. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие фолликулов со стадии антрального фолликула до преовуляторного характеризуется высокой пролиферативной способностью их соматических клеток [1]. Для созревающих фолликулов яичника характерна продукция факторов роста, оказывающих модифицирующее действие на процессы клеточной дифференцировки [3]. К их числу можно отнести ангиогенный гепаринсвязывающий оФРФ. Данный фактор широко распространен в тканях репродуктивной системы женщины. Достигая максимальной концентрации в экстрацеллюлярном матриксе, оФРФ способствует инициации процесса ремоделирования сосудов, который является одним из ключевых этапов ангиогенеза [9].

В контрольной группе пациенток концентрация оФРФ постепенно уменьшалась в зависимости от стадии развития фолликула (рисунок, а). На заключительных стадиях развития фолликулов с диаметром 10–16 мм, 16–20 мм и более концентрация оФРФ была статистически значимо снижена по сравнению с уровнем оФРФ на стадии раннего антрального фолликула.

В группе ГА содержание оФРФ на стадиях раннего антрального, антрального, преобладающего, доминантного фолликулов было снижено по сравнению соответствующими величинами пациенток с ТПФ ($p < 0,05$). В группе ГП концентрация данного фактора роста была значительно меньше, чем в группе ТПФ ($p < 0,05$), на всех стадиях развития фолликула, за исключением стадии преобладающего и доминантного фолликулов.

Сниженная ангиогенная активность соматических клеток развивающихся фолликулов при эндокринной патологии, о чем свидетельствует низкий уровень оФРФ, может вызывать замедление развития кровеносных сосудов и снижение барьерной функции сосудов микроциркуляторного русла [8], тем самым препятствуя развитию полноценного доминантного фолликула в случае эндокринного бесплодия.

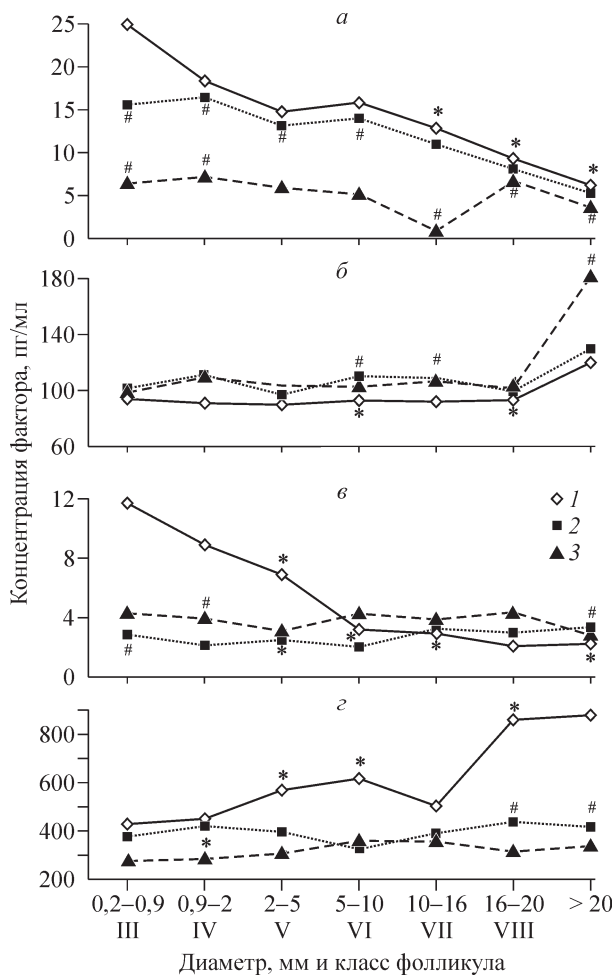


Рис. Концентрация оФРФ (а), ИФР-1 (б), ЭФР (в) и ТФР-β (з) в фолликулярной жидкости антральных фолликулов при эндокринном бесплодии и ГПФ. Звездочкой (*) обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) различия внутри группы, # – между аналогичными показателями контрольной группы и группы сравнения; 1 – гиперпролактинемия, 2 – гиперандрогения, 3 – контроль

Важная роль в осуществлении эндокринной, аутокринной и паракринной регуляции процессов клеточного роста, развития и дифференцировки клеток и тканей принадлежит ИФР-1. Следствием ослабления роли цитокина в ингибировании апоптоза и развития патологических состояний выступает нарушение механизма функционирования данного фактора [6].

В настоящей работе выявлено повышение концентрации ИФР-1 в фолликулярной жидкости пациенток с эндокринным бесплодием по сравнению с величиной показателя на гормонально-зависимом этапе фолликулогенеза (см. рисунок, б). Данное увеличение отмечено со стадии раннего антрального фолликула для пациенток как с ГА, так и с ГП по сравнению

с концентрацией ИФР-1 контрольной группы пациенток на аналогичных стадиях (у женщин с ГА на стадиях доминантного и раннего преовуляторного фолликула – статистически значимо). В контрольной группе пациенток на стадиях развития фолликулов с диаметром 5–10 мм и 16–20 мм содержание ИФР-1 было достоверно ниже, чем на стадии раннего антрального фолликула.

Согласно литературным данным, повышенная концентрация данного фактора роста приводит к снижению активности ароматазы в гранулезных клетках [4] и, следовательно, способствуя накоплению тестостерона в фолликулярной жидкости, препятствует полноценному развитию доминантного фолликула при эндокринной патологии. Факт накопления тестостерона при изучаемых вариантах эндокринного бесплодия выявлен и описан нами ранее [3].

Ключевую роль в пролиферации клеток развивающегося фолликула занимает ЭФР. Данному фактору, по характеру его влияния на гранулезные и тека-клетки фолликула, отводится ведущая роль по сравнению с другими молекулярно-биологическими маркерами. Подтверждением этому выступает эффект ингибирования эпидермальным фактором роста ароматазной активности гранулезных клеток, индуцированной фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ) [11].

Действительно, для пациенток контрольной группы было отмечено достаточно высокое содержание ЭФР, составившее 12 пг/мл на стадии раннего антрального фолликула с постепенным снижением до 3,8 пг/мл на стадии доминантного фолликула (см. рисунок, в). При этом концентрация ЭФР на стадии преобладающего, доминантного, раннего преовуляторного и овуляторного фолликула была статистически значимо снижена по сравнению с уровнем ЭФР на стадии раннего антрального фолликула. В группах пациенток с эндокринопатиями выявлено увеличение концентрации ЭФР. У пациенток с ГП оно отмечалось со стадии доминантного фолликула, а у пациенток с ГА – со стадии раннего преовуляторного фолликула по сравнению с уровнем ЭФР у пациенток контрольной группы на аналогичных стадиях ($p < 0,05$).

Сниженная выработка ЭФР клетками гранулезы, характерная для фолликулов с диаметром от 0,2–0,9 до 5–10 мм у пациенток с ГА и ГП, может способствовать долговременному блокирующему действию данного фактора на выработку ингибина и на чувствительность клеток гранулезы к действию ФСГ [10]. Поскольку период селекции роста фолликулов зависит от

ФСГ, относительный дефицит гормона может выступать одной из причин нарушения роста и созревания доминантного фолликула до преовуляторного, а также последующей атрезии антральных фолликулов, что является характерным признаком патологического фолликулогенеза при эндокринном бесплодии.

Модифицирующим действием на процессы клеточной дифференцировки в созревающих фолликулах обладает ТФР-β – мультифункциональный пептид, обладающий как ингибирующим, так и активирующим действием на клеточную пролиферацию и дифференцировку. ТФР-Я может выступать посредником апоптотических эффектов стероидных гормонов, способствуя запуску процесса апоптоза клеток фолликула [12].

В фолликулярной жидкости пациенток с ТПФ концентрация ТФР-β возрастала с увеличением диаметра фолликула (см. рисунок, 2) и на стадиях развития фолликула с диаметром 2–5, 5–10 и 16–20 мм была статистически значимо увеличена по сравнению с уровнем ТФР-β на стадии раннего антрального фолликула. У пациенток с ГА на стадиях развития фолликула с диаметром 16–20 мм и > 20 мм, а у пациенток с ГП на стадии развития фолликула с диаметром 0,9–2 мм секреция ТФР-β была значительно ниже, чем у пациенток контрольной группы на аналогичных стадиях.

Как известно, взаимодействие между ТФР-β и ЭФР, как факторов, имеющих общий рецептор в соматических клетках фолликулов, является важным механизмом регуляции роста преантральных фолликулов [12]. Нами выявлено значительное снижение уровней обоих факторов, что, вероятно, вносит свой вклад в формирование патологического фолликулогенеза, характерного для эндокринной патологии.

При изучении силы и характера взаимосвязей между маркерами функциональной компетентности и степенью зрелости фолликулов у пациенток с ТПФ была выявлена сильная степень влияния ЭФР ($r = -0,83$; $p = 0,01$), оФРФ ($r = -0,93$; $p = 0,01$) и ТФР-β ($r = 0,89$; $p = 0,007$) на рост и развитие фолликулов. У пациенток с ГА была обнаружена сильная степень отрицательного воздействия ЭФР ($r = -0,83$; $p = 0,01$), оФРФ ($r = -0,93$; $p = 0,01$), ТФР-β ($r = -0,92$; $p = 0,03$) на развитие фолликулов. При корреляционном анализе показателей при ГП подобных зависимостей выявлено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя полученные нами данные, мы можем утверждать, что при эндокринном бесплодии изменение концентрации ключевых маркеров пролиферации и ангиогенеза начинается с ранних стадий развития антральных фолликулов. С учетом вышесказанного уже известные механизмы патогенеза эндокринного бесплодия могут быть дополнены новыми научными данными, свидетельствующими о вкладе патологического ангиогенеза и / или дизрегуляции механизмов клеточной пролиферации и дифференцировки в нарушение развития доминантного фолликула и формирование ановуляторного бесплодия при эндокринной патологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят коллектив Медицинского центра гинекологической эндокринологии и репродукции (г. Красноярск) (*директор – С.А. Сыромятникова*) за помощь в отборе пациентов и предоставление материала для исследования.

Исследования проведены при финансовой поддержке гранта Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (2010 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н. Молекулярные основы фолликулогенеза: от стадии больших антральных фолликулов до овуляции // Проблемы репродукции. 2010. (5). 13–23.
2. Никитин А.И. Фолликуло- и оогенез при стимуляции овуляции // Акушерство и гинекология. 1998. (1). 41–45.
3. Яманова М.В., Салмина А.Б. Эндокринное бесплодие: клеточная и молекулярная патология имплантации. М., 2009. 209 с.
4. Ben-Ami I., Freimann S., Armon L. et al. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches // Mol. Hum. Reprod. 2006. 12. (7). 413–419.
5. Bruno J., Matos M., Chaves R. et al. Angiogenic factors and ovarian follicle development // Anim. Reprod. 2009. 6. (2). 371–379.
6. Enien W. M., Chantler E., Seif M.W. et al. Human ovarian granulosa cells and follicular fluids indices: the relationship to oocyte maturity and fertilization *in vitro* // Hum. Reprod. 1998. 13. (5). 1303–1306.

7. Erickson G., Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors // Fertil. Steril. 2001. 76. (5). 943–949.
8. Erickson G., Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis // Trends Endocrinol. Metab. 2000. 11. (5). 193–198.
9. Geva E., Jaffe R. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology // Fertil. Steril. 2000. 74. 429–438.
10. Mao J., Smith M., Rucker E. et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro* // J. Anim. Sci. 2004. 82. (7). 1967–1975.
11. Teissier M.P., Chable H., Paulhac S. et al. Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability // Hum. Reprod. 2000. 15. (12). 1271–2477.
12. Yang P., Roy Yang S.K. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster preantral follicles *in vitro* // Biol. Reprod. 2001. 65. 847–854.

MOLECULAR MARKERS OF GONADOTROPIN-DEPENDENT PERIOD OF FOLLICULOGENESIS IN ENDOCRINE INFERTILITY

Elena Anatol'evna TEPLYASHINA, Marina Viktorovna EKIMOVA,
Elena Anatol'evna POZHILENKOVA, Alla Borisovna SALMINA

Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky
660022, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 1

The levels of markers of proliferation and angiogenesis in follicular fluid at different stages of folliculogenesis in patients with hyperandrogenism ($n = 65$), hyperprolactinemia ($n = 59$), and in 45 women with regular two-phase menstrual cycle and tuboperitoneal infertility (a control group) have been studied. Our data allow suggesting that the development of follicles in women with endocrine infertility is affected by alterations in angiogenesis, cell proliferation and differentiation.

Key words: endocrine infertility, folliculogenesis, growth factors, angiogenesis, proliferation.

Teplyashina E.A. – postgraduate student of the chair for biochemistry with the course of medical pharmaceutical & toxicological chemistry, e-mail: elenateplyashina@mail.ru

Ekimova M.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for clinical diagnostics, e-mail: ekimovamv@mail.ru

Pozhilenkova E.A. – candidate of biological sciences, professor of the chair for biochemistry with the course of medical pharmaceutical & toxicological chemistry, e-mail: pozhilenkova@yandex.ru

Salmina A.B. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for biochemistry with the course of medical pharmaceutical & toxicological chemistry, e-mail: allasalmina@mail.ru